



COPPE/UFRJ

**NITRIFICAÇÃO DE EFLUENTE INDUSTRIAL EM REATOR DE LEITO MÓVEL COM
BIOFILME: EFEITO DA SALINIDADE**

Simone Maria Ribas Vendramel

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador(es): Márcia Walquíria de Carvalho
Dezotti
Geraldo Lippel Sant'Anna Junior

Rio de Janeiro
Outubro de 2009

NITRIFICAÇÃO DE EFLUENTE INDUSTRIAL EM REATOR DE LEITO MÓVEL COM
BIOFILME: EFEITO DA SALINIDADE

Simone Maria Ribas Vendramel

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti, D.Sc.

Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Júnior, Dr. Ing.

Prof^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Prof^a. Magali Christe Cammarota, D.Sc.

Prof. Hugo Moreira Soares, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
OUTUBRO DE 2009

Vendramel, Simone Maria Ribas

Nitrificação de efluente industrial em reator de leito móvel com biofilme: efeito da salinidade/ Simone Maria Ribas Vendramel. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XI, 214 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Geraldo Lippel Sant'Anna Junior

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2009.

Referências Bibliográficas: p. 176-202.

1. Nitrificação. 2. Biofilmes. 3. MBBR. I. Dezotti, Márcia Walquíria de Carvalho *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof^a. Márcia Dezotti e Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr.

À Márcia, primeiramente pela oportunidade de trabalhar no LABPOL e, principalmente, pela amizade, incentivo e preocupação sempre demonstrados.

Ao Geraldo, primeiro por ter aceitado me orientar mesmo depois de aposentado e, na sequência, por todo apoio, conhecimento e carinho transmitidos sempre tão prontamente.

Ao Eduardo pelo amor, incentivo, amizade e compreensão.

Aos meus Pais por me proporcionarem ter chegado até aqui.

Às amigas que conquistei nesta longa caminhada, Ale, Dani, Mi e Carol, sendo que cada uma contribuiu de maneira especial na minha vida e serão minhas eternas companheiras.

À Simone Lorena, companheira de trabalho e muito mais, uma amiga/irmã que chegou a mim para suavizar os momentos mais difíceis e tornar melhores os momentos de tranquilidade.

A todos os colegas que passaram pelo LABPOL e alguns que permanecem, nos meus 5 anos de intensa vivência neste laboratório. Em especial ao Antônio, por todos os efluentes coletados e por sempre atender prontamente às minhas solicitações. A Bruna pela ajuda e os cuidados com o meu material de trabalho. Ao Claudinei pela sugestão do isolamento das bactérias e o auxílio na realização deste procedimento.

Aos colegas do laboratório de Bioprocessos que sempre contribuíram com o empréstimo de reagentes e equipamentos.

À Soledad Chamorro e Victor Campos que me receberam na Universidad de Concepción no Chile e hoje são grandes amigos. Gracias a ustedes.

À Juliana do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Microbiologia do CCS-UFRJ, que foi solícita em me passar todo o conhecimento necessário para a aplicação da técnica de FISH assim como fez todas as visualizações das lâminas no microscópio de fluorescência. Ao Prof. Ulysses, responsável por este laboratório, que me permitiu trabalhar com a Juliana e utilizar todas as suas instalações sempre que necessário.

Ao Toni do Laboratório de Robótica do Programa de Engenharia Elétrica, que desenvolveu a automação do sistema e foi sempre solícito em atender aos meus chamados. Ao Prof. Fernando Lizarralde que foi o responsável pelo projeto da automação.

Aos colegas do CEFET pela ajuda e compreensão quando da minha ausência, especialmente ao Prof. Paulo Assis e Prof. Hudson. À Prof^a. Neusa por passar as amostras de efluente no CG-MASSAS.

Aos funcionários administrativos do PEQ, em especial à Paulinha e ao Arthur.

Ao PEQ pela oportunidade de aprendizado e utilização da sua estrutura.

Ao CNPq pela bolsa de auxílio ao doutorado.

Aos professores Leda, Magali e Hugo por terem aceitado o convite para participar da banca.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

NITRIFICAÇÃO DE EFLUENTE INDUSTRIAL EM REATOR DE LEITO MÓVEL COM BIOFILME: EFEITO DA SALINIDADE

Simone Maria Ribas Vendramel

Outubro/2009

Orientadores: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Geraldo Lippel Sant'Anna Junior

Programa: Engenharia Química

A nitrificação de efluentes da indústria química pode representar alguns desafios devido à presença de compostos inibitórios. Efluentes industriais, além de sua complexidade orgânica podem apresentar níveis variáveis de concentração de sais. A fim de investigar o efeito do sal (NaCl) sobre a nitrificação de um efluente industrial, tratado biologicamente a nível secundário, um reator de leito móvel com biofilme foi operado, em escala de bancada, no modo de bateladas sequenciais. O efluente industrial com teor de cloreto de 0,005% ($m v^{-1}$) foi suplementado com NaCl até 2,0% ($m v^{-1}$). O ciclo de operação do reator consistiu de: enchimento (5 min), aeração (12 ou 24 h), decantação (5 min) e esgotamento (5 min). Um sistema CLP assegurou o funcionamento automático e o controle das variáveis pertinentes ao processo. Dados obtidos a partir de experimentos específicos foram ajustados por um modelo cinético, que considerou as variações na concentração de amônia, nitrito e nitrato. Os resultados indicaram que o desempenho médio da nitrificação não foi influenciado pelo teor de cloreto na faixa de 0,005 a 0,6% ($m v^{-1}$) e manteve-se em torno de 90%. Quando o teor de cloreto foi de 1,2% ($m v^{-1}$), queda significativa na eficiência da nitrificação foi observada, mesmo operando com período de reação de 24 h. Ademais, foi observado efeito negativo do teor de matéria orgânica do efluente industrial na eficiência da nitrificação, o que provavelmente foi causado pela inibição da nitrificação por resíduos químicos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

NITRIFICATION OF AN INDUSTRIAL WASTEWATER IN A MOVING-BED BIOFILM
REACTOR: EFFECT OF SALT CONCENTRATION

Simone Maria Ribas Vendramel

October/2009

Advisors: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Geraldo Lippel Sant'Anna Junior

Department: Chemical Engineering

Nitrification of wastewaters from chemical industries can pose some challenges due to the presence of inhibitory compounds. Some wastewaters, besides their organic complexity present variable levels of salt concentration. In order to investigate the effect of salt (NaCl) content on the nitrification of a conventional biologically treated industrial wastewater, a bench scale moving-bed biofilm reactor was operated on a sequencing batch mode. The wastewater presenting a chloride content of 0.005% ($w v^{-1}$) was supplemented with NaCl up to 2.0% ($w v^{-1}$). The reactor operation cycle was: filling (5 min), aeration (12 or 24h), settling (5 min) and drawing (5 min). Each experimental run was conducted for 3 to 6 months to address problems related to the inherent wastewater variability and process stabilization. A PLC system assured automatic operation and control of the pertinent process variables. Data obtained from selected batch experiments was adjusted by a kinetic model, which considered ammonia, nitrite and nitrate variations. The average performance results indicated that nitrification efficiency was not influenced by chloride content in the range of 0.005 to 0.6% ($w v^{-1}$) and remained around 90%. When the chloride content was 1.2% ($w v^{-1}$), a significant drop on the nitrification efficiency was observed, even operating with a reaction period of 24 h. Also, a negative effect of the wastewater organic matter content on nitrification efficiency was observed, which was probably caused by growth of heterotrophs in detriment of autotrophs and nitrification inhibition by residual chemicals.

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Objetivos	4
2.1	Objetivo Geral	4
2.2	Objetivos Específicos	4
3	Revisão Bibliográfica.....	5
3.1	Aspectos gerais da remoção biológica do nitrogênio amoniacal.....	5
3.2	Nitrificação	10
3.3	Parâmetros que influenciam a atividade nitrificante.....	13
3.3.1	pH e alcalinidade	13
3.3.2	Temperatura.....	14
3.3.3	Oxigênio dissolvido.....	16
3.3.4	Razão carbono/nitrogênio (C/N)	20
3.4	Substâncias que inibem a atividade nitrificante	21
3.4.1	Substratos e intermediários da nitrificação.....	23
3.4.2	Salinidade.....	27
3.5	Desnitrificação.....	36
3.6	Biorreatores em batelada seqüencial (SBR) e biorreatores com biofilme aplicados à remoção do nitrogênio amoniacal	41
3.7	FISH – Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência	52
3.7.1	Breve histórico.....	52
3.7.2	Princípios da técnica de FISH.....	53
3.7.3	Limitações do método.....	55
3.7.4	Aplicações	57
4	Materiais e Métodos.....	61
4.1	Descrição do biorreator de leito móvel com biofilme (MBBR)	61
4.2	Efluente industrial.....	66
4.3	Estratégia de operação do MBBR	67
4.4	Testes cinéticos conduzidos no MBBR.....	69
4.5	Experimentos de desnitrificação em biorreator de leito móvel	70
4.5.1	Descrição da unidade experimental.....	71
4.5.2	Condições operacionais e controles	72
4.6	Caracterização e quantificação do biofilme	72

4.6.1	Quantificação do biofilme por sólidos voláteis.....	73
4.6.2	Quantificação do biofilme por determinação de proteínas e polissacarídeos	74
4.6.3	Caracterização do biofilme por microscopia óptica	78
4.7	Caracterização do biofilme pela técnica de Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH)	78
4.7.1	Cultivo de células controle	78
4.7.2	Obtenção, fixação e hibridização da biomassa	81
4.7.3	As sondas e as condições para a hibridização	82
4.7.4	Observação ao microscópio e aquisição das imagens.....	83
4.8	Métodos analíticos	84
4.8.1	Determinação de nitrogênio como N-NH ₃ , N-NO ₂ ⁻ , N-NO ₃ ⁻	84
4.8.2	Determinação de cloreto.....	86
4.8.3	Determinação da demanda química de oxigênio	86
4.8.4	Determinação de carbono orgânico dissolvido.....	87
4.8.5	Determinação de sólidos suspensos totais e voláteis	87
5	Resultados e Discussão	89
5.1	Caracterização do efluente industrial.....	89
5.2	Condições operacionais	91
5.3	Apresentação dos regimes operacionais.....	105
5.4	Testes cinéticos conduzidos no MBBR.....	115
5.5	Experimentos de desnitrificação em biorreator de leito móvel	132
5.6	Caracterização e quantificação do biofilme	13636
5.6.1	Quantificação do biofilme pela determinação de sólidos voláteis.....	13737
5.6.2	Determinação do teor de polissacarídeos e proteínas associados ao biofilme	14343
5.6.3	Caracterização do biofilme por microscopia óptica	152
5.7	Caracterização do biofilme pela técnica de Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência	15959
5.7.1	Cultivo das células para validação das sondas de FISH.....	15959
5.7.2	Aplicação da técnica de FISH no biofilme do MBBR.....	16363
6	Conclusões.....	172
7	Referências Bibliográficas	1766
ANEXOS	203

LISTA DE ABREVIATURAS

AOB	Bactérias que Oxidam Amônia
ANAMOX	Oxidação Anaeróbia de Amônia
CANON	Completa Remoção Autotrófica de Nitrogênio via Nitrito
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COT	Carbono Orgânico Total
CO₂	Gás Carbônico
Cl⁻	Íon Cloreto
C/N	Razão Carbono/Nitrogênio
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CSLM	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DQOt	Demanda Química de Oxigênio Total
DQOd	Demanda Química de Oxigênio Dissolvido
EEC	“European Economic Community”
EPS	Substâncias Exopoliméricas
ETEI	Estação de Tratamento de Efluentes Industriais
FA	“Free Ammonia” – Amônia Livre
FNA	“Free Nitrous Acid” – Ácido Nitroso Livre
FEEMA	Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
H⁺	Íon Hidrogênio
HNO₂	Ácido Nitroso
K_La	Coeficiente Global ou Volumétrico de Transferência de Oxigênio
KCl	Cloreto de Potássio
MBBR	“Moving-bed Bio-reactor” – Biorreator de Leito Móvel
N₂	Nitrogênio Gasoso
N₂O	Óxido Nitroso
N-HNO₂	Ácido Nitroso Quantificado como Nitrogênio
N-NH₃	Amônia Quantificada como Nitrogênio

N-NO₂⁻	Nitrito Quantificado como Nitrogênio
N-NO₃⁻	Nitrato Quantificado como Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
Na₂CO₃	Carbonato de Sódio ou Barrilha
Na₂SO₄	Sulfato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH₂OH	Hidroxilamina
NH₃	Amônia
NH₄⁺	Íon Amônio
NO₂⁻	Íon Nitrito
NO₃⁻	Íon Nitrato
NO_x	Óxidos de Nitrogênio
NOB	Bactérias que Oxidam Nitrito
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
O₂	Oxigênio Gasoso
OD	Oxigênio Dissolvido
OLAND	Nitrificação e Desnitrificação Autotrófica via Limitação de Oxigênio
OUR	Taxa de Consumo de Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLS	Polissacarídeos
PTN	Proteínas
RBC	Biodisco
SBR	“Sequential Batch Reactor” – Reator de Bateladas Sequenciais
SHARON	“Single High Activity Reactor Ammonia Over Nitrite”
SND	Nitrificação e Desnitrificação Simultâneas
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
T	Temperatura
TAN	Nitrogênio Amoniacal Total
WHO	“World Health Organization”

1 Introdução

A nitrificação é praticamente consolidada em estações de tratamento de efluentes domésticos, contudo, no caso do tratamento de efluentes industriais, a sensibilidade e a complexidade intrínsecas da nitrificação dificultam sua implantação de maneira estável e satisfatória. Os vários parâmetros que influenciam este processo são freqüentemente reportados, sendo que, recentemente, GRAHAM e colaboradores (2007) chamaram a atenção para a caótica instabilidade da nitrificação. Assim como WAGNER e LOY (2002) atribuíram à nitrificação a condição de “Calcanhar de Aquiles” dos processos biológicos de tratamento de efluentes.

Por conta da complexidade e variabilidade inerente aos efluentes industriais, a possibilidade destes conterem substâncias que venham a inibir a remoção biológica de nitrogênio amoniacal é grande. Várias substâncias orgânicas, algumas em baixíssimas concentrações, já foram reconhecidas como inibidoras da comunidade microbiana nitrificante (ROY e KNOWLES, 1995, BRANDT *et al.*, 2001). Substâncias inorgânicas como metais (HU *et al.*, 2002 e 2004, GRUNDITZ *et al.*, 1998), sais (KARGI e DINCER, 2001, KARGI e UYGUR, 2004, UYGUR, 2006) e os próprios substratos da nitrificação (YOO *et al.*, 1999, YANG *et al.*, 2004, ISAKA *et al.*, 2007) também são apontados como interferentes neste processo. Ademais, mesmo efluentes provenientes do tratamento secundário, ou seja, depois de tratados biologicamente, podem apresentar níveis residuais de poluentes que causam inibição da atividade nitrificante (LUOSTARINEN *et al.*, 2006, DOSTA *et al.*, 2007, BASSIN, 2008, VÁZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2009).

No que se refere especificamente aos efluentes industriais que apresentam salinidade, tem-se os hipersalinos, como a água de produção de petróleo (FREIRE *et al.*, 2001, CAMPOS *et al.*, 2002a), da indústria têxtil (CARLIELL *et al.*, 1998) e de alimentos enlatados (ARTIGA *et al.*, 2008), com teores de salinidade acima de 3,5% (m v⁻¹). Outros efluentes como os de curtume (MUNZ *et al.*, 2008) e da indústria química em geral (YOSHIE *et al.*, 2004, TSUNEDA *et al.*, 2005, BASSIN, 2008) apresentam níveis de salinidade diversos, inferiores a 3,5%. Neste caso, poucos trabalhos têm se dedicado a investigar o efeito destas concentrações salinas na nitrificação. Ademais, efluentes com salinidade acima de 3,5% ou hipersalinos podem ser tratados biologicamente por culturas

halofílicas, porém, estas culturas não são efetivas para concentrações de sal abaixo de 3,0% (WOOLARD e IRVINE, 1995). Portanto, os mesmos são tratados, em geral, em sistemas com organismos não halofílicos e que são adversamente afetados pela salinidade.

A desnitrificação, conforme referenciado na literatura, aparenta ser um processo mais robusto do que a nitrificação (RABAH e DAHAB, 2004a,b). Provavelmente, esta característica está associada aos inúmeros gêneros de bactérias que são capazes de reduzir nitrato a nitrogênio gasoso em ambiente anóxico. A maior ênfase dos estudos sobre a desnitrificação está na busca da melhor fonte externa de carbono (GOMEZ *et al.*, 2000, CERVANTES *et al.*, 2001) e da otimização da razão C/N a ser utilizada (MODIN *et al.*, 2007). Portanto, a nitrificação se constitui em etapa limitante do processo biológico tradicional de remoção total do nitrogênio.

Para superar a inibição causada por compostos orgânicos e os efeitos negativos de sais na nitrificação de efluentes industriais, uma abordagem interessante é a utilização de reatores com biofilme. A biomassa, quando aderida a suportes, permite a manutenção de microrganismos com crescimento lento no interior do biorreator e contribui para a adaptação gradual da comunidade microbiana às condições de estresse no meio reacional. Nesta configuração, uma das tecnologias que tem encontrado aplicação crescente no tratamento biológico de efluentes é a do reator de leito móvel com biofilme (MBBR). Segundo RUSTEN *et al.* (2006), existem mais de 400 unidades de tratamento de efluentes em larga escala que se encontram em operação em 22 países diferentes, sendo estas baseadas nos princípios do MBBR. No entanto, grande parte das aplicações deste biorreator é direcionada à remoção de matéria orgânica, contudo, alguns autores já vislumbram a sua utilização para a nitrificação terciária (SALVETTI *et al.*, 2006, CANTO *et al.*, 2007, XIA *et al.*, 2008).

No Brasil, o limite máximo para o descarte do nitrogênio amoniacal em cursos d'água era de 5 mg L⁻¹ até 2005 e passou para 20 mg L⁻¹ quando a resolução CONAMA nº 357 revogou a CONAMA nº 20. Na Europa e Estados Unidos as agências que regulamentam os padrões de descarte de efluentes industriais exigem limites bem mais restritivos para o descarte de nitrogênio total, os quais se encontram entre 3 e 5 mg L⁻¹ (SEMOM *et al.*, 1997). Contudo, mesmo diante deste largo limite de descarte para o

nitrogênio amoniacal, conforme proposto pela comissão acima citada, a clara complexidade do processo de nitrificação, por muitas vezes, impede que este valor seja alcançado no efluente final.

Neste contexto, é crescente o interesse pela ecologia e microbiologia dos processos de tratamento de efluentes para auxiliar no entendimento da diversidade e da dinâmica das bactérias nitrificantes e sua relação com a eficiência e a estabilidade dos processos biológicos (NOGUEIRA *et al.*, 2002, MOUSSA *et al.*, 2006, HU *et al.*, 2009).

Portanto, o presente trabalho se propõe a investigar a nitrificação de um efluente industrial com crescentes concentrações salinas. Para alcançar tal objetivo optou-se pela utilização da tecnologia MBBR, que poderá auxiliar na mitigação dos diversos fatores que podem inibir o processo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito da concentração salina (até 1,2% m v⁻¹ de cloreto) na nitrificação de um efluente industrial da fabricação de borracha, empregando um biorreator do tipo leito móvel com biofilme (MBBR – “moving-bed biofilm reactor”), operando de modo descontínuo, na forma de bateladas sequenciais.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o desempenho da nitrificação e a possibilidade da desnitrificação, como um tratamento terciário para o efluente industrial no mesmo biorreator, ou seja, no MBBR;
- Avaliar o efeito do pH, OD, matéria orgânica e, da crescente salinidade imposta ao efluente, na eficiência da remoção do nitrogênio amoniacal;
- Quantificar e caracterizar o biofilme desenvolvido no MBBR nas diferentes condições operacionais estudadas;
- Investigar a cinética da nitrificação quanto à variação da concentração salina e da matéria orgânica e, propor um modelo cinético simplificado para representar os perfis de variação dos substratos.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Aspectos gerais da remoção biológica do nitrogênio amoniacal

O nitrogênio desempenha importante papel na constituição das moléculas proteicas, ácidos nucleicos, vitaminas, enzimas e hormônios – elementos vitais aos seres vivos (BRAGA *et al.*, 2005). No caso das unidades de tratamento biológico de efluentes, as quais dependem da atividade microbiana, o nitrogênio é extremamente necessário para o desenvolvimento e manutenção da biomassa ativa, por conta do consumo assimilatório do mesmo. Relata-se que uma bactéria típica contém em torno de 12% de nitrogênio quando se refere à sua massa seca (SCHMIDELL e REGINATTO, 2007).

Por outro lado, quando os ambientes aquáticos apresentam excesso de nitrogênio, seja na forma orgânica, amoniacal, na forma de nitrito ou nitrato, ocorre o desequilíbrio do ambiente, que pode culminar em vários problemas como a eutrofização (VON SPERLING, 1996), a depleção do oxigênio (BERNET *et al.*, 2005), a toxicidade a certos organismos (RUSTEN *et al.*, 2006) e, em alguns casos até ao homem, como é o caso da síndrome do bebê azul (metahemoglobinemia) causada por elevadas concentrações de nitrato na água (BAIRD, 2006).

Desta maneira, por conta destes efeitos aliados às dificuldades que envolvem a remoção biológica do nitrogênio, observa-se grande interesse nestes processos e nos fenômenos que os envolvem. Na literatura as abordagens sobre o assunto são as mais diversas, sendo que os temas de maior interesse versam sobre: o desenvolvimento de processos com elevado desempenho de remoção; os diferentes critérios operacionais, visando menores custos; as cinéticas das reações com o intuito de modelar e simular os processos; a identificação da microbiota envolvida, assim como suas trajetórias metabólicas, entre outros.

Os estudos e pesquisas relacionados aos princípios e fundamentos da nitrificação e da desnitrificação, embora venham sendo realizados desde meados do século passado (ROQUES, 1980), permitiram ampliar de forma lenta o conhecimento em torno deste tema,

o que é perfeitamente justificável em função da complexidade inerente ao tema e das inúmeras variáveis envolvidas no processo. Contudo, crescente interesse no assunto se deu, particularmente, a partir da década de 80, sendo que na década de 90 ocorreu a intensificação da busca por novas estratégias operacionais para a remoção das substâncias inorgânicas nitrogenadas (SCHMIDELL e REGINATTO, 2007). No início da década atual a reclassificação das trajetórias bioquímicas do ciclo do nitrogênio, conforme apresentado na Figura 3.1 (AHN, 2006), abriu um leque de possibilidades no que se refere à conversão de amônia a nitrogênio molecular além de fornecer indícios de quão complexo este processo pode se tornar. Assim, apesar de tantos anos de estudos dedicados à remoção biológica de nitrogênio ainda hoje se instiga o desenvolvimento de pesquisas no tema.

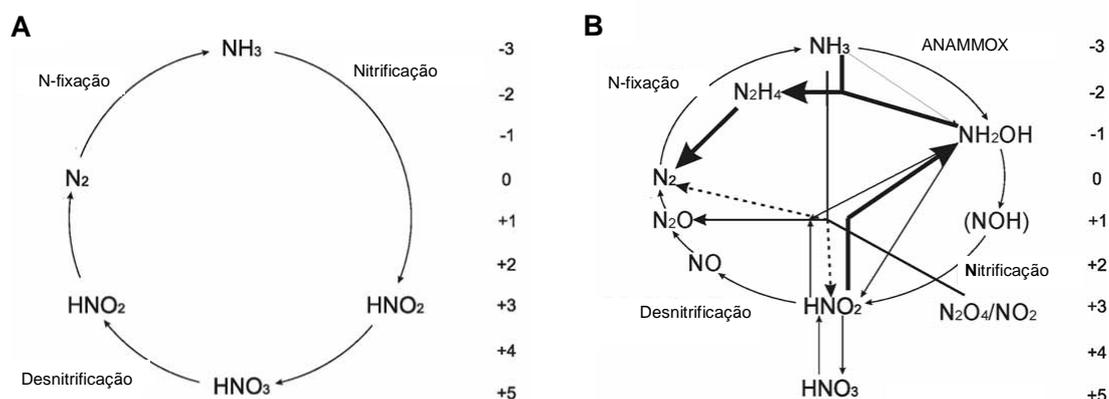


Figura 3.1 – Diversidades do ciclo do nitrogênio. A) Ciclo do nitrogênio clássico; B) Ciclo do nitrogênio reestruturado, adaptado de AHN (2006).

Contudo, as novas possibilidades que surgiram nos últimos anos, em grande parte, são variações do processo de conversão total do nitrogênio amoniacal a partir do nitrito (nitrificação parcial), que diferem da nitrificação convencional, na qual o nitrato é o principal substrato para a conversão a nitrogênio molecular. Ademais, a versatilidade das bactérias nitrificantes revelou-se muito maior do que se supunha até então, com a possibilidade de bactérias heterotróficas e anaeróbias (*Planctomycete*) oxidarem amônia, assim como autotróficas e aeróbias promoverem a desnitrificação (SANT'ANNA JR., no prelo).

Portanto, diversas denominações para estes processos têm sido sugeridas, promovendo certa confusão de quão distintos são os princípios básicos aplicados. Desta maneira, a Tabela 3.1 apresenta algumas das denominações encontradas na literatura e os respectivos fundamentos aplicados para a remoção biológica do nitrogênio.

Tabela 3.1 – Diferentes denominações atribuídas aos processos de remoção biológica do nitrogênio amoniacal.

Denominação	Princípio Básico	Referências
nitrificação parcial	N via nitrito	YE <i>et al.</i> , 2009 YAN e HU, 2009 DONG e SUN, 2007
"shortcut" nitrificação desnitrificação, "shortcut" remoção biológica de nitrogênio	N e D via nitrito	ZHANG <i>et al.</i> , 2009a DOWNING e NERENBERG, 2008
completa remoção autotrófica de nitrogênio, nitrificação desnitrificação autotrófica, CANON	N e D via nitrito	VAZQUEZ-PADIN <i>et al.</i> , 2009, GONG <i>et al.</i> , 2008 SLIEKERS <i>et al.</i> , 2002
SHARON	N via nitrito	HELLINGA <i>et al.</i> , 1998 MOSQUERA-CORRAL <i>et al.</i> , 2005
OLAND	N e D via nitrito	WINDEY <i>et al.</i> , 2005 CLIPPELEIR <i>et al.</i> , 2009
ANAMOX	N anaeróbia e D via nitrito dependente de pré-nitrificação	JETTEN <i>et al.</i> , 1999 SINHA e ANNACHHATRE, 2007
nitrificação e desnitrificação simultâneas (SND)	N e D via nitrito	GUO <i>et al.</i> , 2009, ASLAN e DAHAB, 2008 YOO <i>et al.</i> , 1999
	N e D via nitrato	SARIOGLU <i>et al.</i> , 2009, CANTO <i>et al.</i> , 2007, MEYER <i>et al.</i> , 2005

N - nitrificação e D - desnitrificação

Para que ocorra a conversão completa do nitrogênio nos processos via nitrito, o controle de duas condições operacionais é indispensável: a inibição das bactérias que oxidam o nitrito (NOB) e a adaptação da comunidade microbiana desnitrificante ao NO₂, o qual é considerado tóxico em baixas concentrações (CHUNG e BAE, 2002 *apud* RUIZ *et al.*, 2006, CARRERA *et al.*, 2004).

Portanto, para alcançar satisfatória nitrificação parcial é necessário reduzir seletivamente a atividade das NOB sem afetar as AOB. Desta maneira, diferentes estratégias operacionais vêm sendo utilizadas para promover o acúmulo de nitrito durante a nitrificação, tais como o controle do pH, da temperatura e do oxigênio dissolvido (YOO *et al.*, 1999, YAN e HU, 2009).

O processo conhecido como ANAMOX (oxidação anaeróbia de amônia), por exemplo, é um dos precursores destas novas possibilidades. Seu princípio básico é a oxidação de amônia sob condições anóxicas, tendo o nitrito como acceptor final de elétrons (MOSQUERA-CORRAL *et al.*, 2005) ou a desnitrificação do nitrito tendo a amônia como doador de elétrons (SCHMIDT *et al.*, 2003). O processo ANAMOX requer necessariamente uma pré-nitrificação, pois a atuação das bactérias ANAMOX depende da presença de íons amônio e nitrito na mesma proporção. Portanto, este processo compreende a nitrificação parcial aeróbia, na qual se deve alcançar 50% de conversão de amônia a nitrito, seguida do reator anóxico (processo ANAMOX) no qual estes substratos serão convertidos a nitrogênio molecular (DAPENA-MORA *et al.*, 2004). Contudo, o processo ANAMOX tem um desafio a ser superado, que é o seu tempo de partida. Como nos demais sistemas anaeróbios, o rendimento da biomassa é baixo por conta do crescimento lento das AOB anaeróbias (tempo de duplicação de 7-14 dias) e a adaptação do lodo pode ser demorada, de no mínimo 100 dias (CLIPPELEIR *et al.*, 2009).

SHARON, do inglês “single high activity reactor ammonia over nitrite”, é um dos possíveis processos aplicados em combinação com ANAMOX para alcançar a pré-nitrificação. Neste caso, a seleção positiva das bactérias responsáveis pela oxidação de amônia a nitrito se dá pelo arraste das NOB do interior do biorreator, por estas serem consideradas de crescimento mais lento do que as responsáveis pela nitrificação (AOB). Em geral, este processo permite alcançar 50% de conversão da amônia presente no efluente, no entanto, a temperatura influencia fortemente seu desempenho em condições inferiores a 25 °C (JETTEN *et al.*, 1997).

A combinação da nitrificação parcial com o processo ANAMOX em um único reator tem sido proposta com diferentes denominações, tais como CANON (“completely autotrophic nitrogen removal over nitrite”) e OLAND (“oxygen limited autotrophic nitrification denitrification”). Sob condições de limitação de oxigênio se promove a co-

existência de bactérias aeróbias e anaeróbias que oxidam amônia. Neste caso, o critério operacional para a aplicação destes processos é o controle da concentração de oxigênio dissolvido no meio, sendo necessário não somente por causar inibição irreversível das bactérias ANAMOX para teores de OD de até 0,5%, mas também para promover apropriadas condições operacionais à nitrificação parcial. Nos dois sistemas (CANON e OLAND) a inibição do crescimento das NOB se dá pela baixa afinidade destas bactérias por oxigênio, quando comparadas com as AOB, e pela baixa afinidade por nitrito em relação às ANAMOX (VAZQUEZ-PADIN *et al.*, 2009).

Entretanto, o controle de concentrações muito baixas de oxigênio dissolvido, com o propósito de limitar a velocidade da respiração celular, é complicado, especialmente em termos de operação em larga escala, o que gera dificuldades na implantação destes processos (ZDRADEK, 2005). Ademais, se faz necessário promover adequadas condições para o equilíbrio das comunidades microbianas aeróbias e anaeróbias responsáveis pela oxidação da amônia. A ocorrência de maior atividade das bactérias nitrificantes aeróbias em relação às anaeróbias resulta no acúmulo de nitrito que é inibidor da atividade das bactérias ANAMOX (CLIPPELEIR *et al.*, 2009).

O principal apelo destes novos processos se baseia na eventual economia de energia dado o menor teor de oxigênio necessário ao processo e menor custo operacional com a isenção da adição de fonte externa de carbono, característica da desnitrificação convencional (RUIZ *et al.*, 2003). Porém, os detalhes dos mecanismos destes processos ainda não estão totalmente elucidados (AHN, 2006, VADIVELU *et al.*, 2007). Ademais, promover o acúmulo de nitrito sem alcançar eficiente redução do mesmo pode ser mais prejudicial aos ambientes aquáticos, por conta da sua elevada toxicidade quando comparado com o nitrato (SCHMIDELL e REGINATTO, 2007).

Desta maneira, optou-se no presente trabalho por aplicar os princípios convencionais da nitrificação e da desnitrificação. Sendo assim, breve descrição das características gerais destas duas etapas será apresentada, como segue nas próximas seções.

3.2 Nitrificação

O processo convencional de nitrificação implica basicamente na oxidação quimiolitotrófica de amônia a nitrito e, subsequentemente, de nitrito a nitrato sob condições estritamente aeróbias.

A amônia pode se apresentar sob duas formas no meio aquoso, como o íon amônio (NH_4^+) ou como amônia (NH_3). O equilíbrio entre estas duas formas depende do pH do meio, conforme está ilustrado na Figura 3.2.

Existe certa divergência na literatura sobre qual destas duas formas estaria sujeita à conversão biológica. Grande parte dos trabalhos realizados que envolvem nitrogênio amoniacal considera o íon amônio como a principal forma susceptível à conversão, outros consideram as duas formas e utilizam a denominação TAN (nitrogênio amoniacal total) e alguns poucos sugerem que o NH_3 é o principal substrato da nitrificação (ANTHONISEN *et al.*, 1976, YANG *et al.*, 2007).

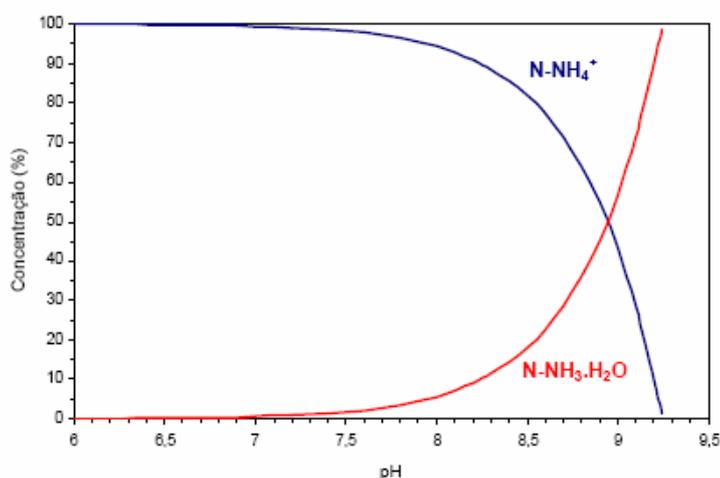
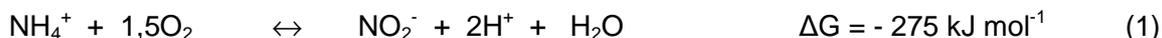


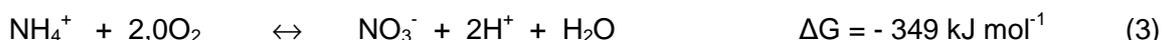
Figura 3.2 – Relação de equilíbrio entre N-NH_3 e N-NH_4^+ em função do pH, adaptado de PRATES (1997) *apud* KIELING (2004).

Contudo, independente de qual a forma de nitrogênio amoniacal que realmente é oxidada, a nitrificação ocorre em duas etapas, conforme apresentado nas equações 1

(oxidação de amônia a nitrito) e 2 (oxidação de nitrito a nitrato), sendo a reação global do processo representada pela equação 3 (SCHMIDT *et al.*, 2003).



Reação Global:



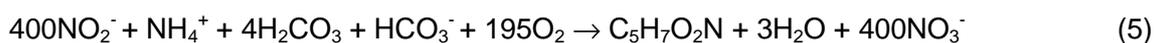
Cada uma destas etapas (eq. 1 e eq. 2) é realizada por gêneros diferentes de bactérias. Essas bactérias, conhecidas generalizadamente como nitrificantes, são autotróficas porque utilizam CO_2 como fonte de carbono. São ainda, quimiolitotróficas, por oxidarem compostos inorgânicos, amônia e nitrito, para obtenção de energia (BROCK *et al.*, 1997). Embora, recentemente, alguns compostos orgânicos tenham sido relatados como possíveis fontes de carbono e energia para estes micro-organismos (SCHMIDT *et al.*, 2003).

O oxigênio molecular participa da reação comoceptor final de elétrons (AHN, 2006). Pela reação global de nitrificação pode-se confirmar a demanda de oxigênio dissolvido exercida para alcançar a total oxidação de amônia em meio aquoso.

Dentre as possíveis bactérias que oxidam amônia (AOB), as mais abundantes são do gênero *Nitrosomonas*, porém *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus* são também, reconhecidamente, capazes de realizar tal oxidação (AHN, 2006). Estes micro-organismos responsáveis pela conversão de amônia a nitrito são geneticamente diferentes, mas todos pertencem ao domínio *Bacteria* e estão classificados dentro da mesma subdivisão β -*Proteobacterias* (ETCHEBEHERE, 2007). Existem também algumas espécies identificadas exclusivamente em ambientes marinhos, *Nitrosococcus marina* e *Nitrosococcus halofila*, que são capazes de realizar a oxidação de amônia e são pertencentes ao grupo γ -*Proteobacterias* (SCHMIDT *et al.*, 2003).

Na etapa de oxidação de nitrito a nitrato, vários gêneros de bactérias como *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrocystis* podem estar envolvidos. Contudo, o gênero mais conhecido de bactéria capaz de oxidar o nitrito é *Nitrobacter*, o qual está geneticamente relacionado à subdivisão α -*Proteobacterias* (AHN, 2006). Há evidências de que *Nitrospira* é o gênero mais específico na oxidação de nitrito, enquanto os outros gêneros são mais versáteis, o que sugere a demanda por muitas pesquisas até que o genoma das NOB seja totalmente esclarecido (SCHMIDT *et al.*, 2003).

As equações 4 e 5 apresentam o rendimento celular e o consumo de oxigênio para as etapas de nitrificação e nitratação, respectivamente (EPA, 1993).



A reação global de síntese e oxidação de amônia pode ser representada pela equação 6.



A EPA (1993) sugere que o fator de conversão de substrato a células, representadas pelo termo $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$, pode variar em uma faixa relativamente ampla, entre 0,06 e 0,20 g SSV g^{-1} N- NH_4^+ oxidado (grama de sólidos suspensos voláteis por grama de nitrogênio amoniacal convertido). SCHMIDELL e REGINATTO (2007) calcularam o rendimento celular para a reação global apresentada na equação 6 e obtiveram o valor de 0,16 g SSV g^{-1} N- NH_4^+ , sendo que a etapa relativa às bactérias do gênero *Nitrosomonas* contribui com 62,5% deste total. Estes baixos valores de conversão observados justificam o crescimento lento das bactérias nitrificantes quando comparadas às heterotróficas, as quais possuem fator médio de conversão da DQO em células aeróbias da ordem de 0,43 g SSV g^{-1} DQO (WIESMANN, 1994).

Para que estas reações de nitrificação ocorram com satisfatório desempenho, alguns parâmetros operacionais do processo devem ser controlados.

3.3 Parâmetros que influenciam a atividade nitrificante

3.3.1 pH e alcalinidade

Como visto na reação global de nitrificação (eq. 3), este processo leva à geração de íons hidrogênio (H^+), resultando no consumo da alcalinidade do meio com provável queda do pH. Em geral, perdas na atividade nitrificante são constatadas quando valores de pH no meio reacional se distanciam da neutralidade (AHN, 2006). Alterações da condição alcalina nos biorreatores influenciam a solubilidade e, por conseqüência, a concentração das substâncias presentes no meio, tais como a própria amônia, nitrito e metais que podem vir a causar a inibição da atividade microbiana (FICA-PIRAS, 2000).

Contudo, há pouca concordância sobre quanto e em que ponto exatamente o pH começa a afetar as taxas de nitrificação (CHEN *et al.*, 2006). A partir de dados compilados da literatura observa-se que o pH ótimo para o crescimento das bactérias nitrificantes varia amplamente e é distinto para *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (ver Tabela 3.2 no final da seção 3.3.3).

Alguns trabalhos sugerem que valores de pH afastados da neutralidade têm alcançado sucesso no desempenho da nitrificação quando é realizada a pré-aclimatação da biomassa presente no sistema. Segundo LOUZEIRO *et al.* (2002) este procedimento pode proporcionar efetiva atividade nitrificante para valores de pH entre 6,0 e 9,0. Porém, para SURAMPALLI *et al.* (1997) valores de pH acima de 9,8 e abaixo de 7,0 reduzem a taxa da reação de oxidação de amônia para pelo menos 50% do seu valor ótimo.

Conforme discutido por VILLAVERDE *et al.* (1997), a faixa ideal de pH para a nitrificação pode ser determinada por três efeitos diferentes que as alterações no pH podem exercer sobre as bactérias nitrificantes: i) ativação ou desativação das AOB e NOB; ii) efeito nutricional associado à alcalinidade; iii) inibição por amônia e ácido nitroso livres. A ativação ou desativação das bactérias pode ocorrer por conta da ligação dos íons H^+ ou OH^- com os grupos ácido-base fracos das enzimas, bloqueando de maneira reversível os seus sítios ativos. A nutrição está relacionada com a disponibilidade de carbono inorgânico que é a fonte de carbono para os micro-organismos autotróficos. Esta disponibilidade é controlada pelo equilíbrio químico ($CO_3^{-2} \rightarrow HCO_3^- \rightarrow CO_2$) que depende

fortemente do pH. Para valores baixos de pH, o CO_2 é a forma predominante e será eliminado por arraste pela aeração do meio, o que resultaria na escassez de alcalinidade e, em pH elevado, o carbono inorgânico será transformado na sua maior parte em carbonato, sendo a maioria dos carbonatos insolúveis e dificilmente assimiláveis. Por outro lado, amônia e nitrito, que servem como fonte de energia para os micro-organismos responsáveis pela sua oxidação, podem inibir a atividade biológica nitrificante quando presentes na sua forma não ionizada, NH_3 livre e HNO_2 livre. Embora estes três efeitos ocorram simultaneamente, a inibição por amônia livre é considerada a mais importante e, portanto, será discutida em seção a parte no presente trabalho.

3.3.2 Temperatura

Outro parâmetro operacional de importância para a otimização da nitrificação é a temperatura. A cinética das reações que envolvem as bactérias nitrificantes pode ser influenciada pela temperatura, basicamente de três maneiras: pela alteração da conformação estrutural das enzimas, por interferências nas funções básicas dos micro-organismos e por alteração na velocidade de difusão do substrato nas células (KRAUSE, 2006).

É de conhecimento comum que o aumento da velocidade das reações biológicas é proporcional à elevação da temperatura, respeitando o limite fisiológico das células. O processo de nitrificação não foge à regra e obedece à lei de Arrhenius, portanto, a atividade nitrificante aumenta com o acréscimo da temperatura. A velocidade de crescimento específica máxima de bactérias do gênero *Nitrosomonas* é significativamente menor do que as do gênero *Nitrobacter* no intervalo de temperatura de 10 a 20°C, no entanto, para temperaturas acima de 20°C a velocidade de crescimento de *Nitrosomonas* supera a de *Nitrobacter*. A taxa de oxidação de amônio foi calculada por QIAO e colaboradores (2009). Dos resultados obtidos, observou-se que, a partir de 20°C, para cada 10°C de acréscimo na temperatura do meio reacional, ocorre o aumento da ordem de 5,7 e 2,2 vezes nas velocidades de oxidação da amônia e do nitrito, respectivamente. A energia de ativação para o processo de conversão da amônia foi apresentada como sendo 120 e 48 kJ mol^{-1} para faixas de 10 a 20°C e 20 a 30°C, respectivamente. Contraditoriamente, YAN e HU (2009) concluíram que existe apenas uma condição de energia de ativação, igual a 42 kJ mol^{-1} , na velocidade de oxidação da amônia para

temperaturas entre 15 e 35°C. Portanto, QIAO *et al.* (2009) consideram que a extensão do efeito da temperatura sobre a nitrificação ainda está por se verificar.

RAMALHO (1983) relatou que a temperatura influencia fortemente a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal, sugerindo que a temperatura ótima para a nitrificação convencional estaria na faixa de 28 a 32°C. Complementou ainda que a atividade nitrificante pode ser significativamente comprometida em temperaturas abaixo de 15°C e que a nitrificação se torna impraticável quando as temperaturas são inferiores a 5°C. Na mesma linha, seguem as colocações de LOUZEIRO *et al.* (2002), os quais sugerem que a faixa de temperatura ótima de trabalho para os micro-organismos nitrificantes varia de 35 a 42°C.

Para estabelecer os limites de temperatura aceitáveis na operação de um reator em batelada seqüencial (SBR), com o objetivo de promover a nitrificação e a desnitrificação, OBAJA *et al.* (2003) conduziram seus experimentos avaliando diferentes temperaturas aplicadas ao sistema (de 8 a 30°C). A partir dos resultados obtidos observaram que de 16 a 30°C não ocorreu diferença significativa no desempenho da nitrificação (96,3 a 99,8% de eficiência de remoção para N-NH₄⁺). Por outro lado, a velocidade de consumo do substrato foi mais lenta para as temperaturas abaixo de 18°C (< 26 mg N g⁻¹ SSV h⁻¹) e apresentou acréscimo para 30°C (> 37 mg N g⁻¹ SSV h⁻¹), permanecendo constante entre 18 e 25°C (30 mg N g⁻¹ SSV h⁻¹). Como conclusão geral, os autores consideraram que a nitrificação pode ser conduzida em temperaturas acima de 16°C sem grandes alterações no seu desempenho e que, abaixo deste ponto, o rendimento do processo pode tornar-se inaceitável para a maioria das aplicações em escala real.

HEAD e OLESZKIEWICZ (2004) avaliaram alterações na eficiência da nitrificação quando reatores do tipo SBR foram submetidos a quedas repentinas de temperatura. Observaram diminuição considerável da extensão da nitrificação e que a diminuição no desempenho do processo foi maior quando o diferencial de temperatura (10°C) foi aplicado às condições de temperatura mais elevadas. Os resultados apresentados mostraram perdas de eficiência em torno de 58%, 71% e 82% para temperaturas da ordem de 20°C, 25°C e 30°C, respectivamente.

O efeito da temperatura sobre a taxa de nitrificação foi estudado por SALVETTI *et al.* (2006) em dois MBBRs (biorreatores com biofilme em leito móvel) alimentados com esgoto doméstico secundário. Um dos reatores operou sob condições limitantes de amônia (R1) e outro sob limitação de oxigênio (R2). Os autores observaram que as taxas de nitrificação no R1 não foram influenciadas significativamente pelas alterações de temperatura no meio reacional (entre 10 e 28°C) enquanto que, sob limitação de OD, o efeito foi mais pronunciado. Temperaturas entre 23 e 28°C promoveram melhores condições de penetração do oxigênio no biofilme. Destes resultados, concluiu-se que o projeto de MBBRs para nitrificação deve levar em consideração o efeito da temperatura somente quando sua operação estiver sujeita à limitação de oxigênio.

3.3.3 Oxigênio dissolvido

Como na nitrificação convencional as bactérias envolvidas são estritamente aeróbias, o oxigênio dissolvido (OD) no meio pode tornar-se o fator limitante para o desempenho do processo. METCALF e EDDY (2003) relataram que as comunidades nitrificantes requerem concentrações de OD de no mínimo 1,0 mg L⁻¹, sendo que o oxigênio se torna significativamente limitante para níveis de OD menores do que este. Sistemas de lodos ativados, quando projetados para remoção de carbono e de amônia, conjuntamente, requerem níveis mínimos de OD mais elevados, ou seja, superiores a 2,0 mg L⁻¹ (LOUZEIRO *et al.*, 2002).

A concentração crítica de oxigênio depende das características da biomassa, da taxa total de respiração e das resistências difusionais à transferência de massa. Por exemplo, no caso dos biofilmes, nos quais a resistência ao transporte de massa é maior, o nível de oxigênio dissolvido deverá ser mais elevado (FICA-PIRAS, 2000).

Perfis de oxigênio dissolvido no interior de biofilmes heterotróficos-autotróficos foram investigados por ZHANG *et al.* (1995), utilizando microeletrodos. Os resultados apontaram para a clara diminuição de OD na camada superficial do biofilme, assim como na região mais próxima do suporte. Estes resultados foram similares para três tipos de biofilme investigados, indicando a provável resistência difusional na camada mais externa e na mais interna da biomassa aderida, o que influencia diretamente as velocidades de oxidação de amônia e nitrito.

A demanda teórica por oxigênio, requerida de acordo com a equação estequiométrica para a nitrificação convencional (eq. 6 previamente apresentada), é de aproximadamente 4,58 mg O₂ para cada grama de nitrogênio amoniacal total oxidado a nitrato, sendo 3,43 mg O₂ para a oxidação de 1,0 mg de N-NH₃ e 1,14 mg O₂ para a oxidação de 1,0 mg de N-NO₂⁻. Dados compilados da literatura por CHEN *et al.* (2006), para culturas puras de bactérias nitrificantes, mostraram que a velocidade de crescimento de *Nitrosomonas*, em geral, não é influenciada por alterações na concentração de OD para valores acima de 1,0 mg L⁻¹. No caso de *Nitrobacter* este valor é de 2,0 mg L⁻¹, evidenciando que as bactérias que oxidam nitrito são mais sensíveis às condições de OD no meio reacional do que as que oxidam amônia.

RUIZ *et al.* (2006) investigaram a nitrificação e desnitrificação via nitrito em biorreatores distintos acoplados em série. O parâmetro utilizado para promover a nitrificação parcial foi o oxigênio dissolvido. Com pH e temperatura fixados, os autores observaram que a nitrificação convencional não foi significativamente afetada para valores de OD entre 1,7 e 5,7 mg L⁻¹. O acúmulo de nitrito só foi observado para concentrações abaixo de 1,4 mg L⁻¹. A melhor condição para a nitrificação parcial, sem afetar a remoção de amônia, foi alcançada na faixa de 0,7 - 1,4 mg OD L⁻¹. Os autores relataram que a conversão de amônia foi afetada para valores de OD inferiores a 0,5 mg OD L⁻¹ e elegeram a concentração de 1,1 mg OD L⁻¹ como a condição ideal para alcançar a nitrificação seguida da desnitrificação, via nitrito.

GAO *et al.* (2009) avaliaram o efeito do excesso de aeração no processo de nitrificação e desnitrificação via nitrito em um SBR. Após 2 meses de operação estável do SBR, alcançando 96% de acúmulo de nitrito durante a etapa de nitrificação parcial, o acréscimo na concentração de OD (0,2 até 7,2 mg L⁻¹) provocou a queda do acúmulo de nitrito no meio em 67 pontos percentuais, direcionando o processo para a nitrificação convencional. Por conta da efetiva oxidação de nitrito a nitrato observada, sugeriu-se que um pequeno grupo de NOB foi resistente às condições de baixa concentração de oxigênio aplicadas durante o período de operação em que a nitrificação parcial foi estável.

Embora os parâmetros pH, T e OD tenham sido apresentados até o momento, separadamente, as evidências apontam para o fato de que em poucos casos a nitrificação será influenciada apenas por um destes fatores, até porque a alteração de um deles, em

geral, influencia o outro. Desta maneira, alguns trabalhos têm investigado o efeito conjunto destes três parâmetros no desempenho da nitrificação.

Como exemplo, apresenta-se o estudo realizado por YAN e HU (2009) que teve como objetivo avaliar as características da nitrificação parcial associada à biodegradação da matéria orgânica com biomassa imobilizada em alginato de sódio. Dentro deste escopo foi investigada a influência dos parâmetros pH, OD e T no desempenho do processo. Ótima atividade das AOB com satisfatória inibição das NOB foi verificada para pH igual a 8,0, tendo sido observadas pequenas alterações de desempenho entre 6,0 e 8,5. A nitrificação parcial foi acelerada em temperaturas na faixa de 15 a 35°C, com o aumento gradual da concentração de nitrito e remoção de DQO, assim como o decréscimo da concentração de amônia no meio reacional. Para valores acima de 35°C este comportamento inverteu-se, sugerindo que esta seria a temperatura ideal para o processo. O máximo desempenho para a nitrificação parcial, aliado à remoção de DQO, foi alcançado quando OD esteve compreendido entre 4,2 e 4,6 mg L⁻¹. Segundo os autores, o efeito da temperatura e do pH sobre a nitrificação parcial foi claramente minimizado por conta da utilização da biomassa imobilizada, quando comparada com a biomassa em suspensão, porém, o efeito do oxigênio dissolvido continuou sendo significativo.

A compilação de resultados da literatura a respeito da influência da temperatura, pH e OD na remoção de nitrogênio amoniacal pode ser observada na Tabela 3.2. As condições apresentadas referem-se à condição ótima de trabalho alcançada conforme o objetivo pretendido. A diversidade dos valores apresentados ocorre por conta das distintas possibilidades de configuração dos sistemas, como tipo de reator empregado, característica da biomassa (em suspensão, aderida em leito fixo, aderida em leito móvel, imobilizada), efluente empregado e, principalmente, estratégia de remoção do nitrogênio que está se buscando.

Tabela 3.2 – Compilação dos dados da literatura no que se refere às melhores condições de pH, OD e T para alcançar a remoção biológica de nitrogênio amoniacal.

T (°C)	pH	OD (mg L ⁻¹)	Objetivo	Biomassa	Referência
25			SNDVN	suspensão	GAO <i>et al.</i> , 2009
25	8	1,2 - 1,9	NP	suspensão	JUBANY <i>et al.</i> , 2009
18	-	-	NP	biofilme em leito fixo	QIAO <i>et al.</i> , 2009
35	8	4,2 - 4,6	NP + RMO	imobilizada	YAN <i>et al.</i> , 2009
21	7,5	> 2,5	NDVN	biofilme em leito fixo	ASLAN e DAHAB, 2008
15 – 22	7,0 - 8,0	1,5 - 2,5	SNDVN + RMO	biofilme em leito móvel	XIA <i>et al.</i> , 2008
-	7,9 - 8,5 (AOB) 7,5 - 8,3 (NOB)	-	NDC	suspensão	PARK <i>et al.</i> , 2007
35	8	0,3 - 0,5	NP	suspensão	SINHA e ANN., 2007
15 – 20	-	-	NDC	biofilme em leito fixo	JEONG <i>et al.</i> , 2006
30	7,8 - 7,9	0,7 - 1,4	NDVN	suspensão	RUIZ <i>et al.</i> , 2006
23 – 28	-	-	NC	biofilme em leito móvel	SALVETTI <i>et al.</i> , 2006
30 – 35	7,5 - 8,0	3,0 - 4,0	NC	-	HENZE <i>et al.</i> , 2002
16 – 30	-	-	NDC	suspensão	OBAJA <i>et al.</i> , 2003
> 28	7,5 - 8,0	> 1,0	NC	-	METCAL e EDDY, 2003
20 – 25	8,0 (AOB)	> 1,0	NP	biofilme em leito fixo	VILLAVARDE <i>et al.</i> , 1997
25 – 35	7,5 - 9,0	> 2,0	NDC + RP	suspensão	SURAMPALLI <i>et al.</i> , 1997
35 (AOB) 35 - 42 (NOB)	7,5 - 8,5	-	NC	-	EPA, 1993

NP – nitrificação parcial; NC – nitrificação convencional; SND – nitrificação e desnitrificação simultâneas; NDC – nitrificação e desnitrificação convencional; NDVN – nitrificação e desnitrificação via nitrito; SNDVN – nitrificação e desnitrificação simultâneas via nitrito; RMO – remoção de matéria orgânica; RP – remoção de fósforo.

3.3.4 Razão carbono/nitrogênio (C/N)

A relação carbono/nitrogênio (C/N) presente nos biorreatores possui influência direta na dinâmica das comunidades microbianas autotróficas e heterotróficas presentes no mesmo.

Conforme previamente apresentado, a taxa de crescimento das bactérias nitrificantes é consideravelmente inferior a das heterotróficas e a sua constante de afinidade por oxigênio é muito menor (MATSUMOTO *et al.*, 2007). Segundo FICA-PIRAS (2000), nestas condições o arraste ou a inibição dos micro-organismos que oxidam amônia e nitrito em reatores de mistura, especialmente para biomassa em suspensão, é inevitável para elevadas razões C/N. Este fato conduz à queda na eficiência ou ao colapso total do processo de nitrificação.

Resultados observados por HU *et al.* (2009) constataram que altos valores da razão C/N induziram à competição desfavorável das AOB em relação às bactérias heterotróficas no que se referiu ao consumo de oxigênio, com conseqüente redução na conversão de amônia.

A competição entre bactérias heterotróficas e nitrificantes por substratos, oxigênio e espaço é de importante relevância no que se refere aos estudos da remoção biológica de nutrientes, em particular para biofilmes. De acordo com estudos prévios, esta competição resulta na estratificação da microbiota presente na estrutura dos biofilmes. O crescimento mais acelerado das bactérias heterotróficas favorece a sua distribuição na camada superficial da biomassa aderida, onde a concentração dos substratos é maior, enquanto as nitrificantes crescem e permanecem no interior do biofilme. Esta camada de heterotróficas que se forma acima das AOB e NOB constitui uma desvantagem, principalmente quando os substratos e/ou oxigênio encontram-se em baixas concentrações no seio do líquido, resultando em perdas no desempenho da nitrificação (NOGUEIRA *et al.*, 2002).

XIA *et al.* (2008) utilizaram técnicas de biologia molecular para avaliar a distribuição das AOB e das NOB em relação às bactérias heterotróficas para diferentes razões C/N. Foi utilizado para esta finalidade um reator compacto com biomassa aderida do tipo MBBR. Dos resultados obtidos, observou-se que a proporção

nitrificantes:heterotróficas, aproximadamente de 1:10, decresceu com o aumento da razão C/N (Figura 3.3). KINDAICHI *et al.* (2004) *apud* XIA *et al.* (2008) mostraram que para biofilmes autotróficos a proporção nitrificantes:heterotróficas foi em torno de 1:1, sendo que AOB e NOB foram quantificadas em 28 e 22% do total de micro-organismos presentes no biofilme.

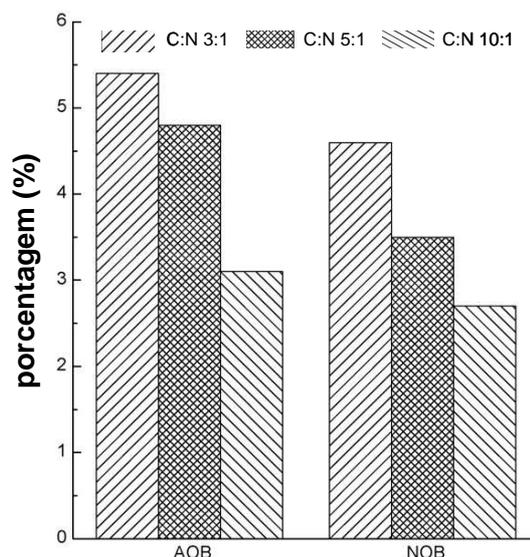


Figura 3.3 – Densidade de AOB e NOB em relação à densidade de heterotróficas para três razões C/N (3/1, 5/1, 10/1), adaptado de XIA *et al.* (2008).

Além da influência que os parâmetros operacionais (pH, T, OD) e a razão C/N podem exercer sobre a nitrificação, existem várias substâncias que reconhecidamente interferem no processo, muitas vezes podendo levar à inibição completa da conversão de amônia. Estas possíveis substâncias inibidoras podem ser os próprios substratos da reação, metais pesados, sais e certos compostos orgânicos, conforme serão apresentados a seguir.

3.4 Substâncias que inibem a atividade nitrificante

É de conhecimento comum que metais pesados, assim como compostos orgânicos, em geral recalcitrantes, podem causar efeitos adversos sobre a microbiota característica dos processos biológicos de tratamento de efluentes. Por conta do limitado grupo de bactérias que são capazes de promover a nitrificação, somado ao fato de serem

considerados de crescimento lento, este processo biológico específico está ainda mais susceptível à possível inibição causada por compostos tóxicos (JONSSON *et al.*, 2000). O grau de toxicidade destas substâncias sobre a comunidade microbiana vai depender, sobretudo, da concentração e, no caso dos metais, também da especiação destas substâncias, além da fase de crescimento das bactérias e da concentração de biomassa (PRINCIPI *et al.*, 2006).

Alguns metais, quando presentes em baixas concentrações no meio, podem agir como micronutrientes para a microbiota, resultando em ação benéfica. Porém, se apresentam altas concentrações, podem formar, inespecificamente, compostos complexos no interior das células, levando à sua ruptura (ARICAN e YETIS, 2003 *apud* PRINCIPI *et al.*, 2006).

GRUNDITZ *et al.* (1998) avaliaram o efeito inibitório de diferentes metais na atividade de três culturas puras de bactérias responsáveis por três etapas distintas da remoção total de nitrogênio amoniacal: oxidação da amônia, oxidação e redução do nitrito. Significativo efeito inibitório foi observado para as três culturas. A oxidação do nitrito foi a que mostrou maior sensibilidade aos metais avaliados (Cr, Ni, Cu, Zn, Pb e Cd), sendo que zinco foi o que apresentou maior efeito inibitório em todos os casos.

Os possíveis efeitos inibitórios de níquel e cádmio na nitrificação também foram estudados por HU *et al.* (2002). Concentrações de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ni e Cd inibiram significativamente a atividade das AOB, resultando em perdas da eficiência de conversão de amônia da ordem de 30 e 70% para os respectivos metais.

No que diz respeito aos inibidores orgânicos, tem-se relatado que existem vários compostos de difícil biodegradação como fenol (MUNZ *et al.*, 2008), tiouréia, anilina, entre outros que interferem negativamente na atividade nitrificante (COELHO, 1998). Entretanto, por conta das dificuldades envolvidas no cultivo das AOB, há ainda pouca informação sobre os efeitos das substâncias químicas tóxicas na fisiologia geral destas bactérias (BRANDT *et al.*, 2001).

Tem-se conhecimento de que surfactantes compreendem um grupo muito importante de compostos potencialmente tóxicos, que se acredita serem prejudiciais

devido ao rompimento da função e da estrutura da membrana celular. Pela comparação de culturas isentas com as adicionadas de surfactante, BRANDT *et al.* (2001) observaram que o crescimento celular foi progressivamente inibido com o incremento da concentração de surfactante para quatro cepas de AOB investigadas. Dos resultados obtidos, sugeriu-se que a toxicidade por surfactantes ocorreu pela direta interação dos monômeros do surfactante com a estrutura da parede celular dos micro-organismos. O possível mecanismo desta ocorrência é o aumento da permeabilidade da membrana que causa a dissipação do gradiente iônico e do potencial da membrana ou a perda dos constituintes celulares essenciais.

BASSIN (2008) evidenciou o forte efeito inibitório de compostos orgânicos recalcitrantes, presentes em um efluente da indústria química, no processo de nitrificação. Apenas após o pré-tratamento do efluente com carvão ativado em pó foi possível promover a nitrificação, chegando a alcançar 90% de eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal.

3.4.1 Substratos e intermediários da nitrificação

Vários trabalhos têm abordado a possível inibição das bactérias nitrificantes por amônia e nitrito livres no meio reacional, assim como por hidroxilamina (produto intermediário da nitrificação em condições específicas de operação). Amônia e nitrito livre são as porções não ionizadas destes compostos presentes no meio líquido, sendo o equilíbrio entre eles regulado pelo pH. Serão adotadas nesta discussão as siglas oriundas do inglês FA (free ammonia) para NH_3 livre e FNA (free nitrous acid) para HNO_2 livre.

ANTHONISEN *et al.* (1976) foram os precursores dos estudos referentes à inibição da nitrificação por FA e FNA. Estes autores observaram que os substratos dos dois grupos microbianos envolvidos na nitrificação, amônia e nitrito, podem gerar efeitos inibitórios sobre as bactérias envolvidas no processo, dependendo da concentração presente. A oxidação da amônia, com conseqüente diminuição do pH, é um fator que leva à diminuição de amônia livre, principal inibidor da ação de bactérias do gênero *Nitrobacter* no meio reacional. Porém, observações da inibição das NOB sem a presença de FA deram indícios de que as mesmas também seriam sensíveis ao ácido nitroso, o qual apresenta concentrações crescentes em relação ao nitrito conforme ocorre o decréscimo do pH no meio. ANTHONISEN *et al.* (1976) confirmaram em seus estudos que para certas

concentrações de FA e FNA, bactérias tanto do gênero *Nitrosomonas* quanto do gênero *Nitrobacter* são inibidas. Contudo, espécies do gênero *Nitrobacter* mostraram-se mais sensíveis do que *Nitrosomonas* na presença de FA, sendo que a inibição das AOB foi observada para concentrações de 10 a 150 mg NH₃ L⁻¹, enquanto 0,1 a 1,0 mg NH₃ L⁻¹ foram suficientes para inibir a atividade das NOB. A atividade das AOB e das NOB foi afetada por ácido nitroso livre em concentrações de 0,22 a 2,8 mg HNO₂ L⁻¹. Os autores chamaram a atenção de que o efeito inibitório destas substâncias na nitrificação pode aumentar ou diminuir dependendo da condição de alguns fatores operacionais como aclimação da biomassa, temperatura e quantidade de micro-organismos nitrificantes ativos. Por conta destas possibilidades, ANTHONISEN e seus colaboradores identificaram possíveis faixas de concentração de FA e FNA inibitórias da nitrificação e montaram diagramas para a determinação das concentrações de amônia e ácido nitroso livres, para diferentes condições de pH e temperatura. Por conta disto, estes autores são freqüentemente citados na literatura.

A investigação da nitrificação parcial no processo SHARON foi realizada por MOSQUERA-CORRAL *et al.* (2005), os quais utilizaram os cálculos propostos por ANTHONISEN *et al.* (1976) para determinar as concentrações de FA e FNA que poderiam estar inibindo a ação das AOB. Os autores desconsideraram os possíveis efeitos destas substâncias sobre as NOB por não ter sido identificada a formação de nitrato em qualquer momento da operação, indicando que não houve crescimento das bactérias que oxidam nitrito por conta dos tempos de retenção hidráulica aplicados, que foram eficientes no arraste destes micro-organismos do interior do biorreator. As concentrações que causaram inibição na atividade das bactérias que oxidam amônia foram calculadas e resultaram em 10 e 0,2 mg L⁻¹ de FA e FNA, respectivamente.

VADIVELU *et al.* (2007) investigaram o efeito inibitório da amônia livre no metabolismo das bactérias do gênero *Nitrobacter*. Vários ensaios em batelada foram realizados para medir a taxa de consumo de oxigênio (OUR) em vários níveis de FA, na presença e ausência de carbono inorgânico (CO₂, HCO₃⁻, CO₃²⁻). Os resultados mostraram que a respiração foi inibida para baixas concentrações de FA (< 1,0 mg N-NH₃ L⁻¹), sendo que a taxa de respiração celular foi reduzida para 12 e 25%, respectivamente, no que se refere à ausência e presença do carbono inorgânico. FA mostrou forte efeito inibitório no anabolismo de *Nitrobacter*. Embora não seja possível, a partir destes estudos,

comprovar este efeito inibitório, os dados experimentais indicam fortemente que *Nitrobacter* provavelmente deixou de crescer em concentrações de FA entre 6 e 9 mg N-NH₃ L⁻¹. Os autores concluíram que o trabalho desenvolvido mostrou a necessidade de estudos fisiológicos para revelar o mecanismo de inibição de FA no metabolismo microbiano e, sugeriram, ainda, que o anabolismo e o catabolismo deveriam ser investigados separadamente. A Tabela 3.3 sumariza dados da inibição de *Nitrobacter* e *Nitrosomonas* por amônia e ácido nitroso livres (FA e FNA), apresentados por VADIVELU *et al.* (2007).

Tabela 3.3 – Sumário dos dados de inibição de FA e FNA sobre *Nitrobacter* e *Nitrosomonas*, adaptado de VADIVELU *et al.* (2007).

	<i>Nitrobacter</i>		<i>Nitrosomonas</i>	
	Anabolismo	Catabolismo	Anabolismo	Catabolismo
FNA	provável inibição completa em 0,02 mg N-HNO ₂ L ⁻¹	nenhuma inibição até 0,04 mg N-HNO ₂ L ⁻¹	provável inibição completa em 0,4 mg N-HNO ₂ L ⁻¹	inibição de 50% entre 0,40 e 0,63 mg N-HNO ₂ L ⁻¹
FA	provável inibição completa acima de 6,0 mg N-NH ₃ L ⁻¹	inibição de 12% entre 6,0 e 9,0 mg N-NH ₃ L ⁻¹	nenhuma inibição até 16 mg N-NH ₃ L ⁻¹	nenhuma inibição até 16 mg N-NH ₃ L ⁻¹

Com a proposta de validar um modelo cinético para a nitrificação, PARK e BAE (2009) investigaram os efeitos inibitórios da amônia e ácido nitroso não ionizados na atividade nitrificante. Os autores relataram que o efeito da inibição de FA pode ser considerado insignificante para condições ácidas (pH em torno de 6,0), a menos que as concentrações de nitrogênio amoniacal sejam extremamente elevadas (acima de 10.000 mg N L⁻¹ para AOB e 2.000 mg N L⁻¹ para NOB). Da mesma maneira, a influência inibitória de FNA pode ser desconsiderada para condições alcalinas, pH acima de 8,0. Contudo, próximo ao pH neutro, tanto FA quanto FNA têm efeito significativo na atividade das nitrificantes. Durante ensaios realizados em batelada, observou-se a predominância do efeito inibitório de FA no início da reação, sendo que a partir de 100 min o efeito de FNA prevaleceu até o final (Figura 3.4). No período inicial da batelada quando a concentração de FA estava mais alta, a razão das taxas específicas de consumo dos substratos para NOB foi menor do que 0,1, porém aumentou gradativamente com o decréscimo de FA, chegando a 0,6 em 100 min e, posteriormente, manteve-se no patamar de 0,45 com o

aumento da concentração de FNA. O decréscimo do pH (8,0 para 6,8), aliado à conversão eficiente de amônia, foram responsáveis pelo aumento do teor de FNA no meio reacional, que resultou no acúmulo de 95% de nitrito mesmo quando NH_3 livre e NH_4^+ não foram mais detectados. A inibição simultânea por FA e FNA sugere que a taxa específica de máxima utilização do substrato pelas NOB é reduzida significativamente pelos substratos não ionizados e os produtos da reação.

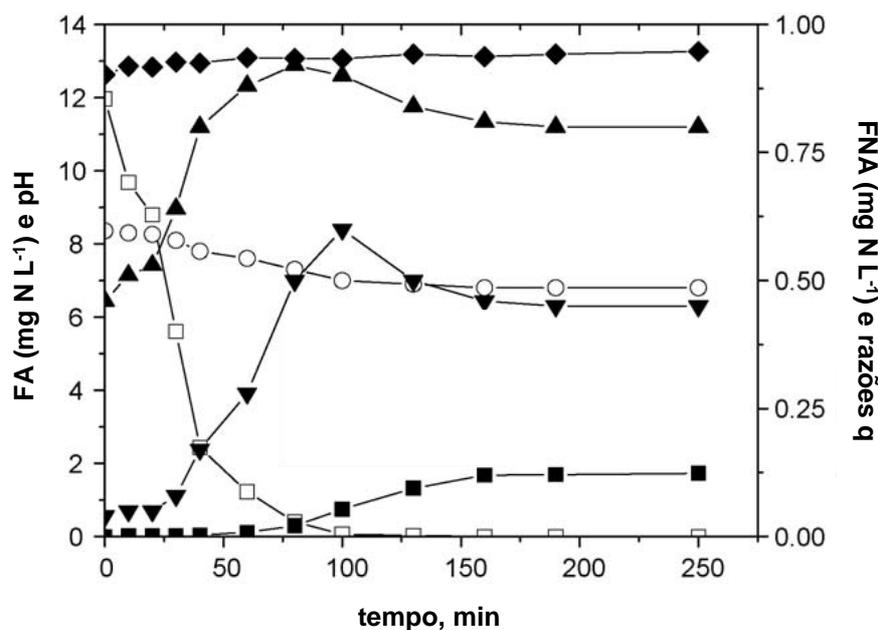
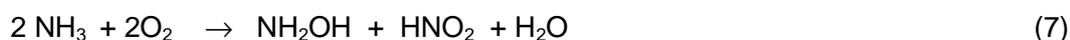


Figura 3.4 – Resultados do ensaio realizado em batelada para avaliar o efeito inibitório de FA e FNA na nitrificação, (\square)FA, (\circ)pH, (\blacksquare)FNA, (\blacklozenge) NO_2/NO_x , (\blacktriangle) q_1 e (\blacktriangledown) q_2 são razões das taxas específicas de consumo dos substratos para AOB e NOB, respectivamente; símbolos sólidos (ordenada da direita), símbolos vazados (ordenada da esquerda), adaptado de PARK e BAE (2009).

A possível formação de hidroxilamina (NH_2OH) como intermediário da reação de oxidação de amônia, pela ausência de OD suficiente no biorreator, é uma discussão interessante. Este composto seria responsável pelo acúmulo de nitrito no meio, por conta da inibição das bactérias *Nitrobacter*.

A hidroxilamina é formada de acordo com a seguinte reação global (COELHO, 1998):



Portanto, o nível de OD sozinho não seria o fator dominante por trás do acúmulo do nitrito, mas sim a presença de hidroxilamina livre ou não ionizada, a qual teria relação efetiva com a baixa atividade das NOB. Supõe-se que o efeito inibitório causado pela presença de NH_2OH livre, seja devido à sua capacidade de penetração através da membrana citoplasmática das bactérias do gênero *Nitrobacter*. Este composto, então, inibiria a enzima nitrito redutase, responsável pela oxidação do nitrito a nitrato, contudo, este mecanismo de inibição ainda não foi totalmente esclarecido (YANG e ALLEMAN, 1992).

3.4.2 Salinidade

A salinidade, quando presente em elevadas concentrações, pode causar estresse osmótico nas células microbianas em qualquer tipo de tratamento biológico de efluentes. Como consequência observam-se significativas perdas de eficiência no desempenho dos processos e alteração na cinética de biodegradação. Ademais, elevadas concentrações salinas podem levar à lise celular, causando acúmulo de sólidos nos biorreatores.

No entanto, há certo conflito, reportado na literatura, no que diz respeito ao grau de influência que o sal exerce sobre os processos biológicos. Alguns estudos mostram os efeitos adversos que a crescente salinidade ou choques de NaCl podem causar no desempenho destes processos, assim como em que extensão a aclimação gradual da biomassa pode minimizar estes efeitos (HAMODA e AL-ATTAR, 1995).

Os principais problemas observados no tratamento biológico de efluentes salinos foram sumarizados por KARGI e DINCER (2000), sendo eles:

- Adaptação limitada da biomassa: culturas convencionais não podem ser efetivamente utilizadas para tratar efluentes com teor de salinidade acima de 3,0%, mesmo com aclimação gradual da biomassa;
- Sensibilidade a mudanças na força iônica: alterações na concentração de sal de 0,5 a 2,0% geralmente causam distúrbios no desempenho do sistema. A mudança abrupta nos teores de sal leva a efeitos mais adversos do que o incremento gradual da concentração salina nos processos biológicos;
- Redução da cinética de biodegradação: taxas de biodegradação diminuem com o aumento do conteúdo salino no meio;

- Alta concentração de sólidos suspensos no efluente: elevados teores de NaCl reduzem a população de protozoários, o que influencia na capacidade de sedimentação do lodo. A presença de sal aumenta as forças de empuxo que causam perdas na capacidade de sedimentação.

Como o processo de nitrificação pode ser considerado o mais sensível dentre todas as possibilidades de aplicação dos processos biológicos, as comunidades nitrificantes estão mais sujeitas aos efeitos que as crescentes concentrações salinas podem causar no seu desempenho. Alguns pesquisadores chamam a atenção para o fato de que diferentes teores de salinidade observados nos efluentes influenciam, de forma significativa e às vezes adversa, a eficiência da remoção biológica de nutrientes como o nitrogênio (GLASS e SILVERSTEIN, 1999, CAMPOS *et al.*, 2002b).

CHEN *et al.* (2006) relataram, a partir de diversos estudos realizados, que a capacidade máxima de nitrificação em ambientes salinos foi sempre consideravelmente inferior à obtida em sistemas isentos de sal, mesmo quando submetidos às mesmas condições operacionais. Contudo, estes autores frisaram que estudos realizados no mesmo tema, por outros grupos de pesquisadores, mostraram resultados distintos, tendo-se alcançando taxas de nitrificação similares às observadas em operações livres de sal.

No entanto, poucos pesquisadores têm se dedicado a investigar a influência da salinidade especificamente no processo de nitrificação e, por conseqüência, na desnitrificação. Os pesquisadores KARGI e DINCER são exceção, tendo publicado vários artigos relacionados ao efeito salino sobre os processos biológicos, inclusive para a nitrificação e desnitrificação. Em 1996, estudaram variações de 1 a 5% de NaCl no desempenho de um SBR operado em sistema de batelada alimentada, utilizando efluente sintético. Em 1998, avaliaram a biodegradação orgânica de um efluente sintético com concentração salina entre 0 e 10% em RBC (biodisco). A partir de 1999 iniciaram estudos especificamente dedicados ao efeito inibitório do cloreto de sódio na remoção biológica de nutrientes. Em 2001, investigaram o efeito inibitório do sal sobre a cinética da nitrificação e utilizaram um efluente sintético com concentrações de NaCl variando entre 0 e 5% no processo de lodos ativados. Em 2004, KARGI, em colaboração com UYGUR, estudaram o efeito inibitório do sal (0 a 6% de NaCl) na remoção biológica de nutrientes no SBR.

Dentre todos estes trabalhos, as principais conclusões obtidas em relação à remoção biológica de nitrogênio amoniacal em efluentes salinos foram:

- crescentes concentrações de sal nos efluentes resultaram na diminuição proporcional da capacidade de remoção de nutrientes dos processos biológicos (Figura 3.5);
- concentrações salinas superiores a 3,0% no meio inibiram fortemente a atividade da biomassa presente;
- a sedimentabilidade do lodo, em processos com biomassa em suspensão, foi adversamente afetada pela salinidade, resultando em altos valores de IVL (índice volumétrico do lodo);
- os estudos cinéticos mostraram que ocorreu inibição, pelo efeito do sal, mais pronunciada sobre a constante de saturação do processo de nitrificação, do que sobre a taxa específica de nitrificação (modelo de Monod).

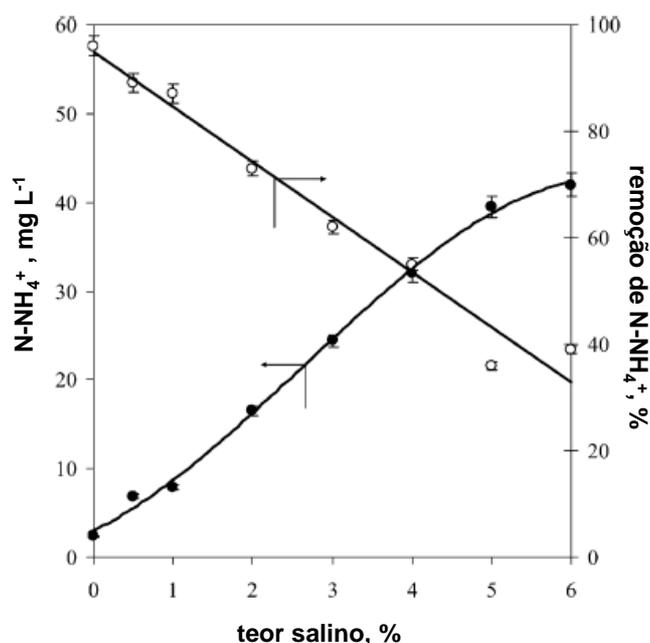


Figura 3.5 – Variação da concentração de N-NH₄⁺ no efluente e sua eficiência de remoção em função do conteúdo de sal no meio, adaptado de KARGI e UYGUR (2004).

Com o intuito de avaliar o desenvolvimento de biofilmes em ambiente salino, ROSA *et al.* (1998) investigaram a aplicação de um biorreator aeróbio de leito fixo submerso no processo de nitrificação. O efluente de estudo foi sintético com 50 g L⁻¹ de

NaCl. Quando o sistema operou continuamente com tempo de retenção hidráulica de 15 horas, foi observada a queda de aproximadamente 50 pontos percentuais na eficiência de remoção de amônia para o efluente salino, quando comparada com a eficiência do efluente isento de sal (94% de eficiência de remoção na ausência de sal e 48% na presença de 50 g sal L⁻¹). A avaliação do biofilme mostrou que a elevada concentração salina do efluente causou mudanças fisiológicas nas células, afetou o seu metabolismo e, conseqüentemente, reduziu a capacidade de remoção da amônia.

PANSWAD e ANAN (1999) investigaram o efeito de vários níveis de salinidade para um sistema anóxico/óxico, na remoção biológica de nitrogênio amoniacal. Em condição de estado estacionário, a taxa específica de oxidação da amônia diminuiu com o aumento da concentração dos íons cloreto. A remoção total de nitrogênio caiu de 85% para 70% com o incremento da concentração salina de 20 para 30 g NaCl L⁻¹. Os autores sugerem que as bactérias nitrificantes e desnitrificantes são muito sensíveis a variações abruptas de sal no meio reacional, até mesmo quando o processo está sob longo período de operação estável.

CAMPOS *et al.* (2002b) estudaram a aplicação do sistema de lodos ativados na nitrificação de um efluente sintético com elevada salinidade e teor de nitrogênio amoniacal. O biorreator operou eficientemente (próximo a 100% de remoção de nitrogênio amoniacal) para cargas de amônia na faixa de 1 a 4 g N-NH₄⁺ L⁻¹ d⁻¹. Para concentrações de sal acima de 525 mmol L⁻¹ (13,7 g NaCl L⁻¹, 19,9 g NaNO₃ L⁻¹ e 8,3 g Na₂SO₄ L⁻¹) observou-se acúmulo de amônia e queda brusca na eficiência da nitrificação, provavelmente devido à sinergia do efeito inibitório dos sais com as elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal. Os resultados obtidos dos testes de atividade mostraram que a biomassa adaptada foi menos sensível às elevadas concentrações salinas aplicadas.

Efeitos da salinidade sobre a remoção do nitrogênio, em um efluente da indústria metalúrgica, foram investigados por TSUNEDA *et al.* (2005). Com este objetivo foi utilizado o sistema de lodos ativados com dois biorreatores (óxico e anóxico) ligados em série para promover nitrificação e desnitrificação da maneira convencional. Os autores observaram que o acréscimo de sal no sistema, de 1,0 a 5,0% em NaCl, implicou na inibição mais acentuada da atividade nitrificante quando comparada à desnitrificação. No biorreator para a oxidação da amônia a eficiência manteve-se em torno de 90% até o

incremento de 2,0% de sal, enquanto na atividade desnitrificante não foi observada diferença significativa mesmo com 5,0% de NaCl no meio reacional. Dos resultados obtidos, concluiu-se que para alcançar eficiência satisfatória na remoção total do nitrogênio, deve-se manter a concentração salina abaixo de 3,0% no sistema de lodos ativados óxido e anóxico.

WINDEY *et al.* (2005) avaliaram o processo de nitrificação e desnitrificação em RBC (biodisco) pelo princípio OLAND. Um efluente sintético foi suplementado com crescentes quantidades de cloreto de sódio até a concentração de 30 g L⁻¹ de NaCl (3,0% m v⁻¹). O reator operou satisfatoriamente durante todo o período experimental. Contudo, a capacidade de remoção do nitrogênio amoniacal, na maior concentração salina, foi 31 pontos percentuais menor quando comparada ao período de referência (isento de sal). Experimentos em batelada foram realizados para investigar o efeito de choques de salinidade no processo. O incremento abrupto de 30 g L⁻¹ de NaCl no sistema causou efetivo decréscimo (43%) na atividade específica de oxidação da amônia via nitrito e perdas mais pronunciadas na atividade específica ANAMOX (96%), quando comparados com a biomassa de referência. No que se refere ao incremento gradual de sal ao meio (3 a 4 semanas) a perda de eficiência da nitrificação foi de 23% e, por sua vez, a diminuição da atividade ANAMOX foi de 58%. Mediante os resultados apresentados os autores concluíram que o processo OLAND possui grande potencial para tratar efluentes salinos com elevadas concentrações de amônia, após a adaptação da biomassa.

O efeito da presença dos sais NaCl, KCl e Na₂SO₄, em diferentes concentrações, na atividade específica de oxidação da amônia foi estudada em ensaios respirométricos por MOSQUERA-CORRAL *et al.* (2005). Os resultados indicaram que os três sais provocaram efeito similar na atividade das AOB em concentrações de até 100 mmol L⁻¹. Desta maneira, experimentos em operação contínua foram conduzidos apenas com NaCl. Foi observado que para o incremento da concentração salina de zero para 85 mmol L⁻¹ de NaCl (0,5% de sal), a conversão de amônia aumentou em 30%, sem qualquer outra alteração nas condições do meio reacional. Somente quando o meio foi suplementado com 342 mmol L⁻¹ de NaCl (2,0% de sal) foram identificadas perdas na atividade nitrificante da ordem de 15%, o que representou 70% de decréscimo no desempenho da nitrificação quando comparado com a condição isenta de sal. Inibição total das AOB ocorreu quando a concentração molar de NaCl foi igual a 513 mmol L⁻¹ (3,0% de sal), com

conseqüente perda da biomassa. Contudo, foi relatado pelos autores que o processo operou sob condições estáveis com 50% de eficiência na conversão do nitrogênio amoniacal a nitrito, para concentrações salinas de até 427 mmol L⁻¹ de NaCl (2,5% de sal). A troca do efluente sintético utilizado nos experimentos apresentados por um efluente do processamento de peixe enlatado, previamente tratado por processo anaeróbio, levou a perdas de 10 a 20 pontos percentuais no desempenho do processo em menos de 10 dias. Sugeriu-se que esta redução foi ocasionada pela presença de matéria orgânica no efluente industrial em concentrações de até 250 mg TOC L⁻¹. Estes resultados evidenciam que a utilização de efluentes sintéticos pode resultar em desempenho significativamente distinto ao observado com efluentes reais.

Segundo MOUSSA *et al.* (2006), estudos sobre o efeito da salinidade na nitrificação são difíceis de comparar e apresentam resultados contraditórios. Esta contradição pode ser atribuída a vários fatores tais como: i) diferentes configurações e instabilidade nas condições experimentais no que se refere à temperatura, pH, presença de compostos ou fatores inibitórios; ii) a forma como o sal é introduzido no sistema, por incremento gradual ou em pulso; iii) pelas espécies envolvidas, o uso de culturas puras ou consórcios microbianos, com adaptação ou não da biomassa. Mediante estes argumentos, MOUSSA e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da salinidade na atividade e composição das bactérias que oxidam amônia e nitrito. Culturas de nitrificantes não adaptadas e adaptadas (10 g Cl⁻ L⁻¹ por um ano) foram cultivadas em reatores SBR com aumento gradual de sal de 5,0 a 40 g Cl⁻ L⁻¹. Em estado estacionário não foi observada diferença significativa entre a biomassa adaptada e a não adaptada. A atividade das AOB e NOB decresceu 36% e 11%, respectivamente, na concentração salina de 10 g Cl⁻ L⁻¹. Para 40 g Cl⁻ L⁻¹ a inibição foi quase total (95%) para ambos grupos de bactérias nitrificantes, tanto no biorreator com adaptação (SBR1) como sem adaptação (SBR2). Após 118 dias de operação foram restabelecidas as condições iniciais de operação nos dois biorreatores, ou seja, SBR2 voltou a operar isento de sal e SBR1 com 10 g Cl⁻ L⁻¹. Este procedimento foi adotado para avaliar a capacidade de recuperação das bactérias nitrificantes depois de submetidas a situações de estresse salino. Foi verificado que após duas semanas nesta nova condição, a comunidade nitrificante no SBR1 recuperou 40% da sua atividade inicial, igualmente para as AOB e para as NOB. No caso do SBR2, a retomada da atividade das NOB foi superior à das AOB, resultando em 53% e 33% de oxidação de nitrito e amônia, respectivamente. Destes resultados, os autores sugerem

que elevadas concentrações salinas promovem apenas a inativação dos microorganismos responsáveis pela nitrificação.

Mediante o exposto pode-se constatar que o efeito inibitório de crescentes concentrações salinas no processo de nitrificação é evidente. Porém, há discrepâncias no que se refere ao grau de inibição que o sal pode causar na microbiota nitrificante, sobretudo pela distinta influência que promove sobre as AOB e as NOB. A Tabela 3.4 sumariza alguns resultados obtidos da literatura para a remoção biológica de nitrogênio em ambientes salinos, na qual estão apresentadas as faixas de salinidade investigadas e os efeitos inibitórios sobre a comunidade microbiana nitrificante.

Tabela 3.4 – Compilação dos dados da literatura no que se refere aos efeitos inibitórios de diferentes concentrações salinas na remoção biológica de nitrogênio amoniacal.

Faixa de sal investigada	Impacto na atividade nitrificante	Sistema	Efluente	Observações gerais	Referências
0,5 - 3,0%	AOB - inibição a partir de 1,0% NOB - inibição desde 0,5% chegando a 95% de inibição com 1,0% de sal	nitrificação parcial em SBR	doméstico	o retorno à condição isenta de sal não mostrou recuperação da atividade nitrificante	YE <i>et al.</i> , 2009
7,4 - 8,4% e 0,2 - 1,5%	até 1,5% de sais (efluente diluído) não foi observada inibição da nitrificação, para o efluente bruto (7,4 – 8,4%) a atividade nitrificante foi completamente inibida	biomassa em suspensão + MBBR + MBR	processamento de peixe enlatado	observou-se boa eficiência na remoção de DQO, mesmo para os teores de sal mais elevados	ARTIGA <i>et al.</i> , 2008
até 4,0%	a partir de 1,0% de sal: AOB - 36% de inibição NOB - 11% de inibição 4,0% de sal, 95% de inibição das AOB e NOB	nitrificação convencional em SBR	sintético	a biomassa adaptada por 1 ano com 1,0% de sal não apresentou diferença significativa nos resultados em relação a biomassa não adaptada	MOUSSA <i>et al.</i> , 2006
até 3,0%	foram avaliadas somente as AOB sal (2,0%) → inibição 15% sal (2,5%) → inibição 50% sal (3,0%) → inibição total	processo SHARON com biomassa em suspensão	sintético	a mudança do efluente sintético para um real alterou de maneira negativa os resultados obtidos	MOSQUERA-CORRAL <i>et al.</i> , 2005
até 3,0%	3,0% de sal 23% de inibição das AOB para biomassa adaptada	processo OLAND em RBC	sintético	o incremento da salinidade sem adaptação da biomassa (3,0%) causou inibição de 43% nas AOB	WINDEY <i>et al.</i> , 2005

Tabela 3.4 – Compilação dos dados da literatura no que se refere aos efeitos inibitórios de diferentes concentrações salinas na remoção biológica de nitrogênio amoniacal (continuação).

Faixa de sal investigada	Impacto na atividade nitrificante	Sistema	Efluente	Observações gerais	Referências
até 6,0%	AOB e NOB sem distinção sal (1,0%) → inibição 10% sal (3,0%) → inibição 30% sal (6,0%) → inibição 88%	nitrificação convencional em SBR	sintético	o decréscimo na atividade nitrificante foi diretamente proporcional ao incremento da salinidade	KARGI e UYGUR, 2004
até 6,0%	maior inibição sobre as AOB do que sobre as NOB		sintético	condições de sal mais brandas (de 6,0 para 2,4%) mostraram capacidade de recuperação da atividade nitrificante	SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2004
até 3,0%	maior inibição sobre as NOB do que as AOB NOB desapareceram a partir de 1,8% de sal	nitrificação convencional em lodo ativado	sintético	o incremento abrupto da salinidade foi mais deletério a atividade nitrificante do que o aumento gradual	CHEN <i>et al.</i> , 2003
até 525 mmol L ⁻¹ (Na ₂ SO ₄ , NaNO ₃ , NaCl)	AOB e NOB sem distinção sal (100 mmol L ⁻¹) → inibição 50% sal (150 mmol L ⁻¹) → inibição 75% > 250 mmol L ⁻¹ → inibição 100%	nitrificação convencional em lodo ativado	sintético	testes em batelada mostraram que a biomassa adaptada foi menos sensível a choques de salinidade	CAMPOS <i>et al.</i> , 2002b
até 5,0%	AOB e NOB sem distinção a partir de 3,0% de sal iniciou a inibição sal (5,0%) → inibição 20%	nitrificação convencional em lodo ativado	sintético	constantes de saturação do modelo proposto para nitrificação foram adversamente afetadas pelo incremento do sal	KARGI e DINCER, 2001
até 3,0%	AOB e NOB sem distinção a partir de 1,0% de sal iniciou a inibição sal (1,8%) → inibição 55%	nitrificação convencional em SBR	sintético	a inibição da biomassa aclimatada foi 25 pontos percentuais inferior a não aclimatada ao sal	PANSWAD e ANAN, 1999

3.5 Desnitrificação

A desnitrificação é o processo biológico complementar à nitrificação quando deseja-se alcançar a remoção total de nitrogênio em efluentes. Por ser um processo de baixo custo, se comparado com os físico-químicos e, por fazer parte do ciclo natural do nitrogênio, também é utilizado para a remoção de nitrato em águas potáveis (WASIK *et al.*, 2001, BABARY e BOURREL, 1999). Concentrações acima de 50 mg L⁻¹ de NO₃⁻ em águas de abastecimento podem ser prejudiciais à saúde humana, sendo este o nível máximo de nitrato permitido em águas limpas conforme WHO (1993) e EEC (1980) *apud* SHIRIMALI e SINGH (2001). Além disso, segundo LAZAROVA *et al.* (1994), a desnitrificação biológica tem provado ser um dos métodos mais avançados em termos de alto desempenho e o único método seletivo para a completa eliminação de nitrato.

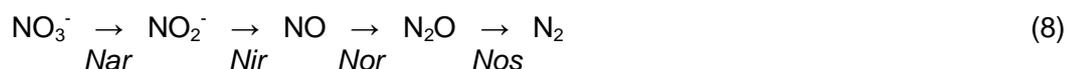
Portanto, a desnitrificação é a redução biológica de nitrito e nitrato a óxido nitroso (N₂O) e nitrogênio molecular (N₂). Conforme relatado por GOMEZ *et al.* (2000), sua significância fisiológica é a geração de ATP por respiração anaeróbia, na qual os íons nitrogenados servem como aceptores finais de elétrons, sendo assim reduzidos e os substratos carbonáceos oxidados a dióxido de carbono (CO₂).

A maioria das bactérias desnitrificantes é heterotrófica e, principalmente, organotrófica (MODIN *et al.*, 2007). Ampla gama de micro-organismos, distribuídos nos três domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, é capaz de realizar a desnitrificação. Em geral, os desnitrificantes são facultativos, em ambientes anóxicos utilizam o nitrato comoceptor final de elétrons, alternativamente ao oxigênio. As bactérias que agem na desnitrificação pertencem a uma grande variedade de grupos fisiológicos e estão filogeneticamente dispersas, localizadas em ramos evolutivos muito diversos (ETCHEBEHERE, 2007).

Os organismos com capacidade de desnitrificar, mais freqüentemente reportados, são as bactérias Gram-negativas pertencentes às sub-classes alfa e beta das *Proteobacterias*. As principais representantes são dos gêneros *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* e *Thiobacillus*. Bactérias, como *Bacillus*, e poucas *Archaeas* halofílicas,

como *Halobacterium*, também são conhecidas por sua capacidade de desnitrificação (AHN, 2006).

Apesar desta diversidade de micro-organismos que são capazes de desnitrificar e a menor sensibilidade desse processo quando comparado com a nitrificação, a desnitrificação não é trivial. O processo desnitrificante envolve quatro enzimas que são seqüencialmente induzidas sob condições anóxicas (MODIN *et al.*, 2007):



As três primeiras enzimas desnitrificantes atuantes, nitrato redutase (*Nar*), que catalisa a redução de nitrato a nitrito, nitrito redutase (*Nir*), que catalisa a formação de óxido nítrico a partir do nitrito e, óxido nítrico redutase (*Nor*), que catalisa a redução de óxido nítrico a óxido nitroso, são mais ativas do que *Nos* (óxido nitroso redutase).

Óxido nitroso redutase, que catalisa a formação de nitrogênio a partir de óxido nitroso, é uma enzima periplasmática na maioria dos micro-organismos estudados e, portanto, é muito mais sensível ao O₂ e às demais condições do ambiente do que as outras três enzimas (PHILIPPOT, 2002 *apud* ETCHEBEHERE, 2007). Esta maior sensibilidade da *Nos* pode muitas vezes levar à inibição da remoção total de nitrogênio, devido à formação de N₂O, em detrimento da obtenção de N₂. Esta possibilidade tem levado alguns autores (TSUNEDA *et al.*, 2005) a avaliarem as causas desta inibição, por conta deste ser um dos gases do efeito estufa. Segundo MOURA e MOURA (2001), o N₂O é o terceiro contribuinte mais significativo para o aquecimento global e, portanto, tem motivado muitos estudos.

Portanto, para evitar a formação de N₂O e proporcionar elevada eficiência do processo de desnitrificação, se faz necessário o controle de alguns parâmetros operacionais tais como: oxigênio dissolvido, pH, razão C/N, acúmulo de nitrito e a natureza da fonte de carbono que, segundo KAMPSCHREUR *et al.* (2009), são condições ambientais primárias, as quais regulam a atividade e a síntese das enzimas envolvidas no processo.

Sendo as bactérias desnitrificantes facultativas em relação à utilização de oxigênio dissolvido no meio, elevadas concentrações de OD não são tóxicas a estes micro-organismos. Porém, a questão energética favorece a utilização de O₂ comoceptor final de elétrons em detrimento dos íons NO₃⁻. Portanto, para alcançar a desnitrificação convencional é necessário trabalhar com baixíssimas concentrações de oxigênio ou de preferência sob condições anóxicas. Conforme apresentado por SURAMPALLI *et al.* (1997), concentrações de OD superiores a 1,0 mg L⁻¹ inibem a desnitrificação.

Alguns pesquisadores têm se dedicado a investigar a possibilidade da nitrificação/desnitrificação simultâneas (SND), que trata da ocorrência da desnitrificação no mesmo ambiente aeróbio da nitrificação. Ainda não existe consenso sobre quais são os mecanismos que prevalecem neste fenômeno, os físicos ou os microbiológicos. A principal explicação física seria que a simultaneidade dos processos ocorre no interior dos flocos da biomassa, como resultado da diminuição da concentração de OD por limitações difusionais (PUZNAVA *et al.*, 2000), ou seja, há micro-ambientes anóxicos no interior dos flocos do lodo ou no interior dos biofilmes, que permitem a ocorrência da desnitrificação heterotrófica com a produção de gás nitrogênio, da forma tradicional. A explicação microbiológica para o fenômeno é que as bactérias desnitrificantes possuem variedade fisiológica muito maior do que a prevista (TONKOVIC, 1998 e LITTLETON *et al.*, 2002). Sugere-se que alguns micro-organismos responsáveis pela SND seriam autotróficos (HELMER e KUNST, 1998), dispensando, neste caso, a necessidade de uma fonte de carbono externa facilmente assimilável. HOLMAN e WAREHAM (2005) observaram em seus estudos que significativa SND foi alcançada em concentrações muito baixas de OD (0,2 mg L⁻¹), enquanto em concentrações mais altas (acima de 1,0 mg L⁻¹) a desnitrificação foi fortemente inibida. Embora seja interessante promover a nitrificação e a desnitrificação no mesmo ambiente, ainda existem muitas dúvidas sobre os mecanismos envolvidos e a real efetividade deste processo.

YOO *et al.* (1999), a partir de dados compilados da literatura, relataram as possíveis vantagens da SND via nitrito, que é uma das possíveis justificativas para a ocorrência da nitrificação/desnitrificação simultânea. Estas vantagens podem ser enumeradas conforme segue:

- redução da demanda de matéria orgânica para a etapa de desnitrificação;
- maior taxa de desnitrificação;

- menor produção de lodo na etapa anóxica;
- aparente inexistência de toxicidade do nitrato aos micro-organismos;
- redução do consumo de oxigênio.

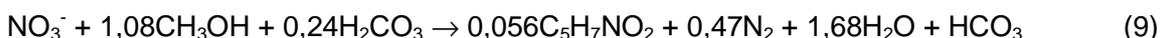
Em relação ao pH, a faixa ótima para o eficiente desempenho das bactérias desnitrificantes se encontra provavelmente entre 6,0 e 9,0, conforme apontado por SURAMPALLI *et al.* (1997) e KARGI e DINCER (2000).

Apesar do controle do pH, OD e da temperatura ser importante para alcançar a desnitrificação, a natureza da fonte de carbono e a sua razão em relação ao nitrogênio a ser removido têm sido exaustivamente estudada devido à sua relevância para o processo.

Como a desnitrificação em unidades de tratamento ocorre, na maioria das vezes, na etapa terciária, subentende-se que a porção orgânica biodegradável do efluente já tenha sido consumida, impedindo assim o satisfatório crescimento das bactérias desnitrificantes organotróficas. Desta maneira, há necessidade de se suplementar o processo com fontes externas de carbono para propiciar a desnitrificação. Em alguns casos se trabalha com a recirculação do próprio efluente para suprir esta necessidade, sendo que esta é uma tendência, devido à busca por redução nos custos. Porém, a natureza da fonte de carbono tem marcante efeito no desempenho da desnitrificação.

Vários compostos orgânicos têm sido objeto de estudo no intuito de alcançar a melhor eficiência do processo com a menor razão C/N. CERVANTES *et al.* (2001) relataram que metanol, etanol e ácido acético são os principais compostos utilizados neste contexto. No entanto, outras opções têm sido propostas como: glicose (KARGI e UYGUR, 2003) e lodo hidrolisado (ÆSØY *et al.*, 1998).

AHN (2006) sugere a equação 9 para síntese e redução do nitrato a partir do metanol, chamando a atenção para o fato deste composto ser muito utilizado como doador de elétrons na desnitrificação por ser relativamente barato e eficiente.



Nesta equação, são requeridos teoricamente 2,47mg de CH₃OH por mg de N-NO₃⁻.

HALLIN e PELL (1998), em seus estudos sobre propriedades metabólicas das bactérias desnitrificantes em lodos ativados, constataram que a utilização de acetato como fonte suplementar de carbono tem gerado as mais altas taxas de desnitrificação. Porém, na prática, tem-se dado preferência à utilização do metanol pelo seu menor custo.

A equação 10 representa a redução de nitrato a partir de acetato, incluindo a síntese celular de micro-organismos e foi sugerida por MATEJU *et al.* (1992) *apud* CHIU e CHUNG (2003).



Teoricamente, 1,0 g de N-NO₃⁻ consome 3,51 g de acetato para produzir 0,55 g de novas células e 0,82 L de N₂. A razão C/N ótima neste caso seria igual a 3,74.

KARGI e UYGUR (2003) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono (acetato de sódio, glicose e acetato-glicose na proporção 1:1) na remoção de nitrogênio de um efluente sintético. Observaram que a melhor eficiência de remoção do nitrato se deu quando foi utilizado acetato-glicose (1:1) como fonte de carbono e que o pior desempenho ocorreu quando se adicionou apenas glicose.

ÆSØY *et al.* (1998) investigaram a eficiência de lodo hidrolisado como fonte de carbono para a desnitrificação, em comparação com etanol, utilizando um reator de leito fixo empacotado. Praticamente a mesma taxa de desnitrificação máxima, de 2,5 kg de N-NO₃⁻ m⁻³ d⁻¹ foi alcançada tanto para o etanol como para o lodo hidrolisado. Porém, os resultados mostraram que a razão de 8 a 10 g DQO/g N-NO₃⁻ no afluente foi requerida para alcançar a desnitrificação quando utilizado o lodo hidrolisado, enquanto para o etanol esta razão foi de 4,5 g DQO/g N-NO₃⁻, ou seja, o etanol resultou na menor demanda por oxigênio (em torno de 50%), em relação ao lodo hidrolisado, para alcançar a mesma atividade desnitrificante.

Pelo que se apresenta na literatura, metanol, etanol e acetato são as principais fontes de carbono utilizadas para a desnitrificação. A escolha de qual delas deve ser utilizada é mais uma questão de conveniência, já que todas levam ao bom desempenho do processo.

O efeito de várias razões C/N no processo de nitrificação e desnitrificação tradicional foi investigado por HU *et al.* (2009). Para a realização dos experimentos foram utilizados frascos agitados com efluente sintético adicionado de acetato de sódio (fonte externa de carbono) e biomassa aderida em anéis de polipropileno. Dos resultados obtidos pode-se constatar que a taxa específica de oxidação da amônia diminuiu com o incremento na razão C/N, sobretudo para as razões mais elevadas (C/N = 8, 16). Em contrapartida, a taxa de redução do nitrato no meio líquido foi de 23%, 16%, 33% e 90% para razões C/N iguais a 0,5, 1, 2 e 4, respectivamente, sendo que para as razões 8 e 16 nitrato não foi detectado. A evidente influência do carbono orgânico na oxidação de amônia e nitrito e redução do nitrato levaram os autores a sugerir que as nitrificantes não são capazes de competir por oxigênio com as heterotróficas na camada externa do biofilme, permanecendo ativas somente no seu interior. Portanto, as bactérias responsáveis pela nitrificação estariam sujeitas à limitação de OD e, conseqüentemente, necessitariam de mais tempo para alcançar desempenho satisfatório.

3.6 Biorreatores em batelada seqüencial (SBR) e biorreatores com biofilme aplicados à remoção do nitrogênio amoniacal

Vários processos de tratamento estão disponíveis para a remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuárias. A escolha entre eles depende das características do efluente, da concentração de amônia no mesmo e, principalmente, de questões econômicas. Em geral, efluentes que possuem baixas concentrações de amônia, de até 50 mg L⁻¹ de N-NH₄⁺, concentração típica de efluentes domésticos (CAMPOS *et al.*, 2002b), alcançam os padrões de descarte menos restritivos, quando tratados por processos biológicos convencionais (ex. lodos ativados). Acima destas concentrações, e quando a legislação ambiental é mais rigorosa, processos específicos para a remoção de amônia precisam ser empregados.

Os tratamentos propostos para esta finalidade podem ser divididos em físico-químicos e biológicos. Dentre os físico-químicos, para a remoção de amônia, destacam-se o processo de arraste por ar, mais conhecido por “stripping” de amônia e a adsorção em carvão ativado. Para a remoção de nitrato destacam-se as tecnologias com membranas: osmose inversa e eletrodíálise (MANSELL e SCHROEDER, 1999; WASIK *et*

al., 2001) além da troca iônica. Porém, estes processos são limitados por conta do elevado custo operacional e subsequente problema de disposição dos resíduos altamente nitrogenados gerados (SHIRIMALI e SINGH, 2001). Ademais, estes processos propiciam apenas a mudança de fase do poluente e não a sua remoção completa.

O tratamento biológico é o mais empregado, principalmente por ser a tecnologia que requer menor investimento quando comparado aos demais (WANG *et al.*, 2006) e, na maioria das vezes, ser o mais eficiente no que diz respeito à remoção total do nitrogênio (METCALF e EDDY, 2003). Contudo, a remoção biológica de nitrogênio amoniacal pelo método convencional de nitrificação e desnitrificação é o processo que compartilha os mesmos princípios do ciclo natural do nitrogênio. Este é um dos motivos pelo qual a desnitrificação é o método mais recomendado quando se trata de água para o consumo humano (BABARY e BOURREL, 1999).

Tradicionalmente, o processo de nitrificação e concomitante remoção de matéria orgânica são obtidos em sistemas de lodos ativados, porém, a remoção total de nitrogênio amoniacal, via desnitrificação, dificilmente é alcançada. Para alcançar este objetivo o sistema precisa operar com dois ou mais reatores em série, sendo no mínimo um aeróbio e outro anóxico (desnitrificação). Desta maneira, a necessidade de determinadas razões C/N no meio, indispensável para se alcançar a desnitrificação, torna necessária a adição de fonte externa de carbono na fase anóxica ou a recirculação do efluente entre os reatores anóxico e óxico, além da característica recirculação do lodo. As razões de reciclo utilizadas tornam, muitas vezes, o sistema complexo e de difícil otimização. Além disso, o processo está sujeito aos problemas comuns aos sistemas de lodo ativado tais como arraste do lodo e sensibilidade aos choques de carga, além de demandar grandes volumes de reação (YANG *et al.*, 2003).

Uma variação do processo de lodos ativados, a qual é muito bem aceita para promover a nitrificação/desnitrificação, é o reator de batelada seqüencial (SBR). Suas vantagens em relação ao método convencional podem ser enumeradas (MACE e MATA-ALVAREZ, 2002, AKIN e UGURLU, 2005, BOOPATHY *et al.*, 2007):

- menor custo que os tratamentos biológicos convencionais;
- requer áreas menores para implantação, por ser um processo compacto;
- possui elevada flexibilidade operacional;

- é capaz de suportar choques de carga hidráulica e orgânica;
- facilita o controle de problemas de sedimentação;
- requer menor atenção operacional e menos equipamentos envolvidos;
- reduz o arraste da biomassa do sistema.

A flexibilidade característica dos reatores tipo SBR favorece a otimização do processo, assim como permite variações na estratégia operacional, tornando-se ótima ferramenta para o estudo da biodegradação de diferentes efluentes. Como o SBR opera no modo de bateladas seqüenciais, apresenta variação temporal de suas condições operacionais, ou seja, as condições do meio variam com o tempo, contrariamente aos sistemas contínuos (COELHO, 1998).

O princípio básico de operação dos reatores de batelada seqüencial está baseado no fato de que todas as etapas pertinentes às unidades de tratamento biológico de efluentes ocorrem em um único reator. O ciclo operacional completo do SBR envolve as seguintes etapas: alimentação, reação, decantação e descarga ou esgotamento. Nestas etapas podem ser previstas fases anóxicas e óxicas durante a reação, assim como diferentes estratégias de alimentação. O tempo total de ciclo e os tempos parciais de cada etapa são determinados caso a caso, dependendo da finalidade para a qual o processo está sendo proposto. Por conta das características propícias à remoção biológica de nutrientes (nitrogênio e fósforo), tem sido extensivamente aplicado para esta finalidade, conforme pode ser observado na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Trabalhos que utilizaram a tecnologia de SBR para a remoção de nutrientes.

Objetivo principal	Efluente	Referências
nitrificação e desnitrificação simultânea via nitrito	doméstico	GUO <i>et al.</i> , 2009
desenvolvimento de grânulos aeróbios para remoção de nutrientes	sintético	BAO <i>et al.</i> , 2009
investigar a característica dos grânulos nitrificantes	sintético	BELMONTE <i>et al.</i> , 2009
avaliar a estabilidade da "shortcut" nitrificação e desnitrificação	industrial ¹	GAO <i>et al.</i> , 2009
balanço das AOB e NOB no processo OLAND	sintético	CLIPPELEIR <i>et al.</i> , 2009
desenvolvimento de grânulos no processo CANON	Industrial ²	VAZQUEZ-PADIN <i>et al.</i> , 2009
investigar a dinâmica das AOB e NOB na nitrificação convencional	sintético	WHANG <i>et al.</i> , 2009
estudo da influência de sais na nitrificação parcial	doméstico	YE <i>et al.</i> , 2009
investigar a dinâmica das AOB e NOB na nitrificação convencional	sintético	WITTEBOLLE <i>et al.</i> , 2009
estudo da inibição da nitrificação por FA e FNA	sintético	PARK e BAE, 2009
comparar o desempenho da nitrificação somente em ambiente aeróbio e em anóxico/aeróbio	sintético	DYTCZAK <i>et al.</i> , 2008
modelagem da remoção completa de nitrogênio via nitrito	industrial ³	DOSTA <i>et al.</i> , 2007
modelagem da nitrificação visando sua dependência com o pH	sintético	PARK <i>et al.</i> , 2007
estudo da inibição das nitrificantes por FA	sintético	VADIVELU <i>et al.</i> , 2007
estudo da nitrificação convencional em flocos e grânulos	sintético	CARVALHO <i>et al.</i> , 2006
investigação do acúmulo de nitrito e granulação das AOB	sintético	KIM e SEO, 2006
efeito da salinidade na nitrificação convencional	sintético	MOUSSA <i>et al.</i> , 2006
efeito da salinidade na remoção de nutrientes	sintético	UYGUR, 2006

Tabela 3.5 – Trabalhos que utilizaram a tecnologia de SBR para a remoção de nutrientes (continuação).

Objetivo principal	Efluente	Referências
monitorar e controlar a remoção biológica de nitrogênio	sintético	AKIN e UGURLU, 2005
investigar a nitrificação/desnitrificação simultânea e a remoção de fósforo	sintético	MEYER <i>et al.</i> , 2005
modelar e investigar o crescimento de heterotróficos e autotróficos	sintético	MOUSSA <i>et al.</i> , 2005
remoção de nutrientes, nitrogênio e fósforo	suinocultura	CASSIDY e BELIA, 2005
investigar a nitrificação e desnitrificação simultânea	sintético	HOLMAN e WAREHAM, 2005
estudar o efeito da salinidade na desnitrificação e emissão de N ₂ O	sintético	TSUNEDA <i>et al.</i> , 2005
avaliação de distintos ciclos operacionais na remoção de nutrientes	chorume pré-tratado	KARGI e UYGUR, 2004
remoção de nutrientes, nitrogênio e fósforo	suinocultura	OBAJA <i>et al.</i> , 2003
remoção de nitrogênio e matéria orgânica com lodo granular	sintético	YANG <i>et al.</i> , 2003
completa remoção autotrófica de nitrogênio via nitrito	sintético	SLIEKERS <i>et al.</i> , 2002
controle em linha da remoção biológica convencional de nitrogênio	industrial ⁴	ANDREOTTOLA <i>et al.</i> , 2001
remover nitrogênio amoniacal via nitrificação e desnitrificação convencional	suinocultura	BERNET <i>et al.</i> , 2000
efeito da salinidade na desnitrificação	sintético	GLASS e SILVERSTEIN, 1999
nitrificação e desnitrificação simultânea	sintético ⁵	WOOLARD e IRVINE, 1995

¹efluente do processamento do leite de soja; ²efluente tratado em digestor anaeróbio com diluição; ³efluente tratado em digestor anaeróbio; ⁴efluente do processamento de madeira; ⁵efluente sintético simulando água de produção de petróleo.

Ultimamente a larga utilização de reatores com biomassa aderida também tem instigado a sua aplicação para a remoção de nutrientes. A imobilização natural do biofilme permite excelente retenção e acúmulo da biomassa sem a necessidade de dispositivos

para a separação e manutenção dos sólidos nos biorreatores. Por conta de suas características propícias para a retenção da biomassa de maneira simples, confiável e estável, processos com biofilme como “trickling filters” e filtros biológicos aerados (PERSSON *et al.*, 2002, ROWAN *et al.*, 2003, CHEN *et al.*, 2005), biodiscos ou RBCs (WYFFELS *et al.*, 2003, WINDEY *et al.*, 2005), reatores com leito fluidizado, reatores com biofilme em leito móvel ou MBBR e reatores com membranas submersas (LI *et al.*, 2006, MATSUMOTO *et al.*, 2007, AHMED *et al.*, 2008, ZHANG *et al.*, 2009a, SARIOGLU *et al.*, 2009), têm sido empregados para remover nutrientes e outros poluentes dos efluentes domésticos e industriais. O acerto do melhor desempenho no tratamento biológico destes efluentes consiste em saber como os micro-organismos envolvidos vão responder às diferentes condições operacionais (XIA *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm aplicado a configuração dos reatores “airlift” associada à estratégia da biomassa aderida para promover e investigar os processos da nitrificação e da desnitrificação. CAMPOS *et al.* (2003) utilizaram esta configuração de biorreator para tratar um efluente sintético contendo uréia e formaldeído. A alimentação de 500 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ resultou em ótimo desempenho nitrificante, sendo afetado somente quando ocorreram choques de carga orgânica. GARRIDO *et al.* (1997) avaliaram a produção de óxido nítrico (N₂O) durante o processo de desnitrificação utilizando o reator “airlift” com biofilme prioritariamente autotrófico. Aplicando carga amoniacal de 5,0 kg N-NH₄⁺ m⁻³ d⁻¹ obtiveram conversões de 99% de amônia, porém, o acúmulo de N₂O no sistema sugeriu ocorrência de inibição das enzimas responsáveis pela produção de N₂ e que, portanto, a desnitrificação completa não foi alcançada nesta configuração de biorreator. KIM e KIM (2006) estudaram a cinética de oxidação do nitrito e a competição entre *Nitrobacter* e *Nitrospira* na nitrificação. Com este objetivo utilizaram o reator “airlift” e basalto granulado como suporte para o crescimento da biomassa. Em outro trabalho, KIM *et al.* (2006), fazendo uso do mesmo tipo de biorreator tendo areia como suporte, investigaram o efeito da temperatura e da amônia livre na nitrificação de lixiviado de aterro sanitário. Em geral, os autores consideraram que as características deste tipo de configuração, com alta taxa de aeração e mistura, favorecem a sua aplicação para o estudo e remoção de nutrientes como o nitrogênio amoniacal.

O tradicional processo de leito fluidizado é empregado no tratamento biológico de poluentes, também associado à utilização de minerais para o crescimento do biofilme.

RABAH e DAHAB (2004a,b) trabalharam com areia como suporte no reator de leito fluidizado com o objetivo de caracterizar a comunidade microbiana aderida e investigar o desempenho deste biorreator no processo de desnitrificação. Observaram que mesmo com alta carga de nitrato ($6,3 \text{ kg m}^{-3}_{\text{leito}} \text{ d}^{-1}$) a desnitrificação foi alcançada com eficiência de 99,8% para diferentes valores de velocidade superficial do líquido. No que diz respeito à biomassa aderida, observaram que maiores velocidades superficiais provocaram decréscimo da biomassa, porém, o sistema foi capaz de manter o desempenho da desnitrificação. Posteriormente, ASLAN e DAHAB (2008) aplicaram o mesmo princípio deste biorreator para investigar a nitrificação e a desnitrificação via nitrito, em ambientes separados com a recirculação do efluente. GIESEKE *et al.* (2006) aplicou dois biorreatores com partículas de giz como meio suporte para investigar, com técnicas de biologia molecular, a tolerância da comunidade microbiana nitrificante ao ácido nitroso livre. A modelagem do processo de nitrificação no reator de leito fluidizado com biofilme também tem sido investigada (BERNET *et al.*, 2005). VOLCKE *et al.* (2008) simularam a dinâmica entre micro-organismos nitrificantes (AOB e NOB) neste tipo de biorreator contendo como suporte mineral granulado, composto principalmente por sílica e alumina, que é comercializado como “*extendsphere*™”. Em geral, esta configuração promove bons resultados no desempenho da nitrificação e da desnitrificação.

Embora considerados de operação um pouco mais complicada por conta dos problemas de entupimento, perda de carga e formação de caminhos preferenciais (RUSTEN *et al.*, 2006), a tecnologia dos biofiltros e biomassa aderida em leito fixo também tem sido empregada na remoção do nitrogênio amoniacal. JEONG *et al.* (2006) utilizaram dois filtros biológicos em série, preenchidos com peças de poliestireno, no tratamento terciário de efluente doméstico. Os autores observaram que o sistema de biofiltros foi eficiente na remoção total do nitrogênio amoniacal mesmo quando em baixas temperaturas características do inverno. VILLAVERDE *et al.* (1997) avaliaram a influência do pH sobre a nitrificação utilizando um biofiltro submerso com partículas de pozolana.

MONTRAS *et al.* (2008) avaliaram a cinética e modelaram a nitrificação convencional utilizando o processo “*Biostyr*®”, no qual o material suporte utilizado para o crescimento da biomassa aderida é composto por esferas de poliestireno. Este processo funciona como um tipo de biofiltro com leito expandido. Para alcançar efetivo desempenho na conversão de amônia a nitrato, diferentes taxas de recirculação do efluente foram

aplicadas, e a distribuição das bactérias nitrificantes no biofilme foi investigada por técnicas de biologia molecular. BORREGAARD (1997) estudou o processo “Biostyr[®]” em escala industrial, para a remoção biológica de nutrientes. A escolha deste tipo de processo se baseou principalmente na pouca disponibilidade de espaço físico para a expansão da unidade de tratamento existente. Neste caso o biorreator “Biostyr” promoveu nitrificação, desnitrificação e filtração do efluente, atendendo os níveis de descarte exigidos pela legislação local para nitrogênio total e sólidos suspensos.

Os sistemas com biofilme em leito móvel, conhecidos como MBBR (do inglês “moving-bed biofilm reactor”) têm mostrado bons resultados na nitrificação a nível de tratamento secundário, e podem ser considerados como uma tecnologia promissora na aplicação terciária. As principais vantagens do MBBR em relação aos demais sistemas com biomassa aderida podem ser enumeradas como segue (RUSTEN *et al.* 2006, SALVETTI *et al.*, 2006):

- utilização do volume útil integral do biorreator para o crescimento das comunidades microbianas;
- possibilidade de aplicar altas cargas volumétricas sem promover perdas da biomassa;
- menor perda de carga quando comparado aos biorreatores com biofilme em leito fixo;
- não necessita de retrolavagens e não está sujeito a problemas de entupimento ou colmatação do leito como nos biofiltros;
- biorreatores já existentes, como de lodos ativados, podem ser adaptados para a configuração dos MBBRs sem necessidade de grandes alterações, resultando em ganhos no desempenho do processo.

Contudo, algumas desvantagens também podem ser atribuídas a este processo, como o custo mais elevado de operação por conta da energia despendida para manter os suportes em movimento no interior do reator, e algumas dificuldades na manutenção dos tanques de tratamento, quando utilizado em larga escala.

A tecnologia dos MBBR foi desenvolvida e patenteada na década de 80 e vem sendo amplamente difundida pela comercialização dos suportes desenvolvidos pela Anox-Kaldness, também conhecidos como biomédias. Estes suportes são pequenas peças

cilíndricas com aletas internas e externas, produzidas em polietileno, com densidade ligeiramente inferior à da água. Atualmente, outras empresas já comercializam produtos similares como as biomédias AMB Bio Media™.

A quantidade de biomédias que deve ser adicionada aos biorreatores deve ser definida pela razão do volume ocupado pelas biomédias (em estado estático), consideradas como cilindros sólidos e o volume do reator, sendo que a fração máxima de enchimento deve ser de 70% do volume útil do biorreator, para permitir a adequada movimentação dos suportes no seu interior. A área superficial específica teórica do suporte é definida como a área superficial por unidade de volume no biorreator (ØDEGAARD *et al.*, 1994).

Com o objetivo de estudar a cinética dos biofilmes em sistemas nitrificantes, LAZAROVA *et al.* (1997) avaliaram o sistema trifásico (gás/líquido/biomassa fixa em leito móvel, tipo MBBR) em escala de bancada e piloto. Observaram ótimo desempenho da nitrificação (carga de nitrogênio removida de 1,2 a 2,0 kg N m⁻³ d⁻¹) sem acúmulo de nitrito. Este desempenho foi mantido para diferentes razões DQO/N-NH₄⁺. Os resultados do estudo cinético indicaram que este tipo de processo, ou seja, biofilme em leito móvel, assegurou as altas taxas específicas de nitrificação.

Com o objetivo de investigar as características do MBBR no pós-tratamento de efluentes tratados anaerobiamente, LUOSTARINEN *et al.* (2006) focaram na remoção de nitrogênio e possível biodegradação de compostos orgânicos residuais. Foram utilizadas biomédias da Anox-Kaldness com área superficial específica de 500 m² m⁻³ e preenchimento de 50% do volume útil do reator. Completa nitrificação foi alcançada quando foi fornecida quantidade suficiente de OD (2,0 – 3,5 mg L⁻¹) ao meio reacional, enquanto a desnitrificação foi restrita por conta da deficiência de matéria orgânica biodegradável.

ARTIGA *et al.* (2008) se propuseram a estudar o desempenho de um sistema híbrido, com três compartimentos, no tratamento biológico do efluente do processamento de peixe enlatado (com alto teor salino). O biorreator consistiu do primeiro compartimento com biomassa em suspensão, o segundo com biofilme em leito móvel (MBBR) e o terceiro com membranas de ultrafiltração. O suporte utilizado no MBBR foi o K-3, material

de polietileno comercializado pela Anox-Kaldness. Os estudos foram realizados em duas fases: com o efluente bruto ($73 - 83 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos dissolvidos totais) observou-se total adaptação da biomassa heterotrófica aos elevados teores salinos (77 – 92% de eficiência na remoção da matéria orgânica), porém, não foi observado qualquer vestígio de nitrificação; com o efluente diluído (concentração de sais menor que 15 g L^{-1}) observou-se o incremento na biodegradação da matéria orgânica e efetiva ação nitrificante, resultando em 90% de eficiência na conversão do nitrogênio amoniacal. ARTIGA *et al.* (2005) já haviam utilizado um sistema híbrido similar para investigar o tratamento de efluentes de curtume. Na ocasião observaram que 50 a 60% da nitrificação se deu no biofilme, sendo que foi alcançada 97% de eficiência na conversão de amônia para o sistema completo.

A operação de um sistema híbrido em escala piloto (reator com biofilme em leito fixo seguido de reator com biofilme em leito móvel) foi avaliada por FERRAI *et al.* (2009). Os suportes utilizados para crescimento da biomassa aderida foram peças cilíndricas de polietileno, encontradas comercialmente. A proposta do trabalho foi promover o abrandamento dos poluentes no biorreator de leito fixo, a remoção de carbono e amônia no compartimento de leito móvel e a recirculação do efluente nitrificado para o primeiro biorreator para alcançar a desnitrificação. Segundo os autores, a cinética de remoção dos substratos e os parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios respirométricos realizados nos dois biorreatores podem proporcionar orientações mais confiáveis para o projeto de MBBRs. Visto que critérios de projeto para MBBRs ainda são empíricos e, em geral, estão baseados em suposições sobre as cargas ou taxas superficiais (taxa de carga do poluente por unidade superficial de biomidia) e o tempo de retenção hidráulica, adequados para alcançar a qualidade requerida para o efluente.

Reatores com biofilme, inclusive os MBBR, também têm sido estudados com o intuito de obter a nitrificação/desnitrificação simultânea (SND). Devido à natureza dos biofilmes, estes desenvolvem macro e micro-ambientes dentro do reator, permitindo que diferentes bactérias envolvidas nestas reações cresçam e se concentrem em zonas favoráveis para as suas atividades metabólicas (BERNET *et al.*, 2000).

Conforme relatado por GUO *et al.* (2005), as principais propostas da nitrificação/desnitrificação simultâneas seriam a eliminação de dois reatores separados para remoção total de nitrogênio e a eliminação da aeração intermitente, ou seja, ao invés

de trabalhar com subsequentes etapas anóxicas e óxicas, o processo seria totalmente aeróbio, simplificando o sistema operacional. Neste contexto, GUO *et al.* (2005) estudaram o reator tipo “airlift” com biofilme no desempenho da SND, no qual foi alcançada eficiência de remoção, como nitrogênio total, acima de 82% nas melhores condições operacionais do sistema.

WANG *et al.* (2006) estudaram a remoção de nutrientes de esgoto doméstico pela combinação de precipitação química com o reator MBBR. Foi objetivo do trabalho remover nitrogênio por SND, a qual foi estabelecida sob concentrações de OD de aproximadamente $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ e com eficiência média de remoção de nitrogênio total de 89%. Os autores concluíram que a nitrificação/desnitrificação simultâneas foi alcançada pela limitação da difusão de oxigênio no interior do biofilme.

Verifica-se da literatura consultada, que existem inúmeras possibilidades de se alcançar adequado desempenho na remoção biológica de nutrientes, porém, pouco se tem investigado sobre a utilização de reatores do tipo MBBR para promover a nitrificação e/ou desnitrificação como tratamento terciário. A conjunção das características deste biorreator com a operação em bateladas sequenciais é ainda mais rara. Ademais, a grande maioria dos estudos que objetivam a remoção biológica do nitrogênio, independente da estratégia operacional aplicada, utiliza efluentes sintéticos, como pode ser constatado na Tabela 3.5 (previamente apresentada), não estando sujeita à variabilidade e complexidade dos efluentes reais, sobretudo os industriais. Neste contexto, torna-se relevante a aplicação do sistema MBBR, operado em bateladas seqüenciais, no estudo da nitrificação e possível desnitrificação terciária de um efluente industrial real com crescentes concentrações salinas.

3.7 FISH – Hibridização *in situ* por Fluorescência

FISH, termo da língua inglesa que corresponde a “Fluorescent *in situ* Hybridization”, é uma técnica de biologia molecular que consiste na hibridização de sondas de oligonucleotídeos complementares à região 16S rRNA alvo. Estas seqüências de oligonucleotídeos são marcadas com um agente corante fluorescente (fluorocromo) que permite a visualização ao microscópio de epifluorescência das células características de certo grupo ou espécie de bactéria (AMANN *et al.*, 1995).

Dentre as técnicas de biologia molecular mais aplicadas à microbiologia ambiental, como a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), a clonagem e o sequenciamento, FISH é a mais amplamente utilizada porque não exige purificação prévia da amostra (JETTEN *et al.*, 1999), permitindo a investigação *in situ* da ecologia microbiana. DGGE, clonagem e sequenciamento estão baseados na extração do DNA e na reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo consideradas ferramentas fundamentais nas análises microbiológicas, particularmente para a identificação de novas espécies, mas quantitativamente limitadas por conta da necessária extração e purificação do DNA (OKABE *et al.*, 1996, KIM e KIM, 2006, DYTCZAK *et al.*, 2008).

AMANN e LUDWIG (2000) chamam a atenção para algumas vantagens que podem ser associadas à aplicação de testes por hibridização com sondas de ácidos nucléicos: i) permite a descrição da estrutura das comunidades; ii) é rápida e segura quando comparada com os métodos dependentes de culturas; iii) é potencialmente quantitativa; iv) pode ser utilizada para identificar micro-organismos ainda não cultivados. Ademais, permite o entendimento mais completo da diversidade e distribuição das bactérias nos ambientes naturais (HU *et al.*, 2009).

3.7.1 Breve histórico

O histórico que será aqui apresentado foi adaptado de MOTER e GÔBEL (2000). A hibridização *in situ* (ISH) foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos de pesquisadores (PARDUE e GALL, 1969 e JOHN *et al.*, 1969), os quais atestaram que a técnica de hibridização do rRNA permitia que seqüências de ácidos nucleicos fossem examinadas dentro das células sem alterações da morfologia das mesmas ou da

integridade de seus componentes. Desde então, ISH vem sendo modificada para estudar a evolução cromossomal, realizar análises de cromossomos, de tumores e leucemias e investigar a citogenética de uma vasta gama de espécies. A técnica foi introduzida na bacteriologia por GIOVANNONI *et al.* (1988), que foi o primeiro a usar sondas de oligonucleotídeos com rRNA alvo na detecção microscópica de bactérias, contudo, estas sondas eram marcadas radioativamente. Com o desenvolvimento dos marcadores fluorescentes, os radioativos foram progressivamente substituídos por corantes não isotópicos, conhecidos como fluoróforos.

Em 1989, DELONG foi o primeiro a usar oligonucleotídeos marcados com fluoróforos para a detecção de células microbianas. As sondas fluorescentes são mais seguras do que as radiativas, proporcionam melhor resolução e não exigem etapas adicionais de detecção. Ademais, sondas fluorescentes baseadas em diferentes oligonucleotídeos marcados com corantes de diferentes comprimentos de onda de emissão, possibilitam a detecção de várias seqüências alvo em uma única etapa de hibridização. Desde o início da década de 90, incrementos na sensibilidade e velocidade da técnica fizeram da Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH) uma ferramenta poderosa nos estudos da filogenética, ecologia e diagnósticos ambientais em microbiologia, principalmente pelos esforços de AMANN e colaboradores a partir de 1990.

3.7.2 Princípios da técnica de FISH

Em teoria, cada ribossomo dentro de uma célula bacteriana que contém uma cópia de 5S, 16S e 23S rRNA é marcado pela sonda durante o procedimento da hibridização, e o elevado número de ribossomos por célula promove um sinal no sistema de amplificação (PERNTHALER *et al.*, 2001 *apud* ABREU, 2004). A etapa da hibridização consiste especificamente no emparelhamento da seqüência de oligonucleotídeos da sonda, usualmente com 15 a 30 nucleotídeos, com o rRNA alvo, conforme está representado na Figura 3.6. Para promover esta ação as amostras são incubadas em elevadas temperaturas dentro de recipientes hermeticamente fechados e saturados com o tampão de hibridização. Este é composto basicamente por detergentes e sais, para promover gradientes osmóticos, e por um agente desestabilizante de ácidos nucléicos como a formamida. A estringência da hibridização pode ser otimizada pelo incremento no teor de formamida que, dependendo da sonda, pode variar de 5 – 80%, e no decréscimo da concentração salina (PHILLIPS e REED, 1996). No entanto, o principal parâmetro que

influencia na eficiência da hibridização é a temperatura de dissociação (T_d) do oligonucleotideo complementar à seqüência alvo. A T_d influencia diretamente na estabilidade das bases emparelhadas na hibridização e, conseqüentemente, na especificidade da sonda (AMANN *et al.*, 1990). Posteriormente à hibridização, promove-se a lavagem, que é realizada em uma temperatura ligeiramente mais elevada que a T_d e tem a função de remover o excesso das sondas e, conseqüentemente, evitar a ligação inespecífica das mesmas (PERNTHALER *et al.*, 2001 *apud* ABREU, 2004). Apesar do desenvolvimento de equações empíricas para estimar a temperatura de dissociação dos oligonucleotideos (ABREU, 2004), é recomendável que as condições ideais de hibridização para cada sonda sejam determinadas experimentalmente.

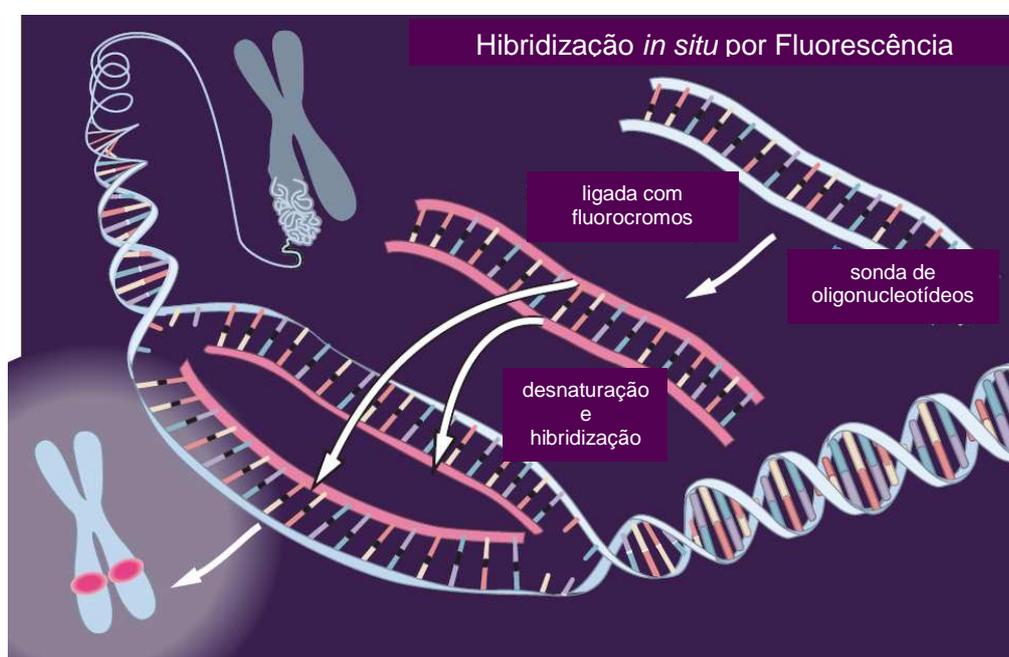


Figura 3.6 – Representação figurada da etapa de hibridização da técnica de FISH, adaptada do Instituto de Pesquisa Nacional do Genoma Humano (NHGRI-USA, 2009).

Na microbiologia a molécula alvo mais comum para a aplicação de FISH é o 16S rRNA por conta da sua estabilidade genética, contendo regiões variáveis e conservadas, por estar presente no mecanismo da síntese protéica tendo a mesma função em todos os organismos procariotos, além de conter informação genética suficiente para detectar diferentes grupos filogenéticos de micro-organismos seja no domínio, gênero ou espécie (AMANN *et al.*, 1995, MOTER e GÔBEL, 2000, ETCHEBEHERE e MENES, 2007). Dependendo das condições da hibridização, as sondas são capazes de formar ligações

estáveis (híbridos via pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos complementares) com a região 16S do RNA nos ribossomos. Se não existir complementariedade entre a seqüência de oligonucleotídeos da sonda e a região 16S rRNA, não ocorre hibridização estável e os oligonucleotídeos são lavados da célula (LINDREA *et al.*, 1999 *apud* ABREU, 2004).

Além de todas as variáveis que podem influenciar a eficácia da hibridização, a etapa preliminar da fixação das células é crucial para alcançar resultados satisfatórios por FISH (MOTER e GÖBEL, 2000). A fixação é responsável pela preservação da morfologia de cada célula individual, manter intacto seus ribossomos, permeabilizar a membrana celular para favorecer a penetração das sondas e reter ao máximo o rRNA alvo. Os agentes fixadores utilizados são o paraformaldeído, no caso das bactérias Gram negativas, e o etanol no caso das Gram positivas (ETCHEBEHERE e MENES, 2007).

A visualização do sinal da hibridização requer, no mínimo, um microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados para a faixa específica de excitação e emissão características do fluorocromo utilizado (PHILLIPS e REED, 1996). Vários marcadores fluorescentes têm sido utilizados, sendo acoplados à extremidade 5' das seqüências de oligonucleotídeos referentes às sondas. Os fluorocromos mais empregados na técnica de FISH são: fluoresceína (FLUOS), tetrametilrodamina, Texas Red, Alexa488, Alexa546 e indocarbocianinas (Cy3, Cy5 e Cy7) (AMMAN *et al.*, 1995, ETCHEBEHERE e MENES, 2007).

3.7.3 Limitações do método

Segundo AMANN e colaboradores (1995), o maior desafio na utilização de FISH em amostras ambientais já não é a aplicação da técnica em si, mas a construção e utilização de novas sondas para grupos desconhecidos de micro-organismos, sendo, portanto, considerada uma das mais promissoras e poderosas técnicas de identificação em biologia molecular. Por outro lado, alguns pesquisadores têm relatado certas limitações ainda na aplicação do método, a saber (MOTER e GÖBEL, 2000, ABREU, 2004, MANSER *et al.*, 2005, SANZ e KOCHLING, 2007):

- é necessário o conhecimento prévio do ecossistema e dos micro-organismos de interesse, podendo levar à necessidade de combinação com outras técnicas de identificação;

- a concepção de uma sonda específica e inequívoca restrita a determinado grupo de micro-organismos nem sempre é possível, especialmente se forem aplicados critérios metabólicos para este fim;
- em alguns casos a região alvo 16S rRNA pode ser conservada demais para permitir o discernimento entre duas populações muito próximas filogeneticamente, neste caso a utilização da região 23S rRNA pode ser uma alternativa;
- embora sejam normalmente abundantes, o conteúdo de rRNA das células bacterianas pode variar consideravelmente, não apenas entre espécies, mas também na mesma cepa, de acordo com seu estado fisiológico, que está diretamente relacionado às taxas de crescimento. Sendo assim, baixa atividade fisiológica pode resultar em fraca intensidade do sinal ou em resultados falsos negativos;
- a fixação não adequada das amostras pode resultar em baixa intensidade do sinal ou até na ausência do mesmo, pois a fixação, além de ser responsável pela preservação da morfologia celular, deve maximizar a permeação da sonda através da membrana citoplasmática;
- a otimização das condições de hibridização para cada sonda é um processo difícil, que requer experiência e dedicação, muitas vezes podendo não alcançar resultados satisfatórios;
- a quantificação dos micro-organismos pode ser subjetiva (contagem manual) e/ou complexa (análise de imagens);
- a análise estrutural de agregados (lodo granular e biofilmes) requer microscópio confocal o que resulta em condições restritas da análise das imagens (custo elevado e necessidade de pessoal treinado);
- a autofluorescência de certas células e dos seus agregados microbianos (ex. compostos orgânicos e inorgânicos), característicos das amostras de tratamento de efluentes, resultam em avaliações subjetivas na identificação das células alvo ou até mesmo na não validação do teste. Aparentemente, o método de fixação, o meio de crescimento e o meio de montagem da técnica têm influência direta na intensidade da autofluorescência.

No entanto, sendo FISH uma técnica amplamente aplicada, seus usuários têm proposto melhorias e novas estratégias para superar algumas das suas limitações (SANZ e KOCHLING, 2007, PARK *et al.*, 2008).

3.7.4 Aplicações

Por conta da versatilidade do método FISH, inúmeras são as aplicações que tem se dado a esta técnica, desde a área médica e veterinária até a área ambiental, sendo que no âmbito do meio ambiente o principal enfoque está na investigação da diversidade microbiana em amostras ambientais e de tratamento de efluentes.

Nesta última década, a técnica de FISH foi amplamente utilizada no estudo das comunidades nitrificantes, especialmente para compreender a distribuição espacial das AOB e das NOB em flocos, grânulos e biofilmes. Tem-se atribuído à técnica de FISH importante papel na interpretação dos diversos fatores que contribuem para o desempenho da oxidação do nitrogênio amoniacal. Neste contexto, a Tabela 3.6 apresenta alguns trabalhos que utilizaram FISH para investigar a comunidade nitrificante no âmbito dos tratamentos biológicos de efluentes.

Tabela 3.6 – Compilação dos trabalhos da literatura que utilizaram FISH na investigação da comunidade microbiana nitrificante.

Objetivo a alcançar com FISH	Referências
avaliar a diversidade microbiana e o enriquecimento da cultura ANAMOX a partir de três lodos de fontes distintas	DATE <i>et al.</i> , 2009
quantificar as AOB e as NOB em biofiltros aerados com crescimento de biofilmes prioritariamente autotróficos	DELATOLLA <i>et al.</i> , 2009
avaliar a morfologia da biomassa nitrificante e a sua dinâmica em relação ao teor de OD	GUO <i>et al.</i> , 2009
avaliar a eficácia da estratégia operacional no enriquecimento das AOB em biorreatores com biomassa em suspensão	JUBANY <i>et al.</i> , 2009
confirmar o domínio das AOB no processo de nitrificação parcial	QIAO <i>et al.</i> , 2009
comparar a distribuição das AOB e das NOB em membranas submersas com ar injetado na membrana e dissolvido no líquido	WANG <i>et al.</i> , 2009
comparar a comunidade microbiana na nitrificação convencional desenvolvida a partir de três fontes distintas de biomassa	WITTEBOLLE <i>et al.</i> , 2009
avaliar a inibição das NOB e enriquecimento das AOB na nitrificação e desnitrificação via nitrito em biorreator de membranas	ZHANG <i>et al.</i> , 2009b
avaliar a dinâmica da comunidade microbiana na remoção biológica de nitrogênio e fósforo com diferentes fontes de carbono	AHMED <i>et al.</i> , 2008
avaliar a comunidade microbiana nitrificante imobilizada em esponjas de poliuretano (Biocube)	CHAE <i>et al.</i> , 2008
avaliar a predominância das AOB e das NOB em um sistema híbrido com biomassa em suspensão e aderida sobre membranas	DOWNING e NERENBERG, 2008
avaliar a relação entre as AOB e as bactérias ANAMOX no processo CANON utilizando um biorreator com membranas	GONG <i>et al.</i> , 2008
avaliar a distribuição de <i>Nitrosomonas europaea</i> e <i>Nitrobacter winogradskyi</i> em biofilme nitrificante autotrófico	MONTRAS <i>et al.</i> , 2008
comparar e investigar a comunidade microbiana nitrificante em dois biorreatores distintos (com membrana submersa e lodos ativados) sob as mesmas condições operacionais	MUNZ <i>et al.</i> , 2008
avaliar a coexistência das AOB e das heterotróficas no biofilme formado sobre membranas com o objetivo de remover simultaneamente matéria orgânica e inorgânica nitrogenada	HU <i>et al.</i> , 2008
avaliar a distribuição das AOB e das NOB em relação às heterotróficas para diferentes razões C/N na SND	XIA <i>et al.</i> , 2008
investigar a coexistência das AOB e das ANAMOX na nitrificação parcial em wetlands verticais	DONG e SUN, 2007
avaliar a competição entre heterotróficas e autotróficas nitrificantes em um biorreator tubular	ELEENTER <i>et al.</i> , 2007
comprovar a caótica instabilidade das AOB e das NOB no processo nitrificante convencional	GRAHAM <i>et al.</i> , 2007

Tabela 3.6 – Compilação dos trabalhos da literatura que utilizaram FISH na investigação da comunidade microbiana nitrificante (continuação).

Objetivo a alcançar com FISH	Referências
quantificar as AOB e as NOB na biomassa para modelar a limitação do carbono inorgânico sobre a nitrificação	GUISASOLA <i>et al.</i> , 2007
caracterizar a comunidade das AOB imobilizadas em polietilenoglicol gel para o tratamento de chorume	ISAKA <i>et al.</i> , 2007
observar a presença de bactérias heterotróficas e autotróficas no tratamento de chorume em wetlands artificiais	SAWAITTAYOTHIN POLPRASERT, 2007
investigar a comunidade microbiana enriquecida com <i>Nitrobacter</i> sob o efeito de amônia livre	VADIVELU <i>et al.</i> , 2007
avaliar a atividade e a estrutura da comunidade microbiana nitrificante desenvolvida em biofilmes sob baixos valores de pH	GIESEKE <i>et al.</i> , 2006
avaliar a distribuição e competição entre <i>Nitrobacter</i> e <i>Nitrospira</i> na nitratação sob diferentes concentrações de NO ₂	KIM e KIM, 2006
investigar a dinâmica da comunidade microbiana na nitrificação em biorreator com membrana submersa	LI <i>et al.</i> , 2006
quantificar as comunidades nitrificantes presentes em dois biorreatores distintos (lodos ativados e membranas submersas)	MANSER <i>et al.</i> , 2006
avaliar a dinâmica das AOB e das NOB sob diferentes concentrações salinas em flocos nitrificantes	MOUSSA <i>et al.</i> , 2006
avaliar os efeitos da amônia na comunidade microbiana anaeróbia do biorreator UASB	CALLI <i>et al.</i> , 2005
investigar a dinâmica das AOB e das NOB na biomassa em suspensão com aeração intermitente	MOTA <i>et al.</i> , 2005
estudar a comunidade microbiana desnitrificante no tratamento de um efluente industrial salino	YOSHIE <i>et al.</i> , 2004
avaliar a dinâmica das AOB e das NOB sob diferentes concentrações salinas no sistema de lodos ativados	CHEN <i>et al.</i> , 2003
investigar a possibilidade de crescimento das bactérias nitrificantes em um sistema estabelecido para a remoção de fosfato	GIESEKE <i>et al.</i> , 2002
caracterizar a comunidade desnitrificante no sistema de lodos ativados	LEE <i>et al.</i> , 2002
avaliar a dinâmica das bactérias nitrificantes e heterotróficas em dois biorreatores com biofilme e tempo de retenção hidráulico distintos	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2002
investigar a presença de <i>Nitrosomonas</i> no biofilme desenvolvido no tratamento de efluente de laticínios em sistema tipo wetland	ROBERTS e LEWIS, 2001
comparar a dinâmica da comunidade microbiana nitrificante em biofilmes em várias estações de tratamento de efluentes	AOI <i>et al.</i> , 2000

AOB – bactérias que oxidam amônia; NOB – bactérias que oxidam nitrito; UASB – reator anaeróbio com manta de lodo; SND – nitrificação e desnitrificação simultânea; ANAMOX – bactérias anaeróbicas que oxidam amônia; CANON – completa remoção autotrófica de nitrogênio via nitrito.

A crescente disponibilidade das ferramentas de biologia molecular tem auxiliado na determinação de parâmetros chave na complexa ecologia das comunidades microbianas presentes em sistemas de tratamento de efluentes. O futuro interdisciplinar da pesquisa, na interface da ecologia microbiana molecular e da engenharia, certamente virá a permitir a compreensão detalhada da relação entre a diversidade microbiana e a eficiência e a estabilidade dos processos biológicos das estações de tratamento. Pelo uso das técnicas moleculares, deverá ser possível definir parâmetros operacionais que aumentem seletivamente a diversidade dentro de grupos funcionais de bactérias e assim tornar a comunidade microbiana mais resistente a perturbações. Utilizando deste conhecimento, estratégias inovadoras para o controle e o projeto de processos biológicos de tratamento de efluentes poderão ser desenvolvidas (NOGUEIRA *et al.*, 2002).

4 Materiais e Métodos

4.1 Descrição do biorreator de leito móvel com biofilme (MBBR)

Com a finalidade de investigar o efeito da salinidade (até $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$) no processo convencional de nitrificação, montou-se, em escala de bancada, um reator de leito móvel com biofilme (MBBR), automatizado e operado em modo de bateladas sequenciais como um SBR.

O reator, de formato retangular, foi construído em acrílico, com volume total de 9,0 L e volume útil de 7,0 L com as seguintes dimensões principais: profundidade 0,10 m; largura 0,18 m e altura 0,50 m. O modo de operação em bateladas sequenciais foi escolhido por se observar na literatura forte tendência de utilização desta configuração nos estudos que envolvem os processos de nitrificação/desnitrificação, conforme relatado no Capítulo 3. A característica compacta deste tipo de configuração, que permite realizar etapas aeróbias e anóxicas no mesmo reator, assim como sua flexibilidade operacional, também contribuiu para esta escolha.

No sistema proposto se optou pelas “biomédias” para o crescimento microbiano aderido (biofilme). Estas biomédias, em geral, são de material plástico e podem se apresentar sob diversos formatos. Neste trabalho foram utilizadas peças cilíndricas de polietileno, com diâmetro de 15 mm e superfície para adesão microbiana de $550 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$, conforme informações do fabricante. Este material possui marca registrada, AMB Bio Media™, tendo sido gentilmente cedido pela Empresa White Martins, então representante dos produtos Dynamic Aqua Science Ltda no Brasil, fabricante deste produto. A quantidade de biomédias utilizadas no MBBR foi equivalente a 40% do volume de leito do mesmo (aproximadamente 1.200 peças). A Figura 4.1 apresenta uma foto ilustrativa destas biomédias. A quantidade deste material no reator foi invariável durante todo o período do trabalho.

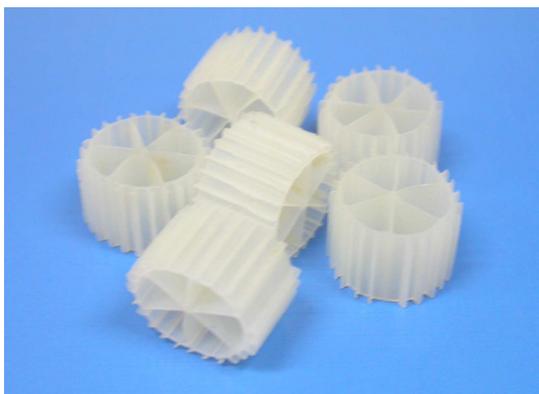


Figura 4.1 – Ilustração das biomédias AMB Bio Media™ utilizadas.

O ar foi introduzido na base inferior do reator por meio de uma peça difusora de cerâmica sinterizada. Esta peça proporcionou adequada distribuição das bolhas de ar no meio líquido para o suprimento de oxigênio à comunidade microbiana, bem como a circulação das biomédias no MBBR. A vazão de ar utilizada foi medida e controlada por rotâmetro. Para promover a homogeneização do meio durante a possível fase anóxica foi acoplado um agitador mecânico ao biorreator, sendo este fixado em uma das paredes laterais (Figura 4.2).

A alimentação do efluente ao reator foi realizada por bomba peristáltica. A entrada do efluente no reator se situava em uma de suas laterais, a 0,25 m de sua base. A saída do efluente se dava na outra lateral do MBBR, a 0,125 m da sua base. O ponto de saída do efluente foi determinado pelo volume mínimo de líquido (1,7 L) necessário para manter as biomédias submersas durante a etapa de esgotamento.

O sistema foi totalmente automatizado permitindo variar, sempre que necessário, o tempo das diferentes etapas operacionais do processo. A automação da unidade foi realizada em parceria com o GSCAR – Grupo de Simulação e Controle em Automação e Robótica do Programa de Engenharia Elétrica da COPPE.

O sistema foi controlado por um PLC – Controlador Lógico Programável – responsável pelo acionamento e controle de todos os periféricos. O PLC foi responsável pelo acionamento de duas bombas peristálticas, sendo uma para alimentação do reator e outra para homogeneização do efluente armazenado; pelo acionamento do agitador mecânico, caso este fosse utilizado; pelo controle de nível realizado por eletrodos

instalados no interior do reator; além do acionamento das válvulas solenóides utilizadas para: suprimento de ar, adição do regulador de alcalinidade (Na_2CO_3) do meio líquido ou de fonte de carbono externa (possível desnitrificação), alimentação e esgotamento do reator. O sistema também foi equipado com monitoramento em linha de oxigênio dissolvido, temperatura e pH. Para tal foram utilizados eletrodos adequados para operação contínua, semelhante àqueles utilizados em reatores industriais.

A Figura 4.2 ilustra o fluxograma simplificado da unidade experimental e a Figura 4.3 apresenta a foto do sistema completo montado em laboratório.

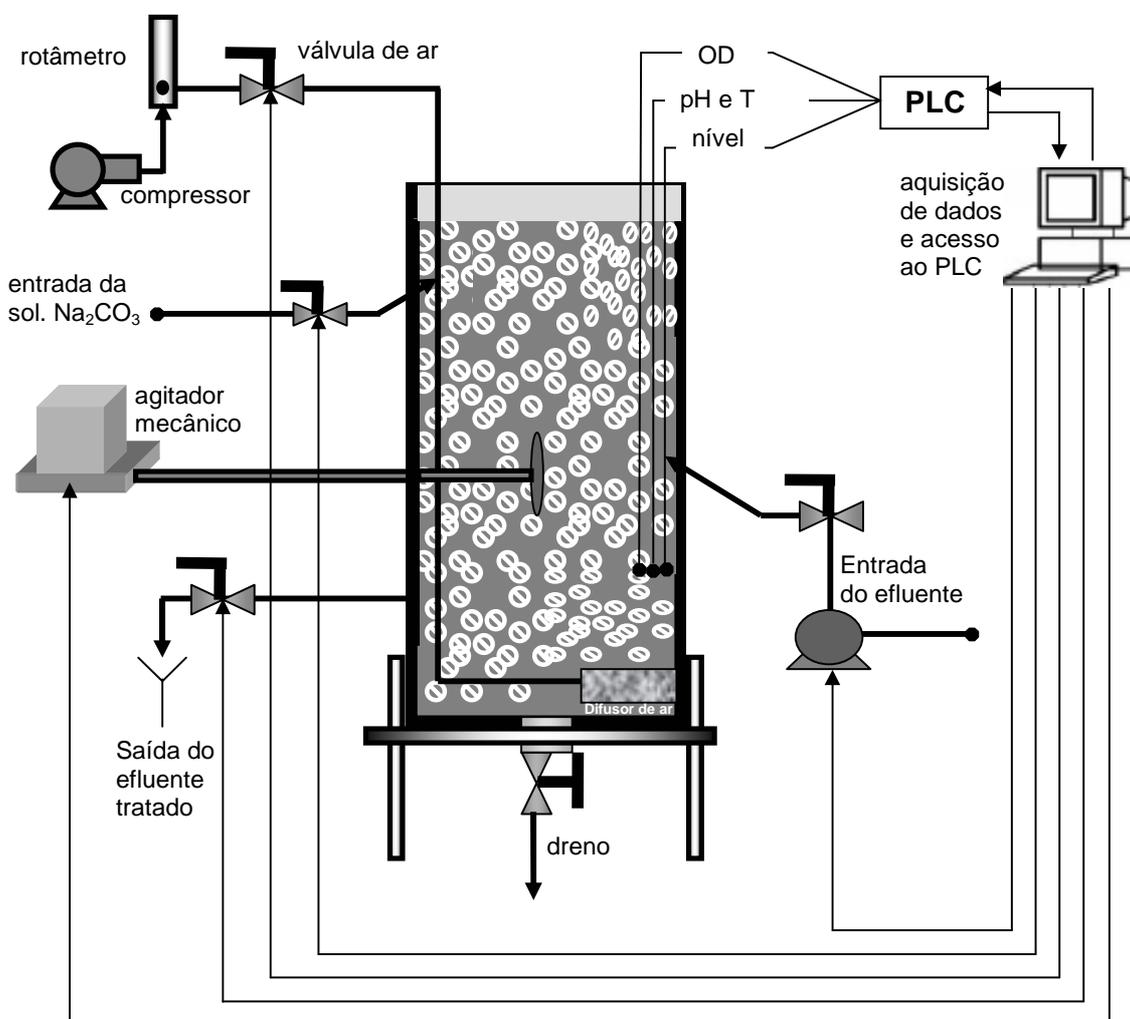


Figura 4.2 – Representação da unidade experimental: MBBR e periféricos.



Figura 4.3 – Unidade experimental em escala de bancada.

A Figura 4.4 apresenta a parte física responsável pela automação do sistema, incluindo a parte interna do painel de controle, onde se encontra o PLC. A Figura 4.5 apresenta uma foto mais detalhada do sistema, na qual estão nomeados os seus respectivos componentes. A Figura 4.6 mostra em detalhe o agitador mecânico responsável pela mistura do meio bifásico (líquido/sólido) durante a fase anóxica, o qual se encontra acoplado perpendicularmente à parte de trás do biorreator.

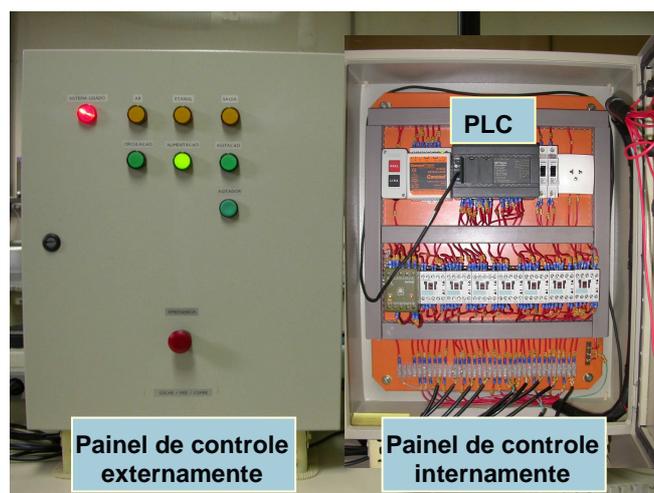


Figura 4.4 – Parte física da automação.

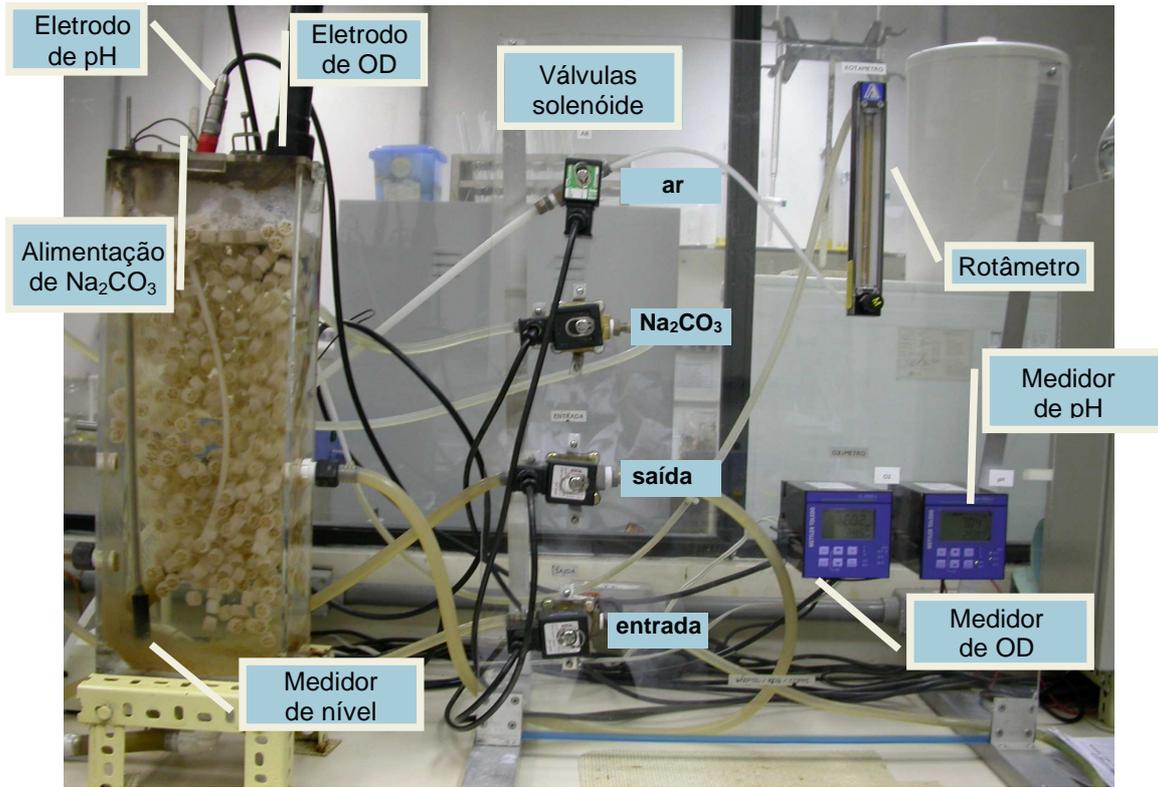


Figura 4.5 – Apresentação mais detalhada do MBBR e alguns periféricos.

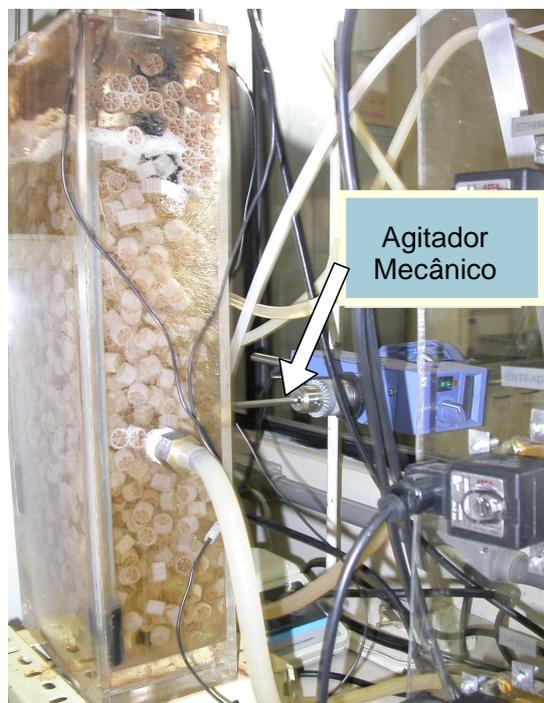


Figura 4.6 – Agitador mecânico acoplado ao MBBR.

4.2 Efluente industrial

O efluente utilizado foi gentilmente cedido pela Petroflex, empresa produtora de borracha sintética que, atualmente, pertence ao grupo alemão Lanxess e atende por esse nome.

O principal intuito de utilizar este efluente foi o desafio de trabalhar com um efluente real e que, portanto, possui uma matriz complexa e variável, diferentemente da grande maioria dos trabalhos que investigam a nitrificação e utilizam efluentes sintéticos.

A indústria geradora do efluente trata-o nos níveis primário e secundário, o que viabiliza o seu descarte no curso d'água com atendimento aos padrões requeridos pelo Órgão Ambiental, no caso do Rio de Janeiro o INEA (Instituto Estadual do Ambiente). O efluente de interesse para este estudo foi coletado periodicamente, ao longo de todo o período experimental, na saída do tratamento secundário (lodos ativados). É de conhecimento comum que, dependendo das características do efluente a ser tratado, pode não ser possível alcançar bom desempenho para remoção de amônia durante o tratamento secundário convencional.

Devido à elevada variabilidade na concentração de amônia do efluente industrial decidiu-se por padronizar a quantidade de nitrogênio amoniacal do efluente a ser alimentado no MBBR com adição de cloreto de amônio (NH_4Cl). Para estudar o efeito de diferentes concentrações salinas no processo de nitrificação, o efluente industrial também foi suplementado com cloreto de sódio (NaCl), de acordo com as condições de trabalho propostas.

Conforme comentado, o efluente foi coletado periodicamente (a cada 20 dias) em bombonas de 50 litros, durante todo o período de trabalho. Para cada nova remessa, o mesmo foi caracterizado em relação aos seguintes parâmetros: demanda química de oxigênio (DQO) total e dissolvida, carbono orgânico dissolvido (COD), sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV), amônia, nitrato, cloreto e pH. Os resultados médios da caracterização, obtidos para o efluente industrial, serão apresentados no Capítulo 5.

4.3 Estratégia de operação do MBBR

Para iniciar a operação do biorreator, operado de modo descontínuo, na forma de bateladas seqüenciais, foi fixado um ciclo operacional de 24 horas, conforme ilustrado na Figura 4.7.

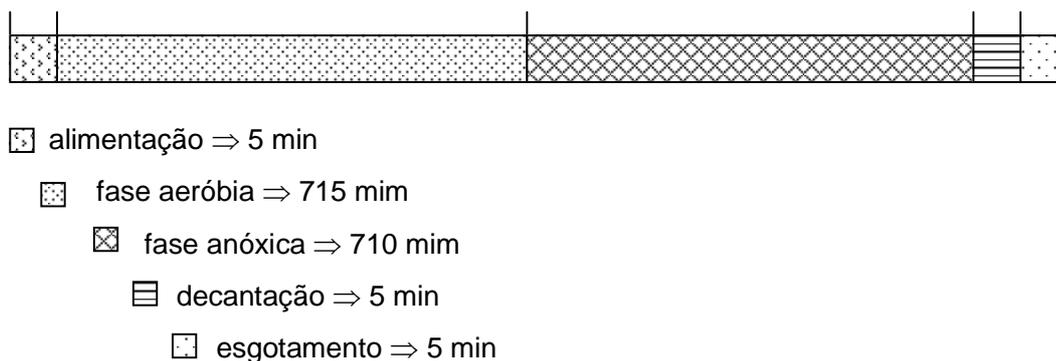


Figura 4.7 – Etapas do ciclo operacional do MBBR no início da operação.

Cabe ressaltar que o volume alimentado em cada batelada foi de 5,3 litros, permanecendo ao final de cada ciclo volume residual de 1,7 litros.

Antes da partida do sistema com efluente, foram realizados alguns testes de operacionalidade. Realizaram-se testes de capacidade de homogeneização do reator, de distribuição das biomédias, de oxigenação do meio líquido e de funcionamento da automação.

A partida do reator foi realizada com efluente industrial suplementado apenas com cloreto de amônia, ou seja, sem a adição de sal. Nesta fase, o reator foi inoculado com 50 mL de lodo proveniente do tanque de lodos ativados da estação de tratamento de efluentes da indústria. Fixou-se a concentração de amônia no efluente de estudo em torno de 100 mg L^{-1} .

Após 30 dias do início da operação do biorreator, foram realizados testes de acompanhamento da conversão da amônia ao longo da fase aeróbia do ciclo operacional, com o objetivo de selecionar o tempo mais adequado para a duração desta etapa. Durante os testes foram retiradas alíquotas de 30 mL do interior do MBBR a cada 1 hora

no período total de 10 horas. Estas amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose, com tamanho de poro de 0,45 μm , e avaliadas quanto à concentração de amônia e de nitrato.

A partir dos resultados obtidos se iniciou o ajuste da alcalinidade necessária ao processo de nitrificação pela adição de uma solução de carbonato de sódio na alimentação do biorreator e, posteriormente, de maneira automatizada.

Decorrido o período da implementação do ajuste de alcalinidade no meio reacional, foi necessário realizar novos ensaios de acompanhamento de conversão da amônia. Então, a partir destes resultados foi fixado o tempo de duração da etapa aeróbia no biorreator.

Tendo sido ajustadas as condições de operação do processo de nitrificação, foi dado início aos ajustes da etapa anóxica, referente à desnitrificação. Para tanto, foi adicionado ao biorreator, de maneira automatizada, no início de cada etapa anóxica, etanol como fonte externa de carbono. A escolha do etanol, assim como a quantidade do mesmo adicionada, foi calculada a partir de relações estequiométricas e razões C/N propostas na literatura (ABELING e SEYFRIED, 1992, CHIU e CHUNG, 2003, RUSTEN *et al.*, 2006). Como será visto no próximo capítulo, problemas operacionais impediram a continuidade da possível etapa anóxica no ciclo operacional do biorreator.

Entre os ajustes da automação do sistema, assim como o acerto dos parâmetros operacionais do processo, foram dispendidos 250 dias, sendo a partir de então dado início aos regimes operacionais, como relatado a seguir.

Quatro regimes operacionais foram investigados. O parâmetro de variação que definiu cada regime foi a salinidade, em termos de cloreto. A faixa de salinidade investigada variou desde o teor de cloreto presente no efluente industrial (aproximadamente 0,05 g L^{-1}) até 12 g L^{-1} . Os valores da salinidade do efluente no biorreator, estabelecidos para cada regime, assim como o respectivo tempo de duração proposto para cada um deles, estão apresentados na Tabela 4.1.

Na passagem do primeiro para o segundo regime operacional, assim como na passagem para os regimes posteriores, foi feito um período de adaptação da biomassa até se alcançar a nova condição de salinidade do meio. Esta adaptação foi realizada com aumentos gradativos do teor de sal no meio reacional até atingir o valor de interesse.

Tabela 4.1 – Condição de salinidade imposta a cada regime de operação do biorreator.

	Cl ⁻ (% m v ⁻¹)	Cl ⁻ (g L ⁻¹)	NaCl (g L ⁻¹)	Tempo de operação proposto (dias)
Regime 1	***	***	***	90
Regime 2	0,3	3,0	5,0	120
Regime 3	0,6	6,0	10,0	120
Regime 4	1,2	12,0	20,0	120

***inerente ao efluente industrial

Para acompanhar o desempenho da nitrificação ao longo de todo o período operacional do MBBR, foram determinadas (no mínimo 3 vezes por semana) a concentração de amônia e nitrato no efluente inicial e final de cada ciclo de operação. Nestas mesmas condições, foram determinados semanalmente a DQO e os teores de SST e SSV. O carbono orgânico dissolvido e nitrito só foram determinados quando da realização dos ensaios cinéticos, por conta de restrições dos equipamentos.

Temperatura, oxigênio dissolvido e pH foram monitorados em linha no próprio reator utilizando medidores da marca Mettler Toledo modelos O₂4050e e pH2050e. A temperatura foi monitorada conjuntamente com o eletrodo de pH.

4.4 Testes cinéticos conduzidos no MBBR

Para melhor avaliar o possível impacto da crescente salinidade do meio reacional foram determinados perfis de conversão da amônia para os quatro regimes operacionais propostos.

Com este objetivo foram realizados ensaios para obter o perfil cinético de oxidação da amônia e, conseqüentemente, da formação de nitrito e nitrato. Estes ensaios foram realizados em todos os regimes operacionais, em triplicata, tendo sido utilizado um procedimento padronizado em todos os casos.

Durante os testes foram retiradas alíquotas de 30 mL do biorreator a cada 1 hora logo após a alimentação do efluente, ou seja, desde um tempo zero até o período total de 10 ou 12 horas. Estas amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45 μm para a determinação das concentrações de amônia, nitrito e nitrato, conforme descrito na seção 4.8.1.

O período escolhido para a realização dos testes se deu em momentos considerados de operação estável e na condição de maior eficiência de remoção da amônia alcançada para cada regime operacional. Nestes ensaios o reator foi esgotado completamente e preenchido o seu volume útil total (7,0 L) com o efluente.

Utilizou-se o período relativo ao Regime 3 para investigar também, pelo perfil cinético de conversão da amônia, a influência do teor de matéria orgânica no processo de nitrificação. Para esta finalidade o efluente industrial foi diluído com água da rede nas seguintes proporções efluente:água (75:25 e 50:50). Para esta condição os ensaios cinéticos foram conduzidos em triplicata, seguindo o mesmo procedimento descrito acima.

Para os resultados experimentais obtidos foi proposto um modelo matemático simplificado. Devido à dificuldade de quantificar de maneira confiável a concentração de bactérias no processo, sobretudo quando se trata de biomassa fixa, assim como de diferenciar as bactérias que oxidam a amônia daquelas que oxidam o nitrito, se optou por trabalhar com um modelo baseado apenas no consumo dos substratos (amônia e nitrito) e na geração de produto (nitrato), conforme será discutido no Capítulo 5.

4.5 Experimentos de desnitrificação em biorreator de leito móvel

A etapa da desnitrificação esteve presente na proposta inicial deste trabalho e, conforme já exposto, não foi possível promovê-la da maneira originalmente idealizada. No

entanto, este processo é de grande importância para o ambiente, pois o nitrato, produto final da nitrificação convencional, também é uma substância poluente. Portanto, foi considerado relevante verificar a possibilidade de desnitrificar o efluente tratado no MBBR. Para esta finalidade foi montada outra unidade experimental, bastante simplificada, que será descrita a seguir.

Este procedimento foi realizado somente no último regime operacional investigado que equivale a condição de $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$.

4.5.1 Descrição da unidade experimental

A desnitrificação exige condições anóxicas para que os micro-organismos utilizem o nitrato como aceptor final de elétrons ao invés do oxigênio. Para promover tal condição colocou-se um bécher de vidro com capacidade de 2 L sobre uma placa de agitação mecânica com barra magnética no seu interior para manter a homogeneização do meio reacional. Neste bécher foram adicionadas biomédias em quantidade equivalente a 40% do seu volume, para criar as condições mais próximas possíveis do processo de nitrificação utilizado. Estas biomédias vinham sendo aclimatadas com o mesmo efluente inicial do MBBR com o intuito de reposição das peças utilizadas para as determinações inerentes à biomassa. Utilizou-se papel alumínio para cobrir o bécher-biorreator com o objetivo de minimizar as possíveis trocas de oxigênio do ambiente externo com o meio líquido. A Figura 4.8 ilustra a unidade de desnitrificação utilizada.



Figura 4.8 – Unidade experimental para o estudo da desnitrificação.

O efluente final do MBBR foi alimentado diariamente à unidade de desnitrificação. A fonte externa de carbono utilizada foi o etanol na razão DQO/N-NO₃⁻ igual a 4, tendo esta razão sido escolhida arbitrariamente.

4.5.2 Condições operacionais e controles

Este biorreator operou pelo período de três meses paralelamente ao último regime operacional do MBBR, no modo de bateladas seqüenciais com tempo de reação anóxica de 24 horas. A alimentação do efluente foi realizada sempre de maneira instantânea após esgotamento total do líquido tratado na batelada anterior. Os primeiros 60 dias de operação foram destinados somente ao desenvolvimento da biomassa desnitrificante.

Foram determinados os teores de sólidos totais e voláteis da biomassa aderida nos três meses de operação deste sistema. Oxigênio dissolvido no interior do biorreator e o pH do efluente final foram medidos esporadicamente. A temperatura de operação foi a ambiente do laboratório (~ 24°C).

Nos últimos 30 dias de operação foram realizados ensaios para avaliar a velocidade de redução do nitrato presente no meio líquido, ou seja, a capacidade de desnitrificação daquela unidade. Estes testes foram conduzidos paralelamente aos ensaios cinéticos do MBBR para o último regime operacional e utilizou-se da mesma metodologia aplicada, conforme descrito na seção 4.4, com exceção da determinação da amônia a qual não foi monitorada.

Além do acompanhamento do nitrito e do nitrato no decorrer dos testes, também foi determinado o teor de carbono orgânico dissolvido nas amostras.

4.6 Caracterização e quantificação do biofilme

Neste trabalho se optou por utilizar a determinação dos sólidos voláteis (SV), proteínas e polissacarídeos ligados e totais, como técnicas de quantificação do biofilme. Para a caracterização do mesmo buscou-se trabalhar com técnicas de microscopia óptica e microscopia de fluorescência associada à biologia molecular, como é o caso da técnica de FISH (Hibridização *in situ* por Fluorescência). O objetivo em realizar estes testes foi o

de identificar os micro-organismos nitrificantes e avaliar o possível impacto da salinidade nas características e produção da biomassa.

4.6.1 Quantificação do biofilme por sólidos voláteis

Para efetuar a quantificação ou caracterização do biofilme foi necessário primeiramente desenvolver um método para separar a biomassa do material suporte (biomédias). Portanto, foi admitido um procedimento padrão para a obtenção do biofilme, variando-se apenas o líquido de extração em função da análise a ser realizada.

Este procedimento consistiu em retirar as biomédias aleatoriamente do MBBR, em momentos fixados para todos os ensaios. Estas foram colocadas em bécheres de 25 mL, separadamente, com líquido suficiente para cobri-las (10 mL). Esses bécheres foram colocados no aparelho de ultra-som (modelo MS200 da Thornton) por 30 min para auxiliar no desprendimento do material aderido às biomédias. Quando não ocorria o desprendimento total no ultra-som, utilizava-se uma agulha e se raspava delicadamente o interior da biomédia até esta ficar praticamente limpa. Com o auxílio de uma pinça se retirava a peça suporte do bécher e se fazia uso do líquido resultante para as determinações de sólidos totais e voláteis (ST e SV), polissacarídeos (PLS), proteínas (PTN) e FISH.

No caso das determinações de ST e SV o líquido de extração foi a água. Após a retirada do material suporte se filtrava o líquido contendo o biofilme em membranas de fibra de vidro. Na seqüência determinava-se por gravimetria o teor de sólidos totais e voláteis conforme será descrito na seção 4.8.5.

Para calcular os valores da concentração da biomassa média obtidos nos 4 regimes operacionais estudados se utilizou das seguintes considerações:

- 1) multiplicou-se os resultados obtidos para SV, em mg L^{-1} , pelo volume fixo de 10 mL (valor arbitrado) adicionado a cada biomédia;
- 2) o valor obtido no item (1) foi multiplicado pelo número total de biomédias no interior do biorreator e se obteve a massa média de biofilme no MBBR;

- 3) dividiu-se o valor da massa total, obtido no item (2), pelo volume útil de líquido no biorreator (7,0 L) e, assim, obteve-se a estimativa da concentração média de biomassa (mg L^{-1}), para cada regime operacional estudado.

4.6.2 Quantificação do biofilme por determinação de proteínas e polissacarídeos

Deve-se frisar que no decorrer deste trabalho serão empregados os termos “totais” e “ligados” com referência aos teores de polissacarídeos e de proteínas. O termo “ligado” está relacionado a estas substâncias quando as mesmas estão presentes no material polimérico extracelular presente na membrana das células bacterianas. O termo “totais” se refere às substâncias ligadas somadas às mesmas presentes no material intracelular das bactérias.

Estas substâncias são diferenciadas analiticamente em função dos métodos utilizados para a extração dos polissacarídeos (PLS) e das proteínas (PTN). No caso da determinação de PLS e PTN totais, a metodologia de extração dos mesmos deve promover a lise celular. Para a determinação de PLS e PTN ligados é ideal que se obtenha o material exopolimérico, evitando o máximo possível o rompimento das células. Neste contexto muitas técnicas são propostas para a obtenção do material ligado, pois para a extração dos totais já existe metodologia consolidada por não serem requeridos cuidados com a integridade da célula.

LIU e FANG (2002) e COMTE *et al.* (2006) fizeram estudos comparativos de várias técnicas de extração para a obtenção das substâncias extracelulares, utilizando métodos físicos (ultra-som, resinas de troca iônica, aquecimento) e químicos (EDTA, formaldeído + NaOH, glutaraldeído), além de conjugações entre eles. Dentre os resultados obtidos o método que alcançou o melhor resultado em termos de rendimento na recuperação dos exopolímeros, com menor rompimento celular, foi o método químico que utiliza formaldeído e hidróxido de sódio.

Portanto, com base nestes estudos a metodologia adotada para a extração dos PLS e PTN ligados no presente trabalho foi adaptada dos protocolos apresentados por LIU e FANG (2002) e COMTE *et al.* (2006) para formaldeído e hidróxido de sódio.

A princípio o procedimento utilizado para o desprendimento da biomassa a partir da biomídia seguiu o mesmo protocolo empregado para a determinação dos sólidos voláteis, porém, ao invés de se adicionar água à biomídia, adicionou-se 10 mL de solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, deixando-se por 30 min no ultra-som. Em seguida as biomídias foram retiradas do bécher com o auxílio de pinça e o líquido transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Este foi centrifugado por 15 min a 1500 rpm. A seguir, o líquido clarificado foi separado, sendo adicionados mais 10 mL do mesmo tampão ao pellet de células. Efetuou-se agitação para ressuspender o material do fundo do tubo e adicionou-se 0,06 mL de formaldeído 36,5% ($v v^{-1}$), seguido de homogeneização e repouso por 1 h a 4°C . Decorrido este tempo, foram adicionados ao tubo 4 mL de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, seguidos de nova etapa de repouso por 3 h a 4°C . Em seguida, efetuou-se nova centrifugação por 15 min a 1500 rpm e, posteriormente, filtrou-se o sobrenadante em membrana de acetato de celulose de $0,22 \mu\text{m}$ com auxílio de filtração a vácuo. Recolheu-se o filtrado para armazenamento em geladeira por até 24 h, para então se proceder à determinação dos PLS e PTN ligados. O líquido separado após a primeira centrifugação também foi analisado quanto ao teor de polissacarídeos e proteínas. Essas determinações foram designadas por PLS e PTN “livres”, uma vez que estas substâncias foram facilmente separadas, pois estavam fracamente ligadas ao biofilme. A Figura 4.9 apresenta de maneira esquematizada este procedimento.

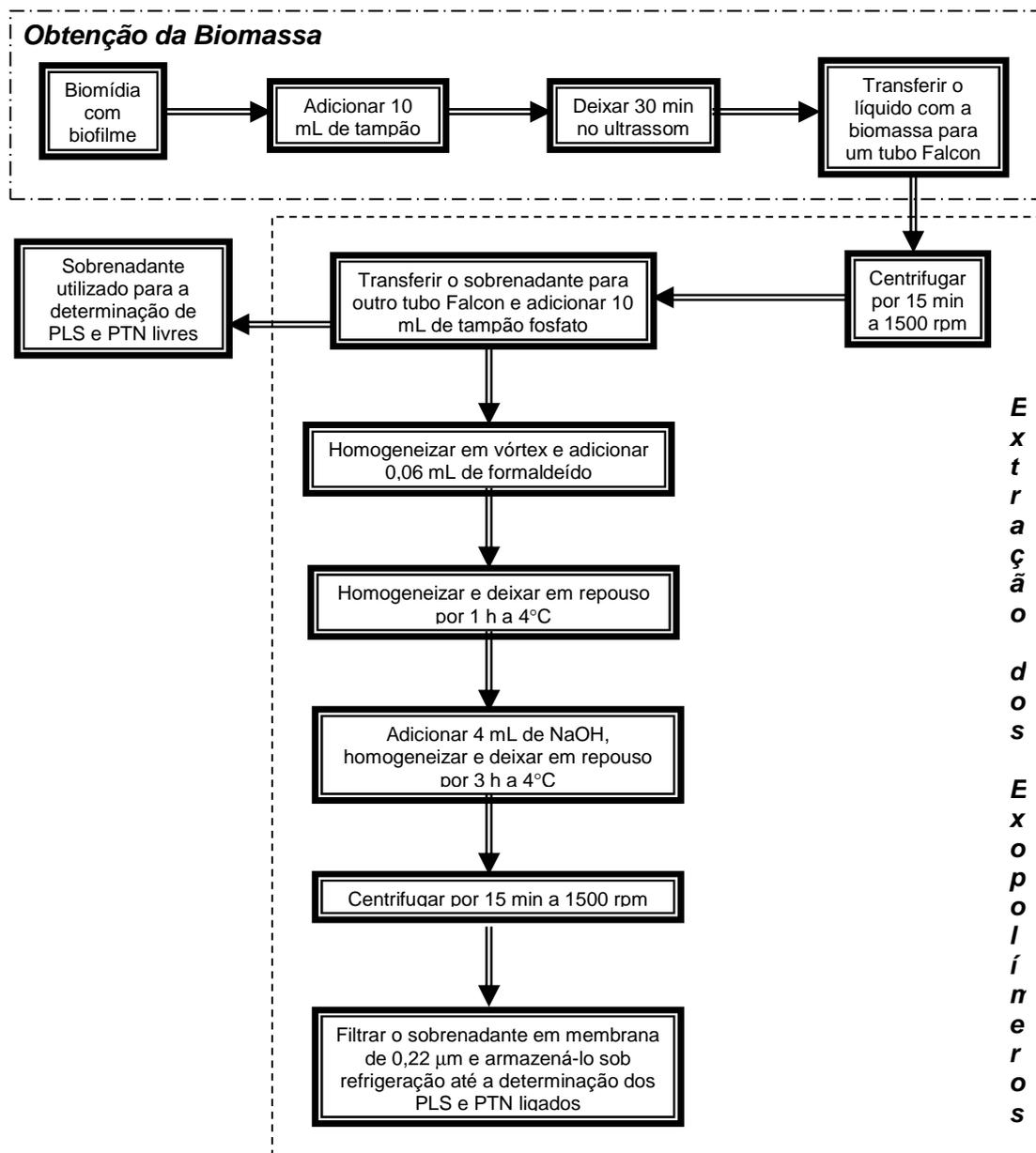


Figura 4.9 – Esquema do procedimento utilizado para a extração dos PLS e PTN ligados à biomassa.

Para a extração dos PLS e PTN totais se utilizou uma metodologia consolidada no grupo de pesquisa do LABPOL (Laboratório de Controle de Poluição de Águas) que está baseada nos estudos desenvolvidos por CAMMAROTA (1998). As biomídias foram aleatoriamente retiradas do interior do MBBR e cada uma foi colocada em um tubo Falcon de 50 mL, ao qual foram adicionados 10 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Após agitação, deixava-se o tubo por 5 min em banho-maria a 100°C. A seguir, retirava-se a biomídia com o

auxílio de uma pinça e submetia-se o conteúdo do tubo à centrifugação por 15 min a 1500 rpm. Posteriormente, filtrava-se o sobrenadante em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22 μm sob vácuo. O filtrado recolhido seguia para armazenamento em geladeira por até 24 horas, para então se proceder à determinação dos teores de PLS e PTN totais. A Figura 4.10 apresenta de maneira esquematizada o procedimento descrito.

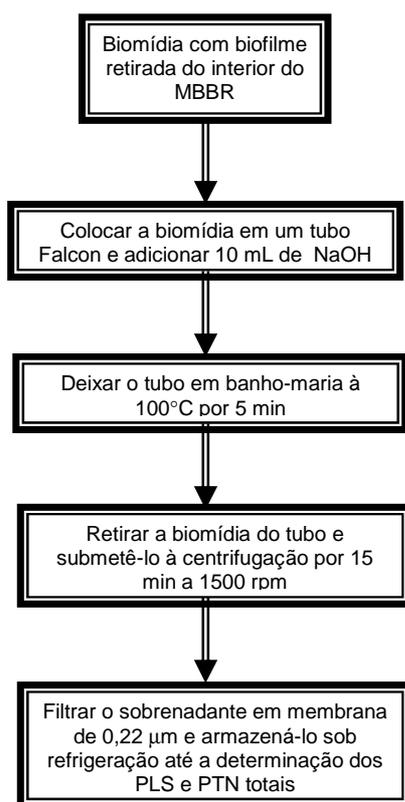


Figura 4.10 – Esquema do procedimento utilizado para a extração dos PLS e PTN totais.

Utilizou-se o método espectrofotométrico de DUBOIS *et al.* (1956) para a determinação dos polissacarídeos livres, ligados e totais e o método espectrofotométrico modificado de LOWRY *et al.* (1951) para as proteínas livres, ligadas e totais, seguindo os protocolos apresentados por CAMMAROTA (1998).

4.6.3 Caracterização do biofilme por microscopia óptica

As observações da biomassa aderida ao suporte foram realizadas em microscópio óptico Hund-Wetzlar, modelo H500, acoplado à câmera fotográfica Nikon Coolpix modelo 3500.

As observações ao microscópio óptico tiveram como intuito monitorar as características gerais do biofilme, assim como a presença de possíveis protozoários ou metazoários e relacioná-los com as condições operacionais impostas a cada regime de trabalho no qual foram visualizados.

Para efetuar as observações na biomassa, certa quantidade de biofilme (~ 0,1 mL) foi sugada do suporte com o auxílio de um conta-gotas e colocada diretamente sobre a lâmina, sendo que acima da amostra foi colocada a lamínula. Este conjunto foi levado ao microscópio óptico e observado com objetivas capazes de aumentar a visualização em 100, 400 e 1000 vezes. O zoom óptico da câmera fotográfica permitia aumento de até 10x superior às objetivas utilizadas. Este procedimento foi realizado mensalmente durante todo o período de trabalho.

4.7 Caracterização do biofilme pela técnica de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH)

4.7.1 Cultivo de células controle

Em geral, quando se inicia a técnica de FISH é recomendável testar as sondas com culturas puras das bactérias de interesse para a sua validação. Por conta de dificuldades em obter culturas puras das bactérias nitrificantes em tempo hábil, optou-se por tentar promover o isolamento destas bactérias a partir da biomassa presente no MBBR.

Com esta finalidade, foram realizados procedimentos adaptados do trabalho desenvolvido por SORIANO e WALKER (1968), os quais isolaram bactérias autotróficas que oxidam amônia a partir de amostras de solo.

Primeiramente foram preparados meios líquidos sintéticos específicos (Anexo I.1) baseados na composição apresentada por SKINNER e WALKER (1961) *apud* SORIANO e WALKER (1968) para o isolamento das AOB e por HENGEL *apud* SORIANO e WALKER (1973) para o isolamento das NOB. A estes meios foi adicionada uma solução de micronutrientes (Anexo I.2) conforme apresentada por CAMPOS *et al.* (1999). Os meios de isolamento foram autoclavados a 121°C por 15 min.

A biomassa equivalente a três biomédias foi obtida conforme descrito na seção 4.6.1 e, então, lavada com tampão fosfato por duas vezes e adicionada a frascos de cultura de 25 cm² juntamente com 50 mL dos meios sintéticos. Foram preparados frascos distintos com os meios específicos para o crescimento das AOB e das NOB. Antes de colocar a biomassa nos frascos esta foi sonicada por três vezes sucessivas de 30 s em potência de 10 W no modo remoto, utilizando o aparelho sonicador Fisher Scientific Modem 100. Este procedimento foi admitido com o objetivo de desagregar o biofilme e favorecer o crescimento das células em suspensão. No caso dos frascos para o isolamento das AOB foi utilizado o indicador azul de bromotimol 0,04% com o intuito de identificar o consumo do substrato pela mudança de sua coloração do azul (quando em meio básico) para o amarelo (quando em meio ácido). Os frascos de cultura utilizados para o isolamento das bactérias nitrificantes podem ser visualizados na Figura 4.11.

Os frascos foram mantidos em incubadora com agitação orbital (New Brunswick Scientific) por 20 dias a 37°C e 150 rpm. Posteriormente, estes frascos foram abertos em capela de fluxo laminar, para a propagação das culturas enriquecidas em outros frascos contendo meio de cultivo, fresco e estéril, específico para as AOB e as NOB, na proporção 1:20 (cultura enriquecida:meio fresco). Na mesma ocasião estas culturas também foram inoculadas em placas de Petri estéreis, para verificar o crescimento das colônias. Os novos frascos com meio fresco retornaram à incubadora com agitação orbital por mais 20 dias sob as mesmas condições anteriores e as placas de Petri foram incubadas em estufa a 37°C.

Os meios das placas de Petri foram preparados com os meios líquidos específicos para as AOB e as NOB e com agar-agar (18 g L⁻¹). As culturas foram transferidas para as placas de Petri com o auxílio de alça microbiológica descartável sempre em ambiente estéril. Para observar a presença das heterotróficas preparou-se outro meio sintético

específico (Anexo I.3), adaptado de LIN *et al.* (2005), com agar-agar (18 g L⁻¹). Neste meio foram inoculadas as culturas dos frascos do enriquecimento das AOB e das NOB.

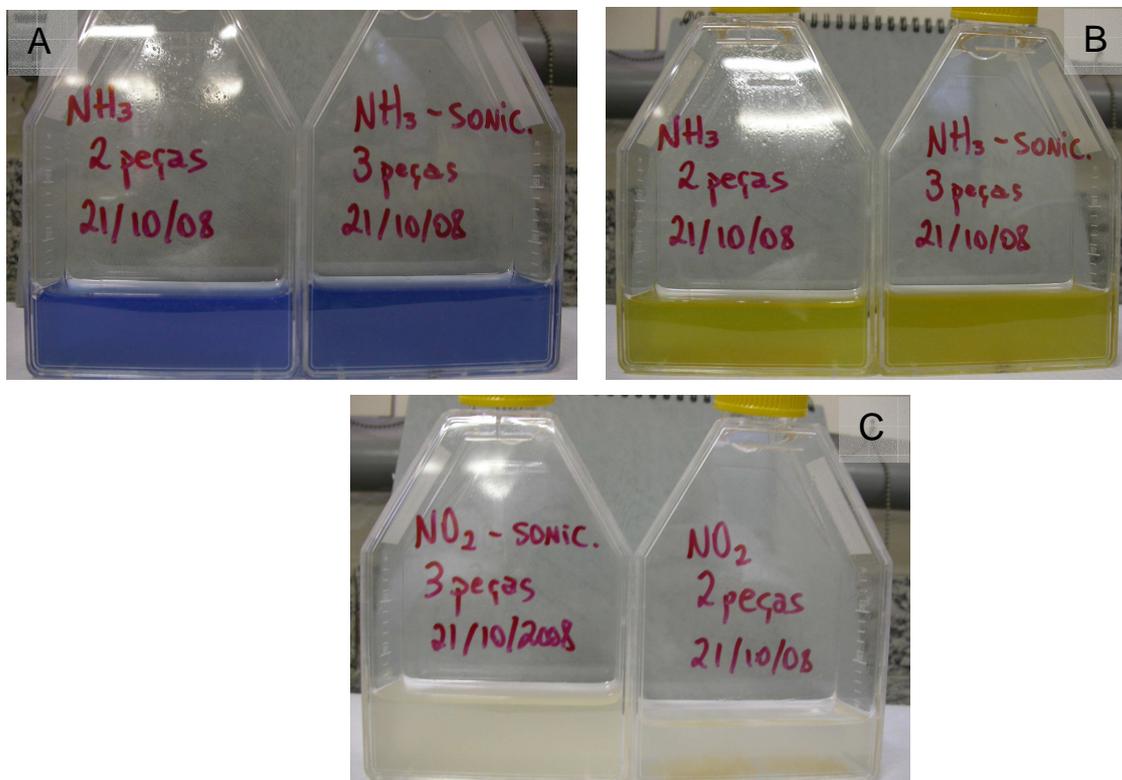


Figura 4.11 – Frascos de cultura para o enriquecimento e isolamento das bactérias nitrificantes presentes no MBBR. A) Solução de enriquecimento para as AOB antes da incubação; B) Solução de enriquecimento para as AOB depois da incubação; C) Solução de enriquecimento para as NOB.

As culturas da segunda fase de enriquecimento e isolamento das bactérias nitrificantes (20 dias após a propagação), foram inoculadas em placas de Petri com os meios e nas condições previamente apresentadas. Estas placas foram incubadas na estufa a 37°C e foram observadas a cada 24 horas pelo período de 10 dias. As colônias que se desenvolveram nas placas foram retiradas com auxílio de uma alça microbiológica e fixadas conforme o procedimento descrito no Anexo I.4 (item I.4.2).

Reiterando, todas as soluções utilizadas foram autoclavadas por 15 min a 121°C e foram manipuladas sob condições assépticas.

4.7.2 Obtenção, fixação e hibridização da biomassa

Foram coletadas amostras da biomassa aderida às biomédias presentes no interior do MBBR nos quatro regimes operacionais estudados para identificar a comunidade nitrificante com a aplicação da técnica de FISH.

Conforme previamente comentado no Capítulo 3, durante a etapa de hibridização as células são expostas a elevadas temperaturas, detergentes e gradientes osmóticos. Portanto, antes da hibridização, as células presentes na biomassa devem ser fixadas, sendo esta etapa essencial para a manutenção da sua integridade morfológica.

A hibridização é realizada em lâminas de vidro cobertas com teflon, o qual perfaz 10 círculos que são chamados de poços, conforme mostrado na Figura 4.12. O teflon que reveste as lâminas confere hidrofobicidade às mesmas, o que evita a mistura de diferentes componentes aplicados aos poços. Para facilitar a aplicação dos reagentes, das amostras e das sondas, as lâminas são cobertas com um gel.

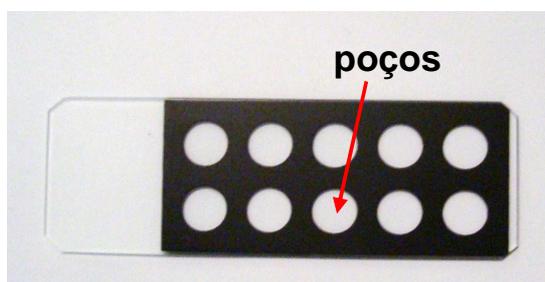


Figura 4.12 – Imagem da lâmina utilizada para a aplicação da técnica de FISH.

Os protocolos utilizados para a obtenção da biomassa, a fixação das células, a preparação das lâminas e a hibridização estão descritos no Anexo I.4.

Os procedimentos utilizados para a aplicação da técnica de FISH foram baseados na metodologia desenvolvida por AMANN *et al.* (1990 e 1995) com adaptações para as condições específicas do presente trabalho. Deu-se início à aplicação da técnica no Laboratório de Microbiologia Básica e Biorremediação da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Concepción no Chile, com continuidade no Laboratório de

Microscopia Ambiental do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A Figura 4.13, adaptada de KIELING (2004), apresenta de forma resumida a aplicação da técnica de FISH.

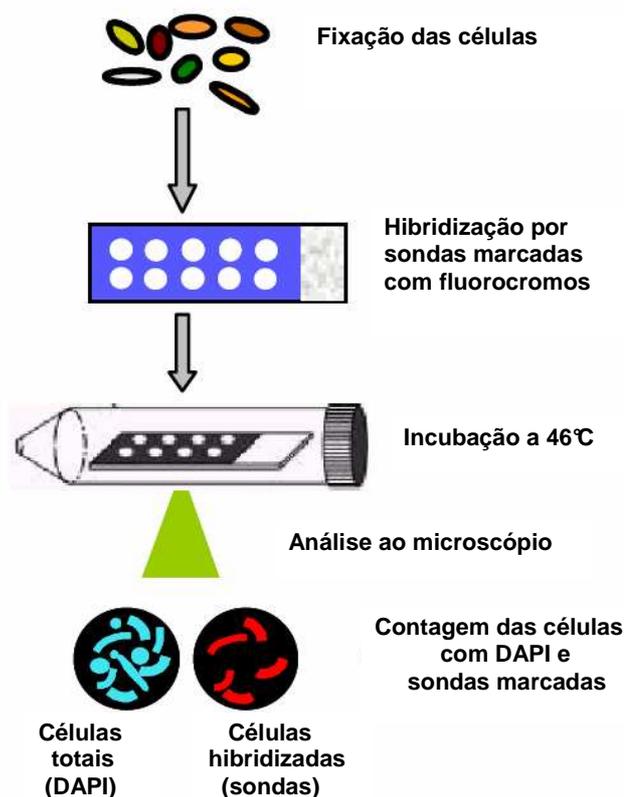


Figura 4.13 – Representação esquemática da aplicação da técnica de FISH, adaptado de KIELING (2004).

4.7.3 As sondas e as condições para a hibridização

Para a identificação das bactérias em geral foi utilizada a sonda de oligonucleotídeos EUB338 que é complementar à região 16S do rRNA de todo domínio *Bacteria*. Para a identificação das nitrificantes, foram utilizadas as sondas de oligonucleotídeos Nit3 (complementar à região 16S do rRNA de *Nitrobacter* spp) e Nso1225 (complementar à região 16S do rRNA de todas as bactérias conhecidas que oxidam amônia, pertencentes à subclasse β -*Proteobacterias*, com exceção de

Nitrosomonas mobilis). As sondas para identificação das nitrificantes foram marcadas com fluoresceína e EUB338 com rodamina. O corante celular DAPI (“4',6 – diamidino – 2 – phenylindole, dihydrochloride”) foi utilizado para assegurar as condições da hibridização aplicada e a integridade das células. As sondas para as nitrificantes foram adquiridas da Empresa Invitrogen e EUB338 foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Microbiologia.

As variáveis da hibridização como a temperatura de dissociação (Td) dos oligonucleotídeos e a concentração de formamida utilizadas foram baseadas nas informações apresentadas na literatura. Optou-se por trabalhar com a temperatura de hibridização fixada em 46°C por ser esta amplamente utilizada. O teor de formamida aplicado está apresentado na Tabela 4.2, a qual também mostra a seqüência dos oligonucleotídeos referente a cada sonda utilizada e as respectivas referências consultadas.

Tabela 4.2 – Sondas de oligonucleotídeos e condições para a hibridização aplicadas no presente trabalho.

Sondas	Seqüência (5'- 3')	Formamida (%)	Referências
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	AMANN <i>et al.</i> , 1990
Nso1225	CGCGATTGTATTACGTGTGA	35	MOBARRY <i>et al.</i> , 1996
Nit3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	MOBARRY <i>et al.</i> , 1996

4.7.4 Observação ao microscópio e aquisição das imagens

As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Alemanha) com lâmpada de mercúrio de 100W, conjunto de filtros para DAPI (02 Carl Zeiss, Alemanha), Rodamina (15 Carl Zeiss, Alemanha) e Fluoresceína (10 Carl Zeiss, Alemanha) e equipado com câmera digital (Color View XS, AnalySiS Co). A Tabela 4.3, adaptada de MOTER e GÖBEL (2000), apresenta os comprimentos de onda de excitação e emissão dos fluorocromos utilizados.

Tabela 4.3 – Fluorocromos utilizados para a identificação dos micro-organismos nitrificantes pela técnica de FISH, adaptada de MOTER e GÖBEL (2000).

Fluorocromos	Comprimento de onda (nm)		
	Excitação	Emissão	Coloração
Fluoresceína-isotiocianato (FITC)	492	528	verde
Rodamina-tatrametil-isotiocianato (TRITC)	557	576	vermelha
DAPI	372	456	azul

4.8 Métodos analíticos

Para todos os parâmetros determinados neste trabalho, referentes ao efluente tratado no MBBR, procurou-se padronizar a nomenclatura utilizada da seguinte forma:

- efluente inicial é aquele amostrado no interior do biorreator após 1 min da alimentação do afluente, ou seja, após o tempo necessário para a homogeneização completa do líquido que entrou no biorreator com a porção que permaneceu no interior do mesmo;
- efluente final é aquele que, passado o tempo de um ciclo de operação do biorreator, foi esgotado e amostrado no barrilhete de recepção do efluente tratado.

4.8.1 Determinação de nitrogênio como N-NH₃, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻

Para a determinação de amônia foi utilizado o método colorimétrico de Nessler segundo o protocolo 4500-NH₃ C descrito pela AWWA (APHA, 1998). O princípio desta técnica está baseado na reação da amônia livre (NH₃) com iodeto de mercúrio e potássio presente no reativo que é altamente alcalino. Esta reação leva à formação de uma dispersão coloidal castanho-amarelada cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de amônia presente na amostra. Embora este método seja indicado para uma restrita faixa de concentração de N-NH₃ (20 µg L⁻¹ até 5 mg L⁻¹) gerando a necessidade de diluição das amostras em praticamente todas as determinações feitas no presente trabalho, é uma técnica de rápida aplicação, com a possibilidade de utilizar quantidades

diminutas de reagente (0,1 mL de reativo de Nessler para 5 mL de amostra) e na qual o íon cloreto não é considerado interferente.

A determinação do teor de amônia nas amostras foi obtido pela leitura da absorvância em espectrofotometro HACH, modelo DR/2010 (o mesmo utilizado para a DQO), a 425 nm, confrontada com a curva padrão de cloreto de amônio na faixa de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ até 5 mg L^{-1} .

Frisa-se, portanto, que no presente trabalho todas as menções ao teor de nitrogênio amoniacal estão relacionadas à amônia (NH_3) e não ao íon amônio (NH_4^+), por conta da técnica de determinação utilizada.

Tanto para a quantificação de amônia, como de nitrito e nitrato, as amostras de efluente foram previamente filtradas em membranas de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45 μm e auxílio de filtração a vácuo, sendo sempre preparadas em triplicata.

Os teores de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) foram determinados por cromatografia iônica. Este método gera resultados confiáveis, porém, requer cuidados na preparação da amostra, principalmente amostras ambientais. O ideal para cromatografia de íons é que sejam anulados ou retirados todos os compostos que não sejam íons, principalmente matéria orgânica, antes da injeção da amostra no cromatógrafo. Esta é uma barreira para a determinação de íons em efluentes, por esta técnica, visto que sua matriz é em grande maioria orgânica. Recomenda-se a utilização de cartucho C_{18} para a remoção de orgânicos da amostra, o que encarece e torna mais demorada as determinações. No presente trabalho optou-se por diluir as amostras com o intuito de se chegar a níveis de orgânicos na faixa de ppb. A análise de íons em concentrações muito elevadas (g L^{-1}) também não é recomendada, pois pode saturar rapidamente a coluna. Nestes casos também se utiliza o recurso da diluição.

As amostras para a determinação do nitrito e do nitrato, em todos os regimes operacionais, foram diluídas no mínimo 100 vezes. Na condição de 12 $\text{g Cl}^- \text{L}^{-1}$, as amostras antes de serem diluídas, foram filtradas em cartuchos de prata (Onguard®IIAg - Dionex) para a remoção do íon cloreto.

O cromatógrafo de íons utilizado para estas determinações foi o da marca DIONEX, modelo ICS90 com supressão e detector de condutividade ASRS®-ULTRA. Para a determinação dos íons nitrito e nitrato foi empregada a coluna aniônica modelo AS14A 4-mm precedida de uma pré-coluna. O eluente empregado foi o carbonato de sódio (marca Sigma-Aldrich) em solução com concentração final de 8 mmol L⁻¹ e como regenerante solução de ácido sulfúrico (marca Sigma-Aldrich) na concentração final de 25 mmol L⁻¹. O tempo de corrida de cada determinação foi de 16 min e os tempos de retenção para os íons de interesse foram 5,9 e 8,4 min para NO₂⁻ e NO₃⁻, respectivamente.

4.8.2 Determinação de cloreto

A determinação do teor de cloreto nas amostras do afluente bruto industrial foi realizada pelo método titulométrico de Möhr, conforme a norma NT-202.R10, descrita e recomendada pela FEEMA (1986).

4.8.3 Determinação da demanda química de oxigênio

No presente trabalho foram determinadas a DQO total e a DQO dissolvida para as amostras do afluente industrial e para as amostras referentes ao início e ao final dos ciclos operacionais do MBBR, com exceção do regime operacional com 12 g Cl⁻ L⁻¹.

A DQO dissolvida difere da total pela passagem da amostra através de membranas de acetato de celulose de 0,45µm de diâmetro de poro com auxílio de filtração à vácuo. Este procedimento permite remover as substâncias orgânicas associadas aos sólidos suspensos presentes na amostra.

Para concentrações de cloreto de até 2.000 mg L⁻¹ a DQO foi avaliada segundo a norma 5.220D recomendada pela AWWA (APHA, 2005). Este é o método colorimétrico por refluxo fechado que utiliza o dicromato de potássio como oxidante e o sulfato de prata em ácido sulfúrico como agente catalisador da reação. Para as amostras com concentrações de cloreto entre 2.000 e 6.000 mg L⁻¹ utilizou-se o método adaptado por FREIRE e SANT'ANNA JR. (1998) o qual está baseado nos princípios apresentados acima com pequenas modificações. Para as amostras com teor de cloreto acima de 6.000 mg L⁻¹ a DQO não foi determinada.

A absorvância das amostras oxidadas foi medida no espectrofotômetro HACH, modelo DR/2010 no comprimento de onda de 600 nm relativo à curva de calibração para valores de DQO na faixa de 100 a 1000 mg L⁻¹.

4.8.4 Determinação de carbono orgânico dissolvido

O teor de carbono orgânico dissolvido (COD) foi determinado utilizando-se o analisador de carbono orgânico total (COT) da marca Shimadzu, modelo TOC-5000A. O aparelho em questão promove combustão completa de todo carbono orgânico presente na amostra em condições severas de temperatura com auxílio de catalisador e o carbono inorgânico é diretamente transformado, por outra via, em gás carbônico sendo os dois detectados por um analisador infravermelho. A diferença entre o CO₂ total e o obtido via compostos inorgânicos permite identificar a quantidade de COT no material analisado.

No presente trabalho foi determinado apenas o teor de COD por conta das amostras terem sido filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45µm de diâmetro de poro.

Assim como para a DQO, existe uma limitação na utilização do aparelho para amostras com elevadas concentrações salinas, sendo que acima de 3.000 mg L⁻¹ deve-se diluir o efluente. Porém, por conta da elevada sensibilidade do equipamento foi possível trabalhar com diluições de até 10 vezes para as amostras com maior teor de sal, o que seria inviável no caso da DQO.

O método aplicado para as determinações de COD seguiu os procedimentos 5310A e B padronizados pela AWWA (APHA, 2005).

4.8.5 Determinação de sólidos suspensos totais e voláteis

O teor de sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV) do efluente líquido foi obtido por gravimetria utilizando-se o método de resíduo seco a 105 e 550°C. Volumes conhecidos das amostras foram filtrados com membranas de fibra de vidro sob filtração à vácuo. O resíduo retido na membrana foi levado à estufa a 100°C por no mínimo 12 horas e posteriormente à mufla a 550°C por 1 hora.

O resultado obtido após a estufa é referente aos SST. Após a calcinação se obtém o resultado dos SSV, os quais geralmente estão associados à porção orgânica da amostra e, portanto, podem indicar o teor da biomassa presente nas amostras de lodos e biofilmes. No caso do presente trabalho este procedimento também foi utilizado para a quantificação da biomassa aderida às biomédias do MBBR, porém entendeu-se que a terminologia mais apropriada a ser utilizada neste caso seria sólidos totais e voláteis (ST e SV), conforme apresentado anteriormente.

Os testes foram realizados segundo as metodologias 2540D e 2540E recomendadas pela AWWA (APHA, 2005).

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização do efluente industrial

A Tabela 5.1 apresenta os valores médios e os respectivos desvios padrão dos resultados obtidos na caracterização do efluente industrial utilizado no trabalho. Os dados referem-se a todo o período experimental.

Tabela 5.1 – Caracterização do efluente industrial.

Parâmetros	Média e desvio
N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	50 ± 23
N-NO ₃ (mg L ⁻¹)	2,2 ± 1,3
Cloreto (mg L ⁻¹)	50 ± 12
SST (mg L ⁻¹)	210 ± 101
SSV (mg L ⁻¹)	156 ± 69
pH	7,1 ± 0,3

A ocorrência de elevada variabilidade nos dados apresentados na Tabela 5.1 é característica típica de efluentes industriais. Vale salientar que os valores de nitrato no efluente são muito baixos, evidenciando que a nitrificação foi praticamente nula no processo biológico que gerou o efluente utilizado no presente trabalho.

As substâncias orgânicas remanescentes no efluente industrial por várias vezes influenciaram o processo de nitrificação. Por conta desta questão, os resultados médios e seus desvios padrão, obtidos na quantificação da matéria orgânica por DQO (total e dissolvida) e COD, são apresentados separadamente para cada condição operacional, como pode ser observado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Teor de matéria orgânica do efluente industrial.

Etapas	DQO_t (mg L⁻¹)	DQO_d (mg L⁻¹)	COD (mg L⁻¹)	DQO_d/COD
250 dias iniciais	341 ± 197	255 ± 131	n.d	n.d
Regime 1	278 ± 205	215 ± 132	68 ± 27	2,9 ± 0,2
Regime 2	230 ± 91	179 ± 48	72 ± 23	3,0 ± 0,2
Regime 3	218 ± 53	174 ± 32	62 ± 13	2,9 ± 0,3
Regime 4	231 ± 17	178 ± 27	55 ± 9	3,2 ± 0,2

DQO_t - Demanda Química de Oxigênio total

DQO_d - Demanda Química de Oxigênio dissolvida

n.d - não determinado

Os valores de DQO determinados sugerem que poderia ocorrer o favorecimento das bactérias autotróficas nitrificantes no biofilme, porém, a variabilidade apresentada revelou grande influência sobre o processo de nitrificação, como será comentado posteriormente.

Nos casos em que o efluente industrial apresentou concentrações de DQO bem superiores aos valores médios, a matéria orgânica presente, muito provavelmente biodegradável, estava associada a problemas operacionais da ETDI na própria indústria. Por conta disso e da constatação da relevante influência que a matéria orgânica causou no processo de nitrificação, a partir da metade do segundo regime operacional, optou-se por efetuar um controle mais criterioso na coleta e/ou utilização do efluente, para garantir que a ETEI da indústria estivesse com bom desempenho, ou seja, baixa DQO.

As razões DQO_d/COD, apresentadas na Tabela 5.2, mostram que as relações entre DQO e carbono orgânico dissolvido obtidas para o efluente foram praticamente constantes e se situam próximas ao valor 3.

Determinações da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) foram realizadas em 3 amostras do efluente industrial coletadas no último regime operacional. Estes ensaios foram gentilmente realizados no Laboratório de Engenharia Sanitária do Departamento de Engenharia Sanitária e Meio Ambiente da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). A metodologia utilizada foi a preconizada pelo método 5210 B DBO₅. Os resultados obtidos para a DBO₅ foram nulos, o que levou à conclusão de que a matéria

orgânica remanescente no efluente, para o quarto regime operacional foi prioritariamente recalcitrante. No Anexo II encontram-se dois cromatogramas de amostras distintas do efluente industrial, obtidos por cromatografia a gás acoplada a detector seletivo de massas. Os mesmos permitem constatar a complexidade e diversidade das substâncias presentes no efluente industrial mesmo depois de tratado biologicamente. Estas análises foram realizadas no Instituto de Química da UFRJ, no Laboratório de Cinética Aplicada à Química Atmosférica e Poluição.

5.2 Condições operacionais

Os testes de capacidade de homogeneização do reator e distribuição das biomédias foram realizados com a injeção de uma solução corante no ponto de alimentação do biorreator e apresentaram resultado satisfatório. A homogeneização total do meio líquido se deu em menos de um minuto. A Figura 5.1 mostra o reator antes da realização do teste e depois do mesmo finalizado, um minuto após a adição do corante.

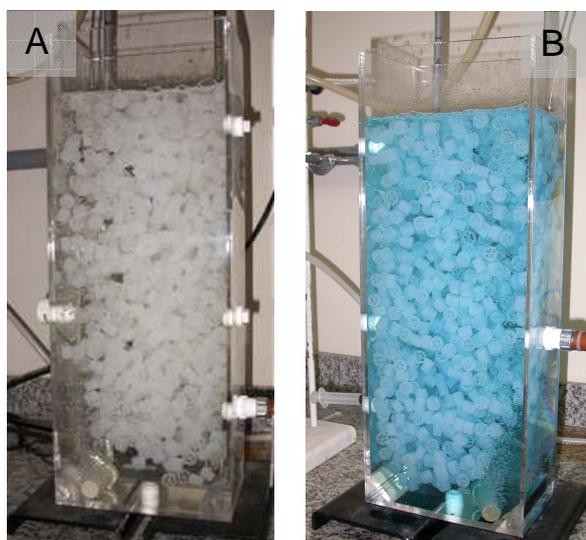


Figura 5.1 – Fotos ilustrativas do teste de capacidade de homogeneização do meio líquido e da distribuição das biomédias; A) antes de iniciar o teste; B) após 1 min da injeção do corante.

A capacidade de oxigenação do meio líquido foi obtida a partir de testes para a determinação do coeficiente de transferência de oxigênio ($K_L a$) e se mostrou satisfatória.

No que se refere ao funcionamento da automação, problemas com entupimento das válvulas solenóides foram constantes durante todo o período de operação do sistema. Problemas iniciais (seis primeiros meses de funcionamento) com o controle de nível do biorreator foram solucionados com o afastamento das peças responsáveis pelo acionamento do sistema das paredes do reator e, também, com o controle de segurança por tempo.

Os primeiros testes de conversão da amônia realizados para selecionar o tempo de aeração do ciclo operacional foram conduzidos depois do trigésimo dia de operação do MBBR. O acompanhamento da amônia removida e dos valores de pH no início e ao final de um ciclo mostrou que a nitrificação já havia se estabelecido. A Figura 5.2 expressa graficamente a variação dos valores de pH desde o início até completar 40 dias da operação do biorreator.

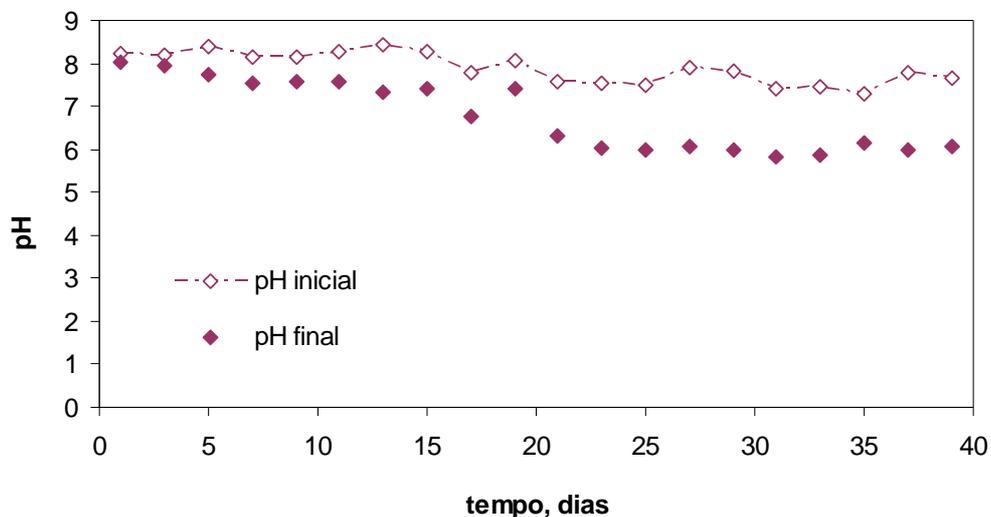


Figura 5.2 – Variação do pH ao longo do tempo, medido no início e ao final de cada ciclo operacional, nos primeiros 40 dias de operação do MBBR.

Observa-se na Figura 5.2 que até 15 dias de operação não ocorreram variações efetivas de pH no processo, e que a partir de então a diferença de pH entre o início e o

final do ciclo tornou-se mais significativa, evidenciando a ação nitrificante da biomassa, que é caracterizada pela formação dos íons H^+ .

O oxigênio dissolvido no biorreator também foi monitorado e permaneceu na faixa de 7,5 a 8,5 $mg L^{-1}$. Esta concentração de OD garante que não houve, em qualquer momento, a inibição do processo por falta de oxigênio. A temperatura do meio reacional foi a temperatura ambiente do laboratório, que em grande parte do período de operação do MBBR foi de $24 \pm 2^\circ C$.

A Figura 5.3 apresenta graficamente os valores médios e os seus respectivos desvios padrão, para nitrogênio amoniacal e pH, obtidos a partir dos resultados de três testes de oxidação amostrados durante 10 horas. O oxigênio dissolvido durante todo o período dos testes se manteve entre 8,2 e 8,7 $mg L^{-1}$. Nitrito e nitrato não foram monitorados.

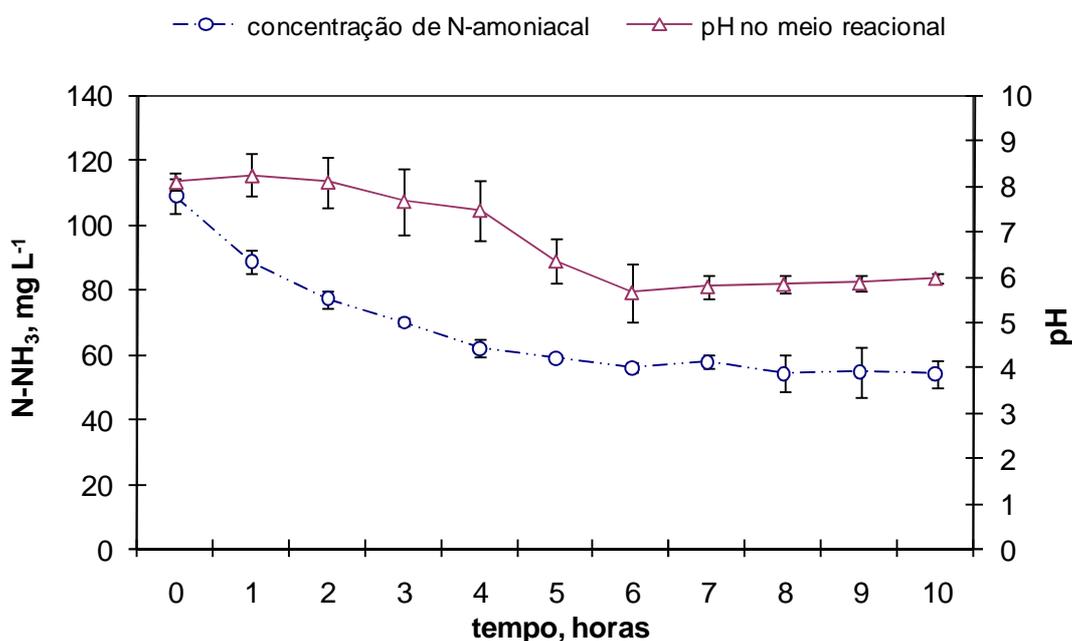


Figura 5.3 – Resultados de nitrogênio amoniacal e pH para a primeira batelada de testes de acompanhamento da conversão de amônia.

Dos resultados mostrados na Figura 5.3 depreende-se que até 6 horas de aeração foi removido, em média, 45% do nitrogênio amoniacal alimentado. Nas 4 horas seguintes

os valores da amônia permaneceram praticamente constantes e coincidiram com a redução do pH (valores inferiores a 7,0). Sugere-se que pode ter ocorrido inibição das bactérias que oxidam amônia (AOB) devido à redução dos valores de pH do meio reacional, por conta da produção dos íons hidrogênio resultantes da própria oxidação da amônia.

Uma das prováveis causas desta inibição é a possível presença do ácido nitroso, conforme apresentado na seção 3.4.1. Segundo SCHMIDELL e REGINATTO (2007), muito provavelmente, o ácido nitroso é o verdadeiro inibidor da ação das bactérias nitrificantes.

A partir da provável inibição do processo de oxidação da amônia, por conta da diminuição do pH, procurou-se suprir alcalinidade suficiente ao meio líquido para neutralizar o efeito dos íons H^+ gerados durante a nitrificação. No início foi adicionada quantidade previamente determinada de carbonato de sódio (barrilha) ao efluente preparado para ser alimentado ao biorreator. Segundo GERARD (2002), cerca de 7,1 kg de alcalinidade ($CaCO_3$) são consumidos por kg de amônia oxidada. Posteriormente, quando a etapa anóxica foi desabilitada, deu-se início ao suprimento automatizado de barrilha: uma solução concentrada de carbonato de sódio armazenada em um barrilhete colocado lateralmente acima do sistema (para promover a alimentação por gravidade) permaneceu acoplada a uma válvula solenóide e na seqüência, ao biorreator, por meio de mangueiras de silicone; quando o aparelho de medição do pH, colocado em linha, detectava valores de pH abaixo de 7,0, promovia-se o acionamento (abertura) da válvula solenóide e permitia-se a entrada da barrilha pelo período necessário até que o eletrodo de pH detectasse novamente valores acima de 7,0, acionando-se a válvula, que era fechada de modo automático.

Passado o período de adaptação a esta nova condição, foi realizada nova batelada de testes de conversão da amônia. A Figura 5.4 apresenta graficamente os valores médios e os seus respectivos desvios padrão, em termos de nitrogênio amoniacal e da eficiência na sua conversão, obtidos a partir dos resultados de três testes amostrados durante 10 horas.

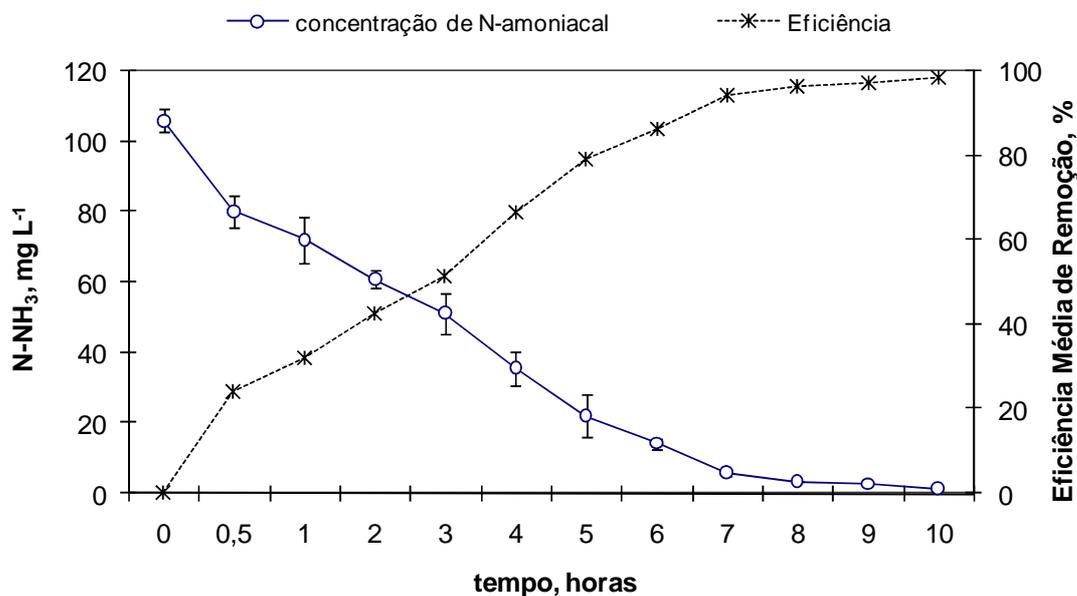


Figura 5.4 – Valores médios de nitrogênio amoniacoal e sua eficiência de remoção, obtidos ao longo de 10 h durante a segunda batelada de testes de acompanhamento da conversão de amônia.

Como pode ser observado na Figura 5.4, é notório que os resultados obtidos para a oxidação da amônia, nesta segunda batelada de testes, mostraram substancial ganho em termos da capacidade de biodegradação do substrato (NH₃), alcançando conversão praticamente total (97%) do nitrogênio amoniacoal em 8 horas de teste. A partir destes resultados é possível considerar que a inibição da nitrificação foi solucionada pelo controle da alcalinidade no meio reacional.

Durante estes ensaios foi possível determinar a formação do nitrato. A Figura 5.5 expressa graficamente os resultados médios e os respectivos desvios padrão obtidos para a formação do nitrato, nos três testes realizados, assim como o perfil de conversão da amônia e a estimativa da possível formação do nitrito. O teor de nitrito foi calculado a partir do balanço de nitrogênio das três principais substâncias nitrogenadas envolvidas no processo de nitrificação convencional (amônia, nitrito e nitrato).

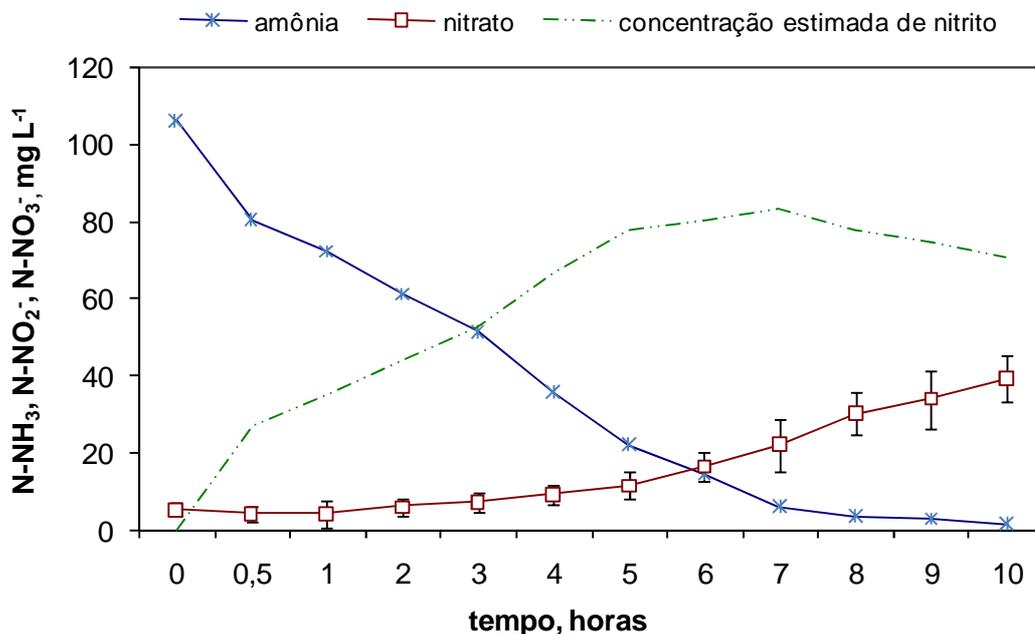


Figura 5.5 – Valores médios de nitrato formado, perfil de amônia e a estimativa da formação de nitrito ao longo de 10h durante a segunda batelada de testes de acompanhamento da conversão de amônia.

Pelo perfil de formação do nitrato apresentado na Figura 5.5, infere-se que até aproximadamente 5 horas de teste ocorreu algum tipo de inibição das bactérias que oxidam nitrito (NOB), e que, somente a partir deste ponto, ocorreu a conversão a nitrato, porém, de forma não muito expressiva até o final do teste. A hipótese que pode ser considerada para este caso, baseada em relatos da literatura, é que o pH básico, em torno de 8,0, favoreceu a presença de NH_3 livre o que inibiu a atividade das NOB até aproximadamente 5 horas de teste. A partir deste ponto, quando a maior parte da amônia já havia sido convertida, as NOB voltaram a ter atividade, o que culminou na formação do nitrato, porém, em quantidades muito aquém das esperadas.

Estes resultados para a conversão do nitrato, principalmente após as primeiras 5 horas de teste, também poderiam sugerir a ocorrência da nitrificação e desnitrificação simultâneas (SND), levando em consideração que o biofilme estava bem estabelecido e poderia conter zonas anóxicas. Porém, comparando os valores de OD observados durante os testes com os valores apresentados na literatura, para sistemas que promoveram a SND (HOLMAN e WAREHAM, 2005), esta hipótese pode ser descartada.

Conforme apresentado na seção 3.3, alguns pesquisadores sugerem que o acúmulo de nitrito no processo de nitrificação é influenciado pela combinação do pH, temperatura e oxigênio dissolvido.

VILLAVERDE *et al.* (1997) determinaram, em seus experimentos, a interferência dos valores de pH, entre 7,0 e 8,5, na ação das NOB. Os autores observaram que a partir de pH igual a 7,5 deu-se início ao acúmulo do nitrito até o patamar de 85% para pH igual a 8,5. Este acúmulo foi associado à inibição seletiva das NOB por conta da amônia livre detectada, a qual também aumentou exponencialmente para valores de pH acima de 7,5. Similarmente, SURMACZ-GORSKA *et al.* (1997) constataram que o pH é o parâmetro decisivo na inibição da atividade das NOB e sugerem que é possível acumular nitrito controlando o pH em torno de 8,0.

Para ABELING e SEYFRIED (1992), o principal parâmetro a ser controlado na remoção de nitrogênio via nitrito, foi a concentração de amônia livre que, por sua vez, está relacionada com o teor de N-amoniaco no efluente, com o pH e com a temperatura. Segundo os autores, tanto *Nitrosomonas* como *Nitrobacter* são inibidas por amônia livre, no entanto, *Nitrobacter* são mais sensíveis, sendo inibidas em concentrações mais baixas.

No que se refere aos experimentos anteriormente relatados, os valores de pH permaneceram por todo o período dos testes em torno de 8,0, por ter sido adicionada alcalinidade suficiente ao efluente alimentado ao MBBR. O efetivo consumo de OD, diferentemente do que foi observado na primeira batelada destes ensaios, corroborou a evidente melhoria na taxa de oxidação da amônia. No início dos testes, período mais ativo da comunidade nitrificante, os valores de OD chegaram, em média, a 4,0 mg L⁻¹ e ao final de 10 horas retornaram a valores próximos ao da saturação na água, evidenciando a finalização da oxidação dos substratos. Tais observações podem ser visualizadas na Figura 5.6.

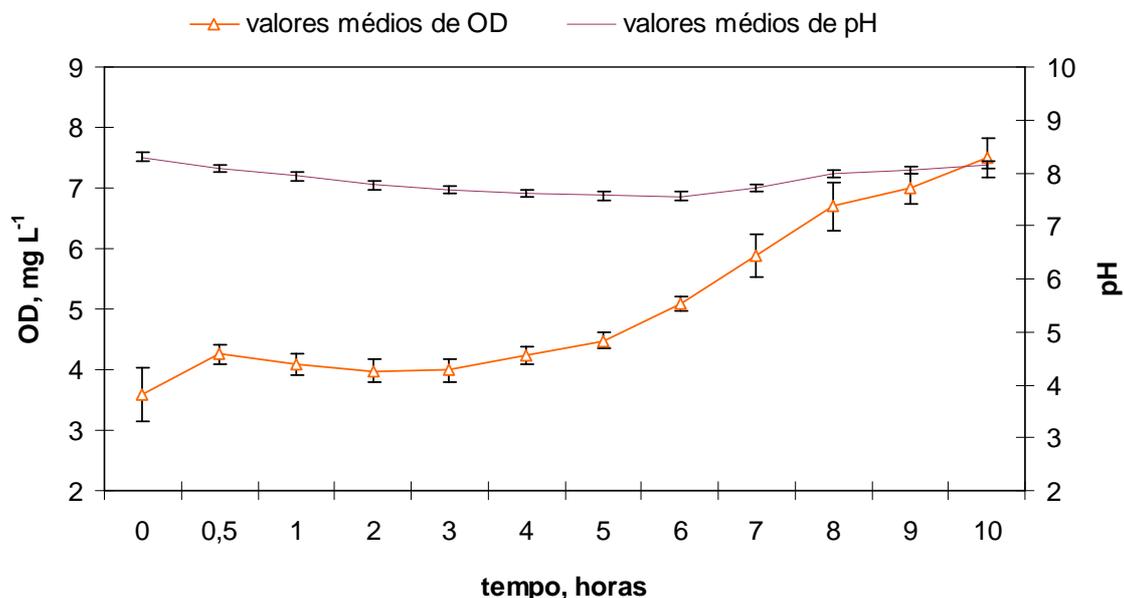


Figura 5.6 – Resultados médios dos valores de pH e OD para a segunda batelada de testes de acompanhamento da conversão de amônia.

A temperatura média durante estes ensaios manteve-se acima de 30°C, diferentemente da maior parte do período de operação do MBBR, por conta de problemas na manutenção da temperatura ambiente do laboratório, que coincidiu com a estação do verão.

Mediante a apresentação destes resultados, pode-se inferir que a hipótese de acúmulo do nitrito é bastante provável por conta dos valores de pH e temperatura estarem próximos aos das condições apresentadas na literatura para promover a inibição das NOB.

ZDRADEK (2005) confirmou, pela aplicação de testes respirométricos em um reator de nitrificação, operado na forma de bateladas seqüenciais, que a máxima atividade microbiana para as AOB foi alcançada na condição de pH igual a 8, coincidindo com os valores observados nos experimentos que estão sendo discutidos no presente trabalho.

SINHA e ANNACHHATRE (2007) investigaram o efeito da variação dos parâmetros operacionais pH, T e OD na nitrificação. O principal objetivo do trabalho foi obter as condições ideais para promover a nitrificação parcial em um efluente sintético inorgânico. Os experimentos conduzidos em pH igual a 8,0 e temperatura de 35°C

levaram à melhor condição de acúmulo do nitrito. As condições ideais de oxigênio dissolvido no meio reacional foram observadas para valores da ordem de 0,3 a 0,5 mg L⁻¹. Nos ensaios de determinação do efeito específico do pH sobre a nitrificação, nos quais o pH foi controlado e manteve-se em torno de 8,0 (Figura 5.7), o perfil dos resultados obtidos para amônia e nitrito foi similar aos que foram anteriormente apresentados para este trabalho, quando levada em consideração a hipótese do acúmulo de nitrito (Figura 5.5).

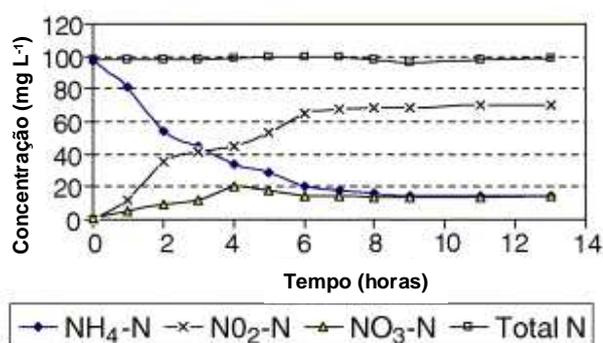


Figura 5.7 – Resultados da conversão de nitrogênio amoniacal sob condições controladas de pH (igual a 8,0), apresentados por SINHA e ANNACHHATRE (2007).

Como o principal objetivo do acompanhamento da biodegradação da amônia foi selecionar o tempo da fase aeróbia do ciclo operacional, determinou-se com base nos resultados apresentados que o tempo de duração desta etapa deveria permanecer o mesmo do início da operação do biorreator, ou seja, o tempo de reação para promover a nitrificação foi fixado em 12 h. Esta decisão foi tomada devido à constatação da grande variabilidade dos parâmetros relacionados ao sistema e de que a melhor condição de oxidação da amônia, até aquele momento, foi alcançada dentro do tempo proposto (10 h).

Definidas as condições operacionais de tempo e alcalinidade na etapa nitrificante (aeróbia), deu-se início à implementação da desnitrificação (etapa anóxica). Para esta finalidade, etanol foi adicionado ao biorreator como fonte externa de carbono, no início da etapa anóxica (duração de 12 horas) de cada ciclo operacional e de maneira automatizada. Supondo a conversão total de amônia em nitrato e assumindo a razão DQO/N-NO₃⁻ igual a 6 (ABELING e SEYFRIED, 1992) como sendo a razão ideal para promover a desnitrificação, foi calculada a quantidade necessária de etanol para

suplementar o meio reacional. O procedimento para a alimentação do etanol ao biorreator foi praticamente o mesmo descrito anteriormente para a adição de barrilha, porém, o parâmetro de controle da quantidade a ser adicionada foi o tempo de abertura da válvula, diferentemente do caso da barrilha, no qual o parâmetro de controle foi o pH. Uma solução na proporção (1:20, v v⁻¹) de álcool absoluto foi preparada e colocada no barrilhete de alimentação. Foram realizados testes para ajustar o tempo de abertura da válvula à vazão de entrada desta solução que garantisse a quantidade de etanol necessária à desnitrificação.

A etapa referente à implantação da desnitrificação foi iniciada quando o reator completou 150 dias de operação e, a partir desta data, observou-se o declínio gradativo na eficiência de conversão da amônia, culminando na perda completa da atividade nitrificante. Manteve-se a fase desnitrificante por 35 dias. A partir do momento que não se obteve mais resultados positivos para a conversão da amônia e nenhum indício de recuperação da mesma, optou-se por cessar a desnitrificação e retomá-la, se possível, em outro momento. Foram necessários 30 dias, após a retirada da alimentação do etanol ao biorreator, para a recuperação da nitrificação. Visto que a adição de matéria orgânica ao meio reacional foi extremamente prejudicial à comunidade microbiana autotrófica, deu-se por encerrada a possibilidade de retomar a desnitrificação neste biorreator nas condições apresentadas. Portanto, a partir dos 185 dias de operação o ciclo operacional do MBBR passou a ter 730 minutos sendo: 5 min para a alimentação do afluente, 715 min de aeração, 5 min para a decantação e 5 min para o esgotamento do efluente tratado.

A incompatibilidade da fase nitrificante previamente estabelecida com a tentativa de implantação da desnitrificação ocorreu, muito provavelmente, devido à equivocada escolha da relação DQO/N aliada à forma de alimentação do etanol no MBBR. Infere-se que a alimentação de quantidades excessivas de etanol ao biorreator ocasionou o desequilíbrio da comunidade microbiana presente, o que favoreceu o crescimento das bactérias heterotróficas em detrimento das autotróficas (responsáveis pela nitrificação). A quantificação da biomassa durante este período, por determinações gravimétricas do biofilme, mostrou a ocorrência de crescimento brusco e acentuado da biomassa aderida. Estes resultados serão apresentados na seção 5.6.1.

A Figura 5.8 expressa graficamente os valores de nitrogênio amoniacal no início e no final dos ciclos operacionais, monitorados durante os primeiros 250 dias de operação do MBBR.

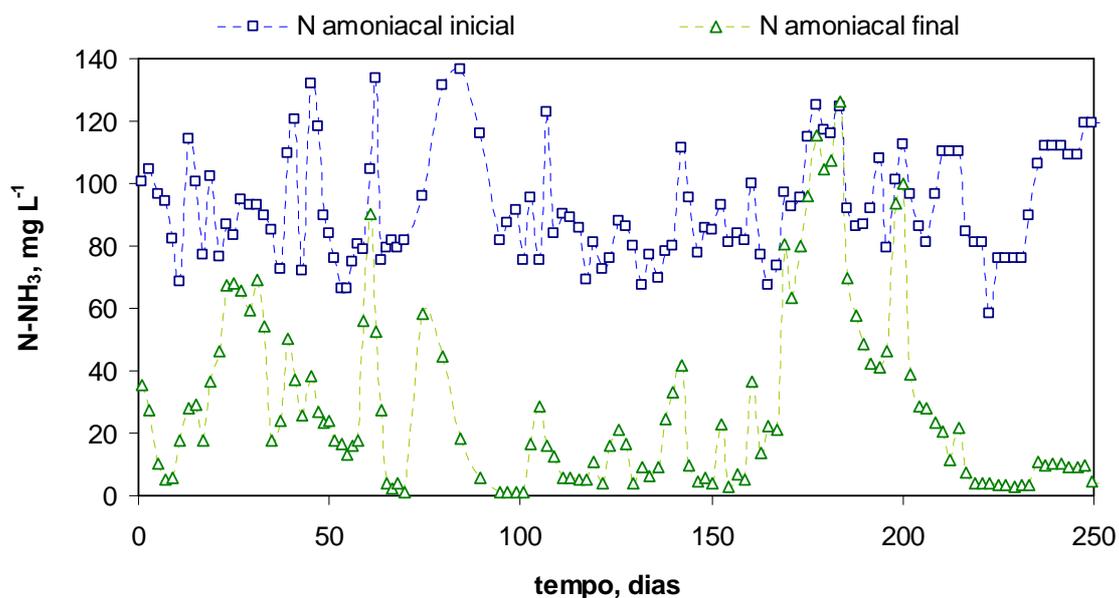


Figura 5.8 – Resultados da conversão de nitrogênio amoniacal desde o início da operação do biorreator até os 250 dias subsequentes.

A Tabela 5.3 sumariza os valores médios e os respectivos desvios padrão dos resultados relativos ao desempenho da conversão do nitrogênio amoniacal, conforme mostrados na Figura 5.8. Para apresentar estes resultados os mesmos foram divididos em quatro conjuntos de dados distintos, caracterizados pela maior ou menor variabilidade na eficiência de conversão da amônia. Foram destinados 60 dias para compor o conjunto de dados representativos da etapa referente ao início da desnitrificação até a retomada da nitrificação.

Tabela 5.3 – Resultados da conversão de nitrogênio amoniacal na primeira etapa de operação do MBBR.

Período (dias)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)		Eficiência de conversão (%)
	Inicial	final	
primeiros 90	93 ± 19	32 ± 22	65 ± 23
60 intermediários	85 ± 13	12 ± 10	87 ± 12
60 refs. desnitrificação	95 ± 16	54 ± 38	47 ± 32
últimos 40	98 ± 18	9 ± 6	91 ± 6

Embora as evidências de que o desempenho da nitrificação esteve diretamente associado às condições operacionais do processo, deve-se ressaltar que o teor de matéria orgânica, oriundo do efluente industrial, também apresentou forte influência sobre este desempenho. Para melhor relatar esta observação a Figura 5.9 expressa a relação dos valores médios de DQO inicial total e dissolvida *versus* eficiência de conversão do nitrogênio amoniacal, para os quatro conjuntos de dados apresentados na Tabela 5.3.

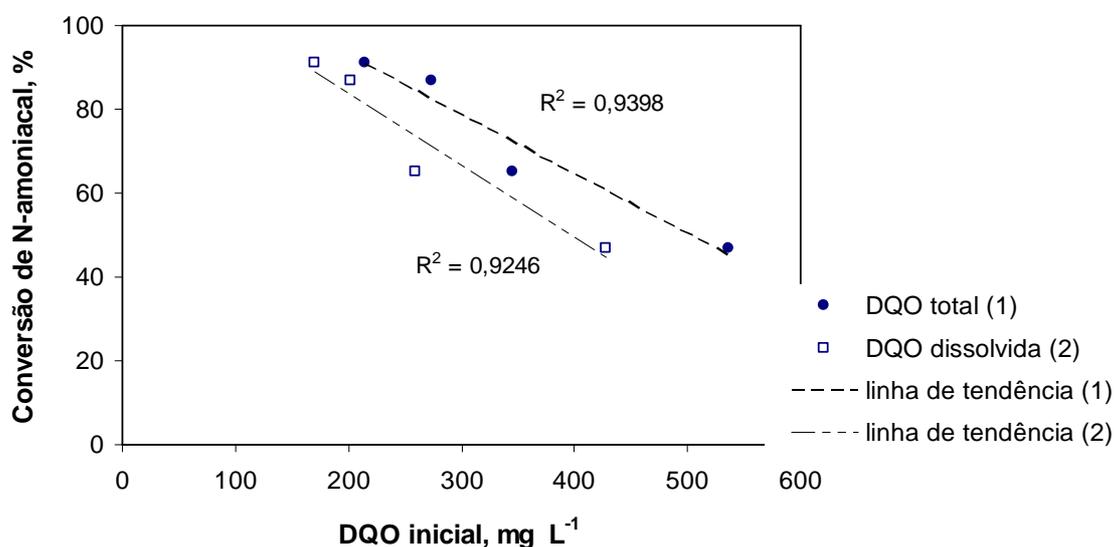


Figura 5.9 – Conversão de nitrogênio amoniacal *versus* DQO inicial para os quatro conjuntos de dados relativos aos primeiros 250 dias de operação do MBBR.

Apesar dos valores de R^2 obtidos para a correlação proposta não terem sido excelentes ($R^2 = 0,9398$ para a DQO inicial total e $R^2 = 0,9246$ para a DQO inicial

dissolvida), observa-se forte tendência de queda na eficiência de conversão do nitrogênio amoniacal com o aumento da DQO inicial, tanto para a DQO dissolvida como para a total. Os pontos mais deslocados em relação à linha de tendência retratam a fase inicial de operação do MBBR, sendo que neste período observou-se o maior desvio padrão para os dados relativos à DQO (Figura 5.10), podendo ser esta uma justificativa para os valores de R^2 .

Os resultados da eficiência média de remoção da matéria orgânica, em termos da DQO total e dissolvida, estão sumarizados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Resultados médios e seus respectivos desvios padrão para a eficiência de remoção da DQO total e dissolvida na fase inicial de operação do MBBR.

Período referente aos 250 dias iniciais de operação do MBBR (dias)	Eficiência de Remoção para a DQO total (%)	Eficiência de Remoção para a DQO dissolvida (%)
primeiros 90	36 ± 10	30 ± 10
60 intermediários	36 ± 14	24 ± 16
60 refs. desnitrificação	33 ± 11	32 ± 7
últimos 40	30 ± 4	12 ± 5

É interessante observar que a eficiência de remoção da DQO total, em média, não apresentou diferença significativa nesta fase de operação. Em relação à DQO dissolvida os resultados médios mostram, além da alta variabilidade, expressa pelos valores do desvio padrão, menor remoção nos últimos 40 dias. Sugere-se que a queda de eficiência observada ocorreu por conta dos menores valores de DQO oriundos do efluente industrial, com grande parcela de substâncias recalcitrantes.

A Figura 5.10 expressa graficamente, de maneira resumida, os resultados médios e os respectivos desvios padrão obtidos para a DQO inicial e final (total e dissolvida). Estes dados estão relacionados àqueles apresentados na Tabela 5.4. Os valores mais expressivos observados na etapa referente à desnitrificação estão diretamente relacionados à alimentação da fonte externa de carbono ao biorreator na forma de etanol.

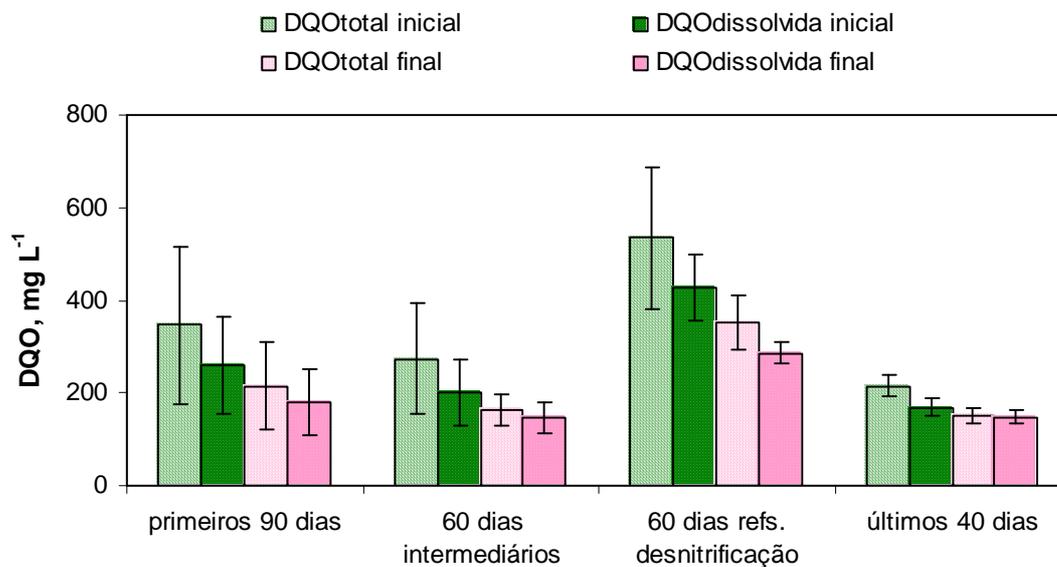


Figura 5.10 – Resultados médios da DQO inicial e final, total e dissolvida, desde o início da operação do MBBR até os 250 dias subsequentes.

Os resultados obtidos para os teores de sólidos suspensos no início e no final dos ciclos operacionais estão apresentados na Figura 5.11. Observa-se que a concentração de sólidos no final do ciclo foi sempre inferior àquela do início. Apenas no período entre 160 e 180 dias os valores de sólidos no efluente final foram superiores ao do efluente inicial, por conta do excessivo aporte de matéria orgânica no biorreator (etapa da desnitrificação), o que promoveu o crescimento da biomassa também em suspensão. A variabilidade dos sólidos suspensos (SST e SSV) iniciais foi inerente às características do efluente industrial. As relações SSV/SST no efluente inicial e final resultaram nos valores, $0,73 \pm 0,12$ e $0,67 \pm 0,14$, respectivamente.

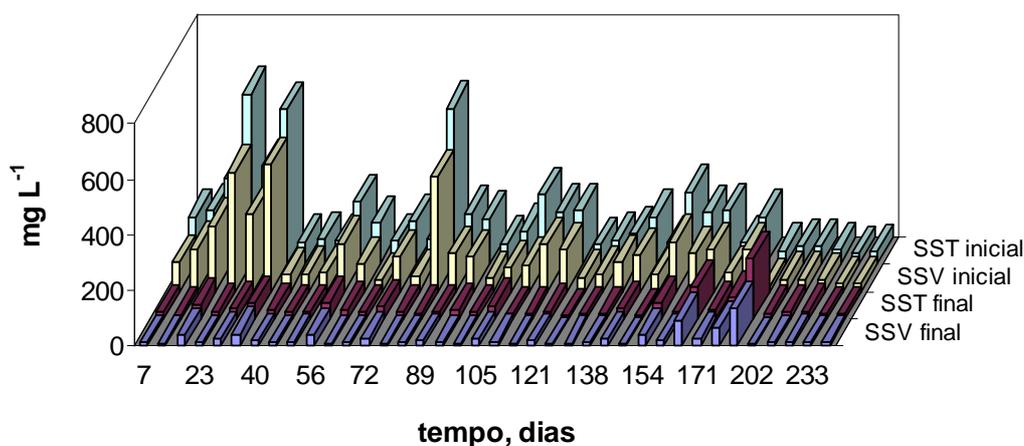


Figura 5.11 – Acompanhamento dos SST e SSV no efluente inicial e final do ciclo operacional, durante os primeiros 250 dias de trabalho do MBBR.

5.3 Apresentação dos regimes operacionais

Os últimos 40 dias do período inicial de operação do MBBR apresentaram desempenho relativamente estável para a conversão de amônia. A partir de então, deu-se início ao primeiro regime operacional dos quatro propostos para este trabalho. A Figura 5.12 ilustra a distribuição destes regimes no tempo, associados ao perfil da salinidade, sendo este representado pelo teor do íon cloreto (Cl⁻). O tempo de operação dos regimes incluiu o período de adaptação da biomassa para cada nova condição e foi distinto nos quatro casos, devido às peculiaridades de cada etapa.

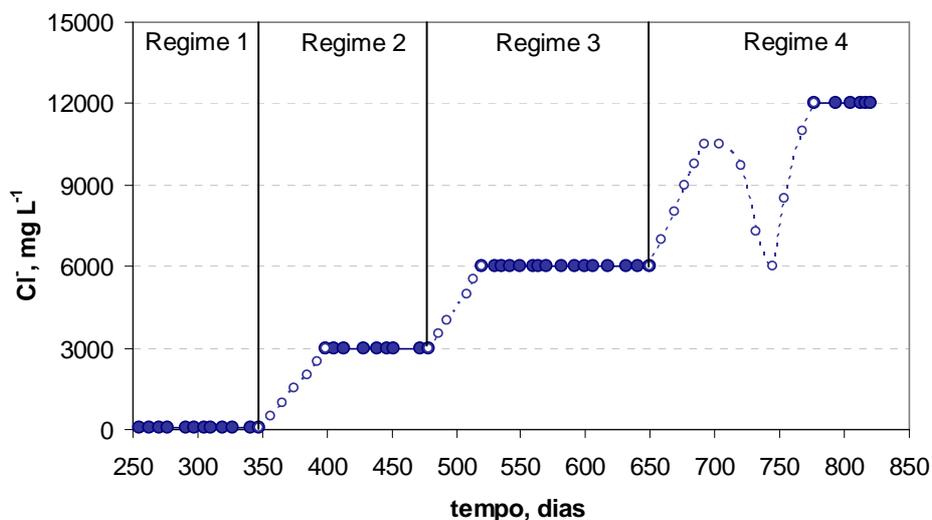


Figura 5.12 – Teor de íons cloreto no efluente alimentado ao biorreator nos quatro regimes operacionais investigados. Símbolos vazados (salinidade variável referente ao período de adaptação à nova condição), símbolos cheios (salinidade constante característica do regime operacional em questão).

Por conta da elevada variabilidade do sistema, constatada anteriormente, não foi possível operar o MBBR nos períodos de tempo propostos inicialmente. A Tabela 5.5 apresenta o que foi proposto, o período efetivo de operação e o tempo utilizado para a adaptação da microbiota a cada nova condição de cloreto.

Tabela 5.5 – Comparação da duração dos períodos propostos e os efetivos para os quatro regimes operacionais investigados.

Regimes operacionais	Cl ⁻¹ (g L ⁻¹)	Período de operação proposto (dias)	Período de operação efetivo (dias)	Período de adaptação (dias)
1	0,05	90	106	250 iniciais
2	3	120	136	35
3	6	120	164	34
4	12	120	163	119

Para os regimes 2 e 3, 35 e 34 dias, respectivamente, foram suficientes para a implementação gradual de cloreto ao meio. No regime 4, o acréscimo e decréscimo da salinidade observados no período de adaptação estiveram associados a problemas operacionais que serão comentados posteriormente.

Na Figura 5.13 está representado graficamente o acompanhamento do desempenho da nitrificação para os quatro regimes operacionais investigados. A conversão de amônia e a respectiva produção de nitrato estão representadas em termos de $N-NH_3$ e $N-NO_3^-$ no início e no final de cada ciclo operacional.

Observa-se da Figura 5.13, que no regime 1, até o início do regime 2, ocorreu maior instabilidade em relação à capacidade de conversão de amônia, fato não esperado por ter sido este a continuação do período caracterizado como o de melhor desempenho na primeira etapa de operação (250 dias anteriores). Entretanto, os valores de DQO inicial nesta fase voltaram a apresentar flutuações resultando, novamente, na instabilidade do processo de nitrificação.

No que se refere aos regimes 2 e 3 pode-se inferir que a suplementação de sal ao meio associada ao controle mais criterioso do efluente industrial – em termos de matéria orgânica – colaborou para estabelecer melhores condições no desempenho da conversão biológica de amônia a nitrato, pois é notória a menor instabilidade do processo nestes períodos. Os dois eventos ocorridos em cada uma destas etapas, que levaram à perda total da eficiência na remoção de amônia, foram causados por problemas operacionais.

No regime 3 o problema que afetou o desempenho do processo foi a válvula solenóide de alimentação da barrilha, a qual não estava fechando completamente, permitindo a alimentação contínua da solução ao biorreator, o que resultou na elevação do pH para valores acima de 9. Neste caso, supõe-se que a amônia livre foi favorecida em relação ao íon amônio e, conforme apresentado na literatura, a amônia pode ter sido tóxica para as próprias AOB, fato que levou à inibição total da atividade nitrificante.

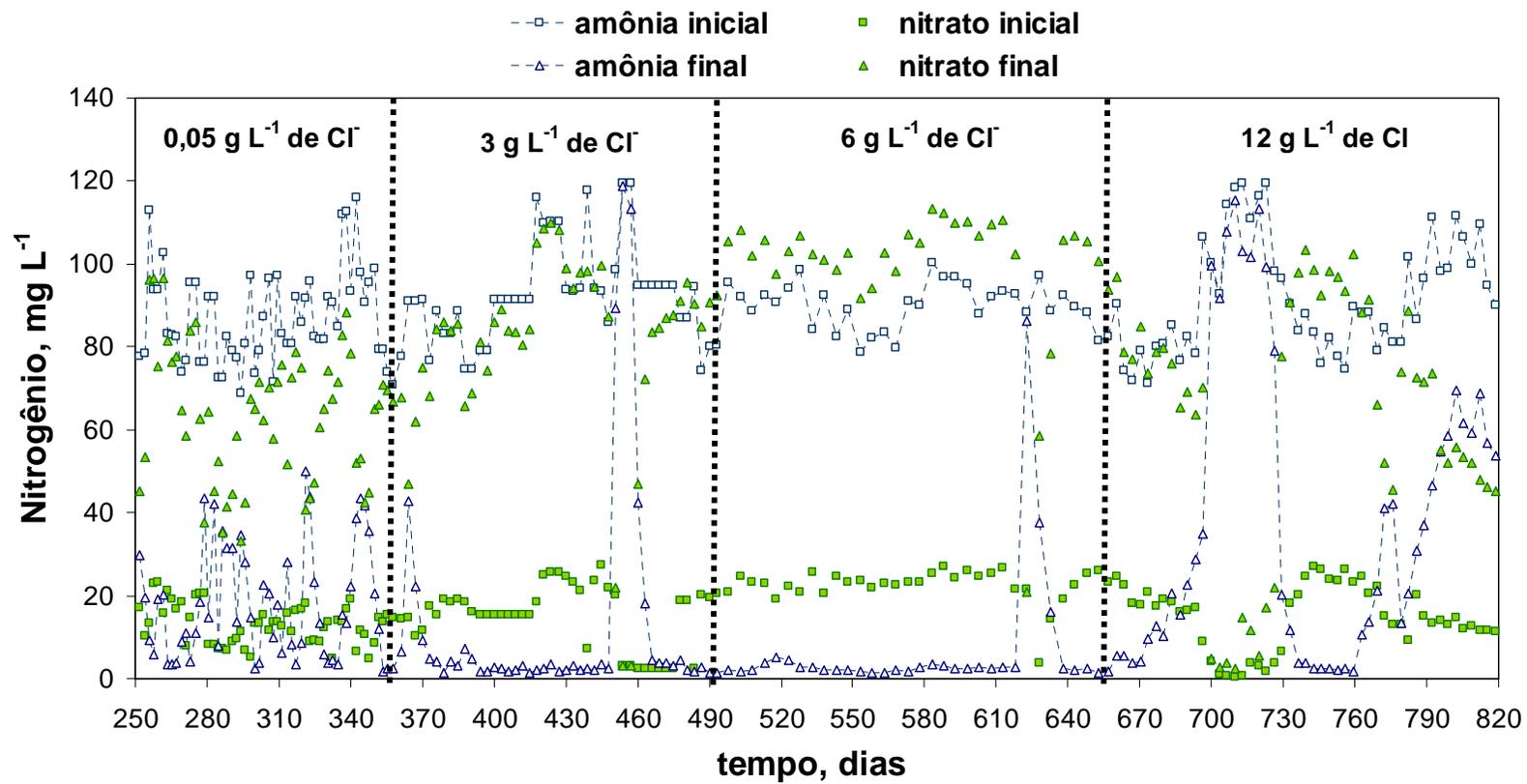


Figura 5.13 – Perfil da nitrificação: oxidação de amônia e produção de nitrato, nos quatro regimes operacionais investigados.

Como o último regime com $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ foi operado sob condições distintas de adaptação ao cloreto e tempo de aeração, os resultados obtidos nesta etapa serão apresentados mais detalhadamente. Na Figura 5.14 está representado o perfil de conversão da amônia acompanhado das variações da concentração de cloreto suplementado ao meio e dos distintos tempos de duração destinados à etapa aeróbia do ciclo operacional para este último regime.

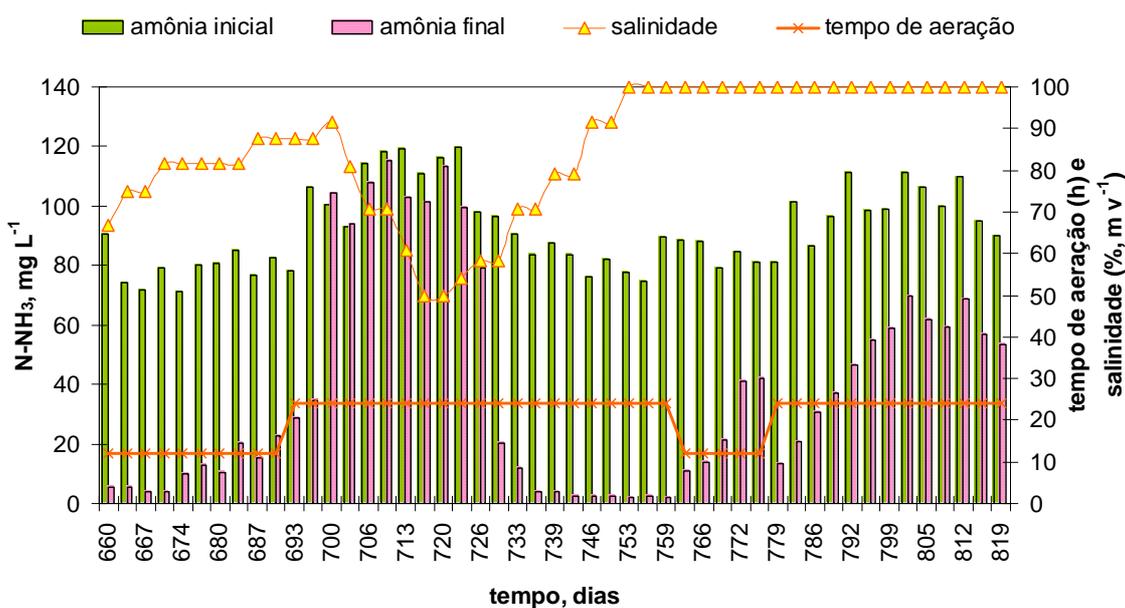


Figura 5.14 – Variação dos teores de amônia e salinidade e duração da etapa de aeração do ciclo operacional durante o último regime investigado (12 g L^{-1}).

Observa-se da Figura 5.14, que durante o período inicial de adaptação à nova condição de cloreto, com 12 horas de aeração, a nitrificação perdeu eficiência gradativamente e mesmo dobrando-se o tempo de aeração (24 horas) a atividade das AOB foi quase totalmente inibida, o que levou à suposição inicial de que a microbiota presente não estaria suportando quantidades crescentes de cloreto. A diminuição gradativa de cloreto até a condição anterior (6 g L^{-1}), como uma tentativa de recuperar a biomassa, não causou efeito na retomada da nitrificação, sugerindo que a perda de eficiência não estava diretamente associada ao incremento do teor de sal no meio reacional. Em decorrência, averiguou-se outra causa para a perda da atividade nitrificante e constatou-se que a válvula de alimentação da barrilha estava vazando novamente, conforme ocorreu no regime 3. Porém, desta vez o pH não passou de 8,0, o que dificultou

a identificação do problema. Contudo, este fato associado ou não à crescente salinidade do meio inibiu a ação das AOB.

Poucos trabalhos da literatura fazem referência à interferência da alcalinidade no processo de nitrificação (RUSTEN *et al.*, 2006, TOKUTOMI, *et al.*, 2006, SIN, *et al.*, 2008). Ainda assim, os estudos realizados neste contexto são no sentido de investigar até que ponto a ausência de alcalinidade suficiente no meio reacional pode interferir na capacidade de nitrificação de um sistema. RUSTEN *et al.* (2006) avaliaram, pela adição de barrilha (Na_2CO_3), a influência da alcalinidade na taxa de remoção de nitrogênio amoniacal em um MBBR. Contraditoriamente ao que se constatou no presente trabalho, os resultados apresentados por RUSTEN e seus colaboradores mostraram que o aumento da alcalinidade no meio reacional favoreceu a taxa de biodegradação da amônia.

Resolvido o problema da válvula, retomou-se a implementação gradativa de cloreto, mantendo-se 24 horas de aeração e suplementando-se o meio com solução de micronutrientes (Anexo I.2), na tentativa de acelerar o processo de recuperação da comunidade microbiana autotrófica. Desta maneira, foram necessários 10 dias para a recuperação da nitrificação.

Portanto, quando se alcançou novamente a concentração máxima de cloreto e o desempenho do processo mostrou-se estável, retornou-se à operação com 12 horas de aeração, condição que afetou negativamente a nitrificação. Optou-se, portanto, em continuar com 24 horas de aeração. No início pareceu que este tempo seria suficiente para garantir eficiência razoável do processo, porém observou-se o decréscimo gradativo da atividade nitrificante também nesta condição, com leve tendência de recuperação no final do período. Depreende-se, portanto, que o teor de 12 g L^{-1} de cloreto foi deletério para a nitrificação nas condições operacionais propostas, inibindo fortemente a atividade das AOB, mesmo sendo estas consideradas, na maioria dos trabalhos, menos sensíveis a salinidade do que as NOB (MOUSSA *et al.*, 2006). A inibição das bactérias que oxidam amônia nesta condição salina pode, talvez, estar associada ao excesso de oxigênio no meio reacional. Segundo HYNES e KNOWLES (1983) *apud* HAGOPIAN e RILEY (1998) a formação de íons clorito (ClO_2^-) inibe fortemente tanto a nitritação como a nitratação.

A Tabela 5.6 apresenta os valores médios representativos dos resultados discutidos na Figura 5.13 em relação ao nitrogênio inicial e final do ciclo operacional, na forma de amônia e nitrato, e a eficiência da conversão de nitrogênio amoniacal obtida nas quatro condições de salinidade estudadas. Para estes valores apresentados foram desconsiderados os dados relativos aos períodos em que a nitrificação foi desfavorecida por problemas operacionais do sistema.

Tabela 5.6 – Resumo dos resultados referentes à nitrificação, obtidos para os quatro regimes operacionais de trabalho.

Cl ⁻ (g L ⁻¹)	INICIAL (mg L ⁻¹)		FINAL (mg L ⁻¹)		Conversão N-NH ₃ (%)
	N-NH ₃	N-NO ₃	N-NH ₃	N-NO ₃	
0,05	87 ± 11	13 ± 5	18 ± 15	63 ± 17	79 ± 16
3	90 ± 11	16 ± 7	5 ± 7	86 ± 13	95 ± 3
6	90 ± 6	23 ± 2	2 ± 1	104 ± 5	97 ± 1
12	89 ± 12	17 ± 6	28 ± 26	72 ± 21	71 ± 24

Os resultados médios mostraram que a melhor condição para a nitrificação foi alcançada nos regimes 2 e 3 referentes a 3 e 6 g Cl⁻ L⁻¹, sendo que o regime 3 apresentou os menores desvios padrão associados às médias. Os regimes 1 e 4 mostraram-se similares em relação à variabilidade dos resultados, porém, o regime 4 (12 g Cl⁻ L⁻¹) mostrou em média o pior desempenho para conversão de amônia, apesar do período de aeração ter sido, neste caso, aumentado para 24 h.

No que se refere ao acompanhamento da matéria orgânica durante os regimes operacionais, foram determinadas a DQO total e dissolvida para os 3 primeiros regimes, sendo que para o último regime não foi possível determinar a DQO por conta da elevada concentração salina das amostras.

A Figura 5.15 apresenta, de forma resumida, os resultados médios e os desvios padrão obtidos para a DQO inicial e final (total e dissolvida) referentes aos regimes 1, 2 e 3. A DQO inicial e a DQO final correspondem, respectivamente, a DQO no início e no final dos ciclos operacionais do MBBR.

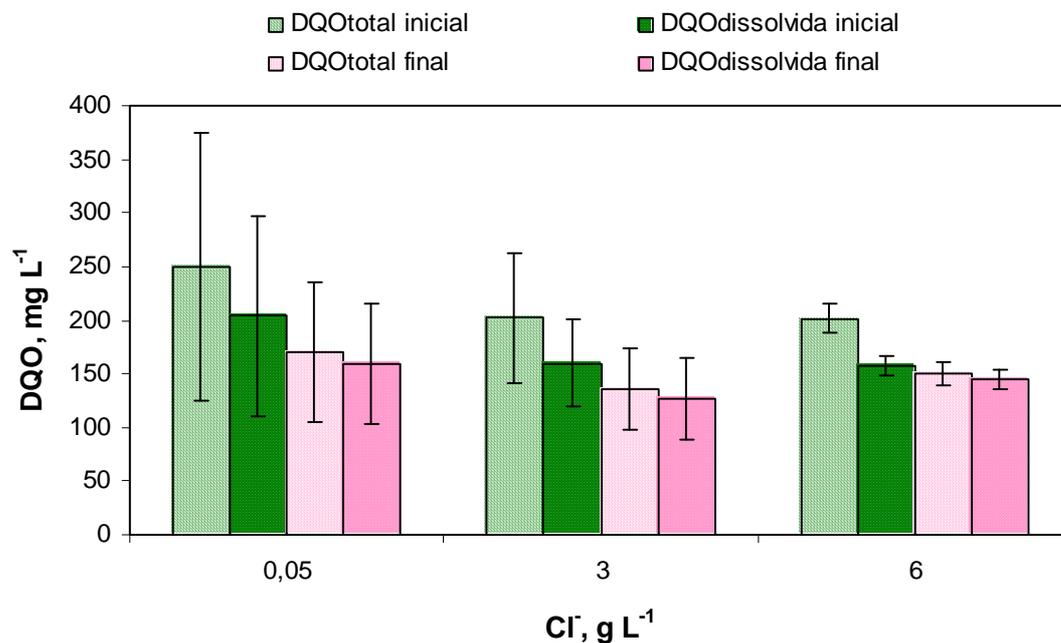


Figura 5.15 – Resultados médios da DQO inicial e final, total e dissolvida, para os 3 primeiros regimes operacionais estudados.

A Tabela 5.7 apresenta os valores médios da eficiência de remoção da DQO, total e dissolvida, para os dados apresentados na Figura 5.15.

Tabela 5.7 – Resumo dos resultados referente à eficiência de remoção da DQO total e dissolvida, obtidos para os três primeiros regimes operacionais de trabalho.

Regimes	Eficiência de Remoção (%)	
	DQO _{total}	DQO _{dissolvida}
1	29 ± 9	19 ± 10
2	32 ± 6	21 ± 7
3	25 ± 3	8 ± 5

Da Figura 5.15 depreende-se que no regime sem a adição de NaCl, os resultados obtidos para a DQO inicial apresentaram os maiores desvios padrão, fato que coincide com a elevada variabilidade observada para a eficiência da nitrificação neste mesmo regime. Observa-se leve tendência de aproximação dos valores médios da DQO final, total e dissolvida, dos valores da DQO inicial dissolvida, assim como a diminuição do desvio padrão no sentido do menor para o maior teor de íons cloreto. Este

comportamento ocorreu por conta do maior controle na coleta do efluente industrial, que assim proporcionou menores variações na matéria orgânica alimentada ao MBBR.

Os valores médios de remoção da DQO total e dissolvida não apresentaram diferença significativa para os regimes 1 e 2. A queda de eficiência no regime 3, principalmente para a DQO dissolvida, ocorreu, provavelmente, por conta da menor concentração de matéria orgânica biodegradável no efluente industrial.

Portanto, da discussão dos resultados relativos à nitrificação associados à DQO, concluiu-se que fatores distintos (a matéria orgânica no regime 1 e a salinidade no regime 4) apresentaram interferência negativa na atividade nitrificante.

A Figura 5.16 que expressa graficamente a relação das taxas volumétricas (C_v), nitrogenada e carbonácea, aplicadas ao biorreator com a taxa de utilização (U) do substrato ($N-NH_3$) e a concentração de cloreto nos quatro regimes operacionais estudados, vem corroborar esta conclusão.

As variáveis C_v e U foram calculadas a partir dos valores médios da DQO total e do nitrogênio amoniacal iniciais nos regimes 1, 2 e 3. Para o cálculo de C_v e U na condição de $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ foram utilizados os valores médios dos ensaios cinéticos, com o objetivo de se ter como base de cálculo o mesmo tempo de aeração. A DQO nesta condição foi estimada a partir dos resultados de COD, também determinados nos ensaios cinéticos.

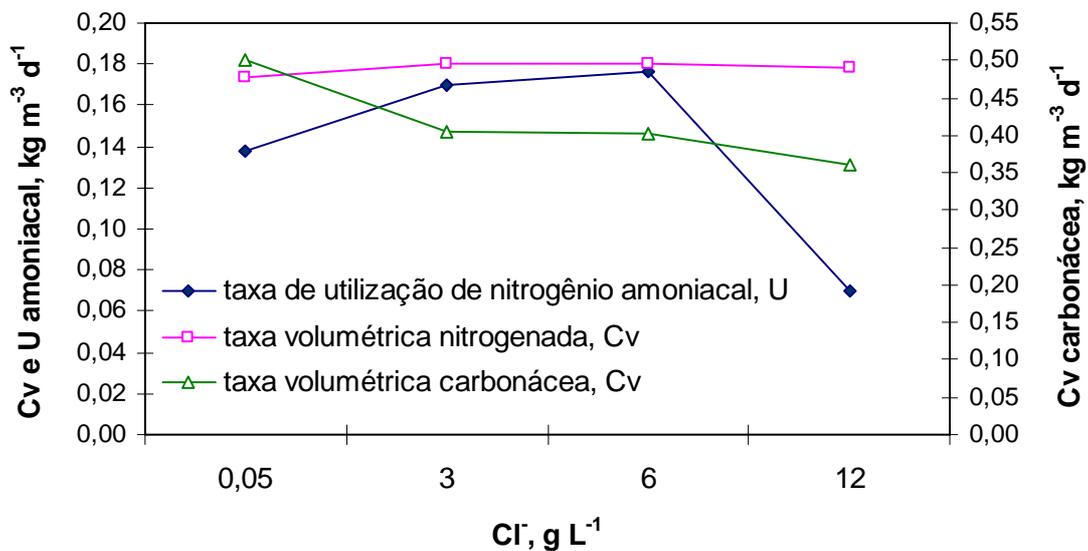


Figura 5.16 – Relação das taxas volumétricas, nitrogenada e carbonácea, com a taxa de utilização do nitrogênio amoniacal para os quatro regimes operacionais.

Depreende-se, portanto, da Figura 5.16 que a C_v nitrogenada foi similar para todos os regimes estudados. No caso da C_v carbonácea, os regimes 2, 3 e 4 apresentaram valores próximos. Já o regime 1 operou com a taxa volumétrica, relativa à matéria orgânica, acima do valor médio dos demais regimes (aproximadamente $0,5 kg m^{-3} d^{-1}$ superior), diferença esta suficiente para afetar negativamente o processo de nitrificação, como pode ser observado pelo valor de U inferior ao dos regimes 2 e 3. Contudo, a concentração salina de $12 g Cl^- L^{-1}$, aplicada ao biorreator, mostrou ser a responsável pelo maior efeito inibitório sobre a atividade microbiana nitrificante, visto que a matéria orgânica não teve efeito preponderante nesta condição.

5.4 Testes cinéticos conduzidos no MBBR

Os ensaios cinéticos de conversão biológica da amônia e do nitrito, e consequente formação do nitrato, foram conduzidos em triplicata nos quatro regimes operacionais investigados com o intuito de observar a influência da salinidade na velocidade de consumo dos substratos.

A Tabela 5.8 apresenta os valores médios e seus respectivos desvios padrão, obtidos para as substâncias nitrogenadas envolvidas no processo da nitrificação convencional nos tempos inicial e final (0 e 10 h) dos ensaios cinéticos realizados, assim como a eficiência de remoção (conversão) alcançada para a amônia.

Tabela 5.8 – Resumo dos resultados médios referentes à nitrificação, obtidos durante os ensaios cinéticos realizados nos quatro regimes operacionais investigados.

Cl ⁻¹ (g L ⁻¹)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)			N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)		N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	
	Inicial	Final	Remoção (%)	Inicial	Final	Inicial	Final
0,05	98 ± 6	32 ± 5	68 ± 6	1,0 ± 0,2	2,9 ± 0,2	5 ± 2	63 ± 6
3,0	113 ± 5	2 ± 1	98 ± 2	0,0	0,0	7 ± 1	93 ± 4
6,0	106 ± 2	25 ± 2	77 ± 7	3,2 ± 0,4	2,1 ± 0,2	8 ± 2	83 ± 1
12	111 ± 4	87 ± 7	22 ± 4	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,04	14 ± 1	35 ± 5

A Figura 5.17 expressa e permite comparar graficamente as curvas cinéticas obtidas para amônia, nitrito e nitrato, respectivamente, durante o período de 10 h de teste. Os dados apresentados são referentes aos valores médios resultantes dos ensaios realizados em triplicata para cada regime operacional.

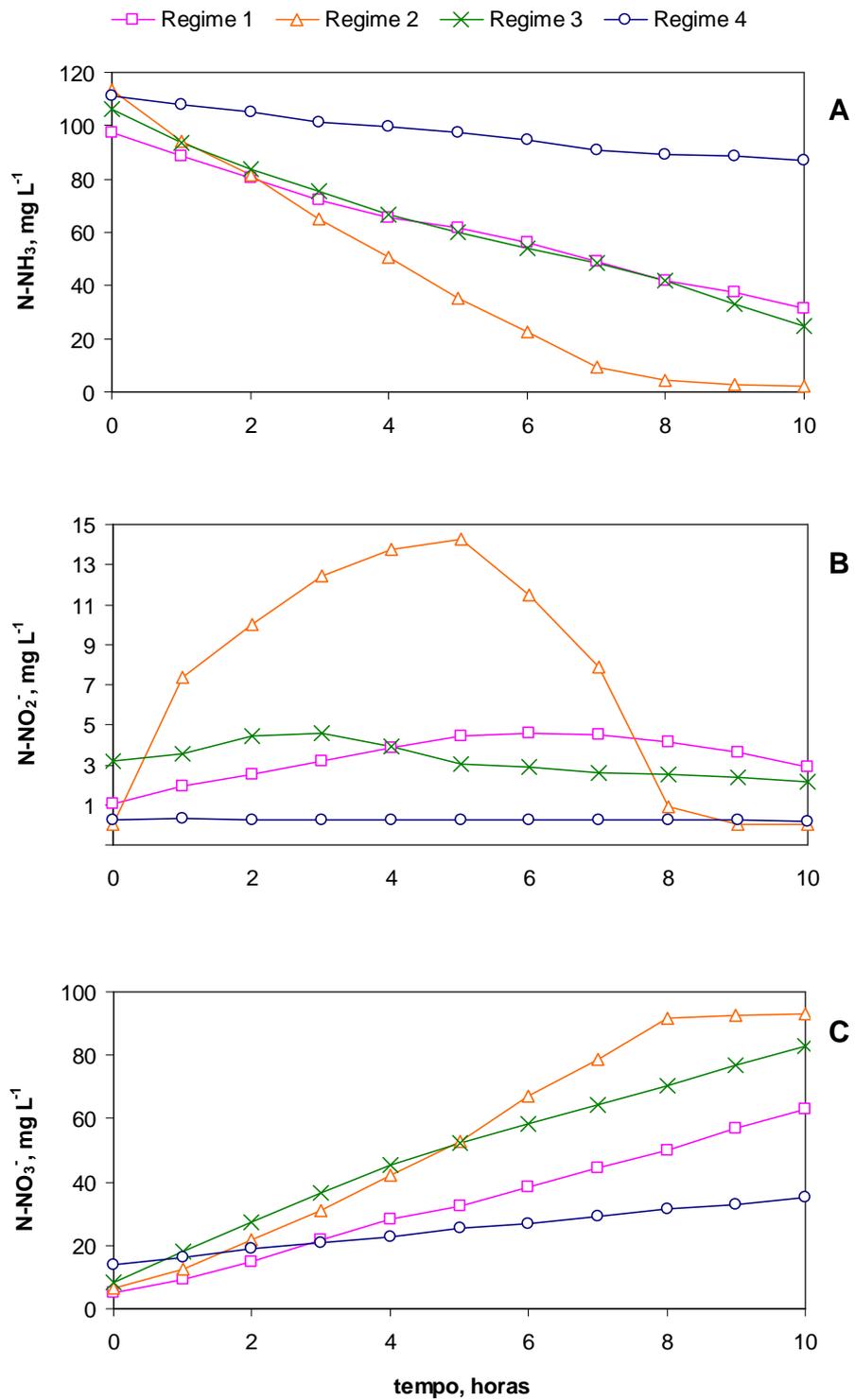


Figura 5.17 – Comparação dos perfis de variação da concentração de amônia (A), nitrito (B) e nitrato (C), obtidos durante os ensaios cinéticos realizados nos quatro regimes operacionais estudados.

Da observação da Figura 5.17 e dos resultados apresentados na Tabela 5.8 torna-se evidente que a condição com maior teor de sal ($12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$) gerou o pior desempenho na oxidação da amônia (22% de conversão), porém, nesta condição ocorreu o menor acúmulo de nitrito no meio reacional (Figura 5.17B), sendo que a formação de nitrato (Figura 5.17C) menos pronunciada foi consequência da baixa conversão do nitrogênio amoniacal. Estes resultados sugerem que a possível interferência da salinidade sobre a microbiota nitrificante foi mais expressiva sobre a atividade das AOB do que sobre a atividade das NOB.

Inferese do perfil apresentado para o nitrito (Figura 5.17B), que a condição salina de $3 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ favoreceu a atividade das AOB em relação às NOB, promovendo maior acúmulo de nitrito no meio reacional. Artigos reportados na literatura relatam que a adição de sal em concentrações de até $5,0 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ favoreceram a taxa de nitrificação, tendo sido este efeito associado ao possível estímulo que os íons cloreto proporcionaram na atividade da microbiota nitrificante envolvida (HAMODA e AL-ATTAR, 1995, CHEN *et al.*, 2003).

Observa-se que as curvas que representam amônia e nitrito nos regimes 1 e 3, conforme apresentadas na Figura 5.17A e B, mostram valores muito próximos de decaimento da amônia e de acúmulo do nitrito, porém, com perfis distintos para o nitrito. Como foi observada maior formação do nitrato no regime 3, quando comparada com o regime 1 (Figura 5.17C), inferese que o incremento da salinidade no meio reacional para $6 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ foi menos deletério para as NOB do que a conjunção de fatores como a baixa concentração de íons cloreto ($0,05 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$), porém, com maior influência da matéria orgânica, características do regime 1. O desempenho na conversão da amônia, conforme apresentado na Tabela 5.8, com 68 e 77% de remoção média para os regimes 1 e 3, respectivamente, também sugere ligeira melhora na atividade das AOB na condição de $6 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ em relação a de $0,05 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$.

As curvas que representam o regime 2 na Figura 5.17, mostram que esta foi a melhor condição operacional para a atividade da comunidade microbiana nitrificante, resultando no ótimo desempenho da conversão de amônia (98% de eficiência média).

CHEN *et al.* (2003) observaram que $10 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ foi o ponto crítico para a nitrificação em experimentos com biomassa em suspensão, embora seus resultados mostrem que a partir de $5 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ ocorreu o declínio acentuado e descendente na atividade dos micro-organismos nitrificantes até $15 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$. Na compilação da literatura realizada por estes autores são citados dois trabalhos com resultados similares. YU *et al.* (2001) *apud* CHEN *et al.* (2003) reportaram que variações no teor de cloreto de $3,5 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ para $6 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ causaram grande interferência no processo de nitrificação em duas unidades de tratamento de esgoto em Hong Kong. SHEHADEH (1997) *apud* CHEN *et al.* (2003) apresentou resultados relativos a um sistema nitrificante em suspensão e mostrou que o nível máximo de tolerância ao sal alcançado pelos micro-organismos envolvidos foi de $6,5 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$. A comparação destes resultados com aqueles obtidos no presente trabalho sugere que a biomassa aderida pode ter promovido melhores condições de adaptação para a comunidade microbiana nitrificante, quando comparada à biomassa em suspensão, para teores de salinidade até $6 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$.

As Figuras 5.18 e 5.19 apresentam, respectivamente, os valores médios do pH e do OD obtidos durante os testes cinéticos realizados nas quatro condições operacionais investigadas. A temperatura não teve influência significativa sob estes ensaios porque todos foram realizados sob a mesma condição, em torno de 24°C .

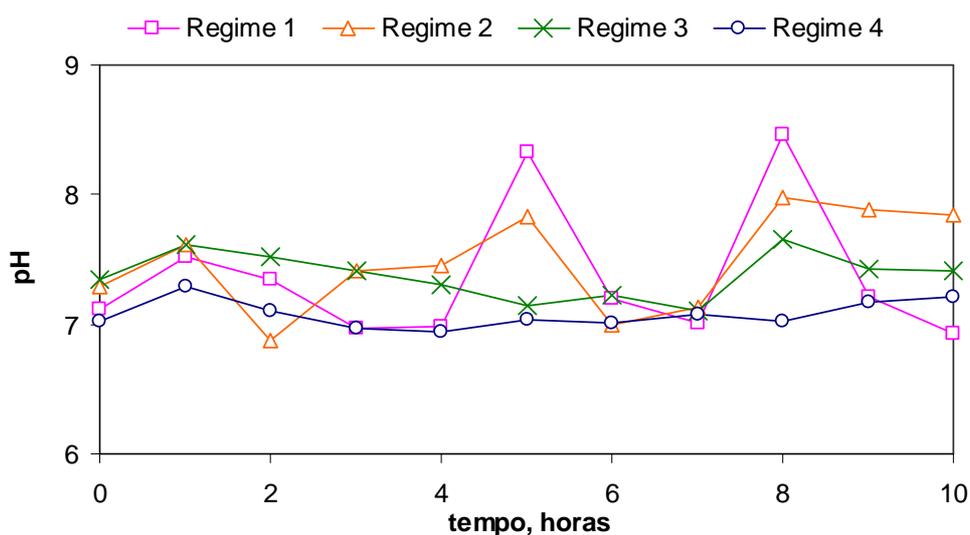


Figura 5.18 – Comparação dos perfis de pH obtidos durante os ensaios cinéticos realizados nos quatro regimes operacionais estudados.

O perfil do pH observado nas curvas da Figura 5.18 mostra que em nenhuma das quatro situações apresentadas ocorreu limitação da nitrificação por conta do abaixamento do pH, o qual esteve com exceção de um ponto, sempre acima de 7,0. O regime 4 apresentou o perfil com menor flutuação durante os ensaios devido ao menor desempenho alcançado para a conversão do nitrogênio amoniacal.

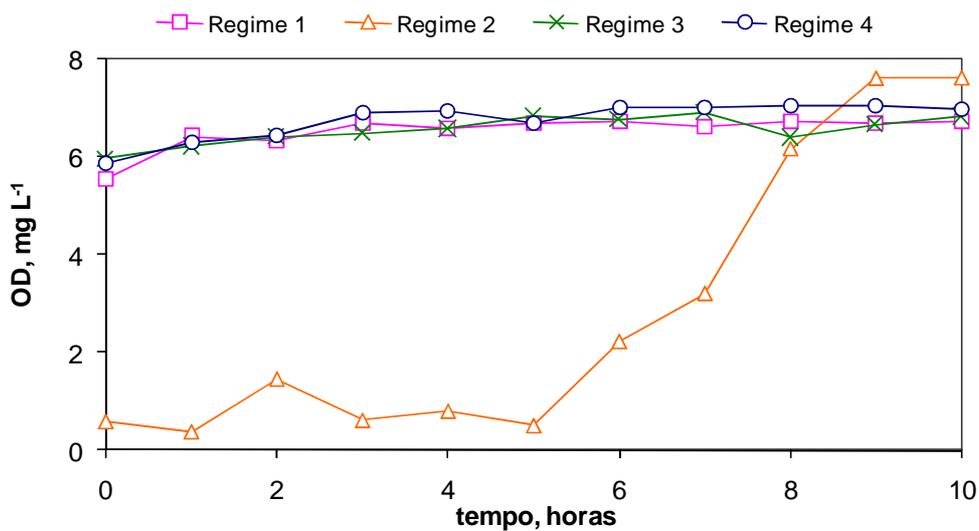


Figura 5.19 – Comparação dos perfis de OD obtidos durante os ensaios cinéticos realizados nos quatro regimes operacionais estudados.

No que se refere ao OD medido durante os ensaios cinéticos, é possível observar na Figura 5.19 que os regimes 1, 3 e 4 apresentaram perfil similar em relação ao consumo do oxigênio para a conversão de amônia e nitrito, com valores de OD ligeiramente abaixo da sua concentração de saturação na água para a temperatura do meio (~24°C). O perfil de OD resultante dos ensaios no regime 2 destoa dos demais, porém está condizente com a intensa atividade nitrificante desenvolvida nesta condição operacional (3 g Cl⁻ L⁻¹), observada principalmente nas primeiras 6 h dos testes. Mesmo tendo alcançado valores de OD menores do que 1,0 mg L⁻¹, aparentemente, não ocorreu inibição das AOB. O acúmulo de nitrito nestes ensaios talvez possa estar associado à inibição das NOB por menor disponibilidade de oxigênio no meio reacional. TOKUTOMI (2004) observou em seus experimentos que concentrações de OD abaixo de 1,0 mg L⁻¹ provavelmente induziram o domínio das AOB em relação às NOB. SINHA e ANNACHHATRE (2007) consideraram a possibilidade da inibição das NOB pelo controle

do teor de OD (entre 0,5 e 1 mg L⁻¹) muito atrativa, principalmente pela economia de energia e facilidade de controle operacional.

O balanço do nitrogênio para os ensaios cinéticos realizados, levando em consideração as formas nitrogenadas de amônia, nitrito e nitrato, está representado graficamente na Figura 5.20. Observa-se que os regimes 1 e 2 apresentaram maior perda de nitrogênio entre o início e o final dos testes (0 e 12 h), e que nos regimes 3 e 4, com as maiores concentrações de cloreto, esta perda foi menos pronunciada. Esta constatação poderia sugerir que a perda de nitrogênio estaria associada de alguma maneira à concentração salina do meio reacional, porém a influência do sal neste balanço é a consideração menos provável. Primeiramente deve-se chamar a atenção para a dificuldade inerente à nitrificação quando do fechamento do seu balanço de nitrogênio, pois, conforme consta da literatura, podem existir outras formas de compostos nitrogenados, além de amônia, nitrito e nitrato, envolvidos neste processo e que não são, normalmente, quantificadas. Outra questão está associada à necessidade de diluição das amostras para a quantificação destas substâncias, que inevitavelmente agrega erros, além das diferentes metodologias utilizadas para quantificar o nitrogênio amoniacal (espectrofotometria) e o nitrogênio na forma de nitrito e nitrato (cromatografia iônica). Existe ainda a possibilidade da ocorrência da nitrificação e desnitrificação simultâneas (SND), o que justificaria as perdas pela formação de N₂, mas sua ocorrência é pouco provável porque as condições operacionais dos experimentos realizados não foram propícias para promover a SND, mesmo tendo os regimes 1 e 2 apresentado biofilmes espessos. Portanto, na comparação dos 2 primeiros regimes operacionais com os 2 últimos, as evidências apontam no sentido de que a maior perda de nitrogênio esteve associada ao crescimento mais efetivo do biofilme nos regimes iniciais, que teriam maior demanda pelo nitrogênio disponível no meio reacional por conta do consumo assimilatório do mesmo.

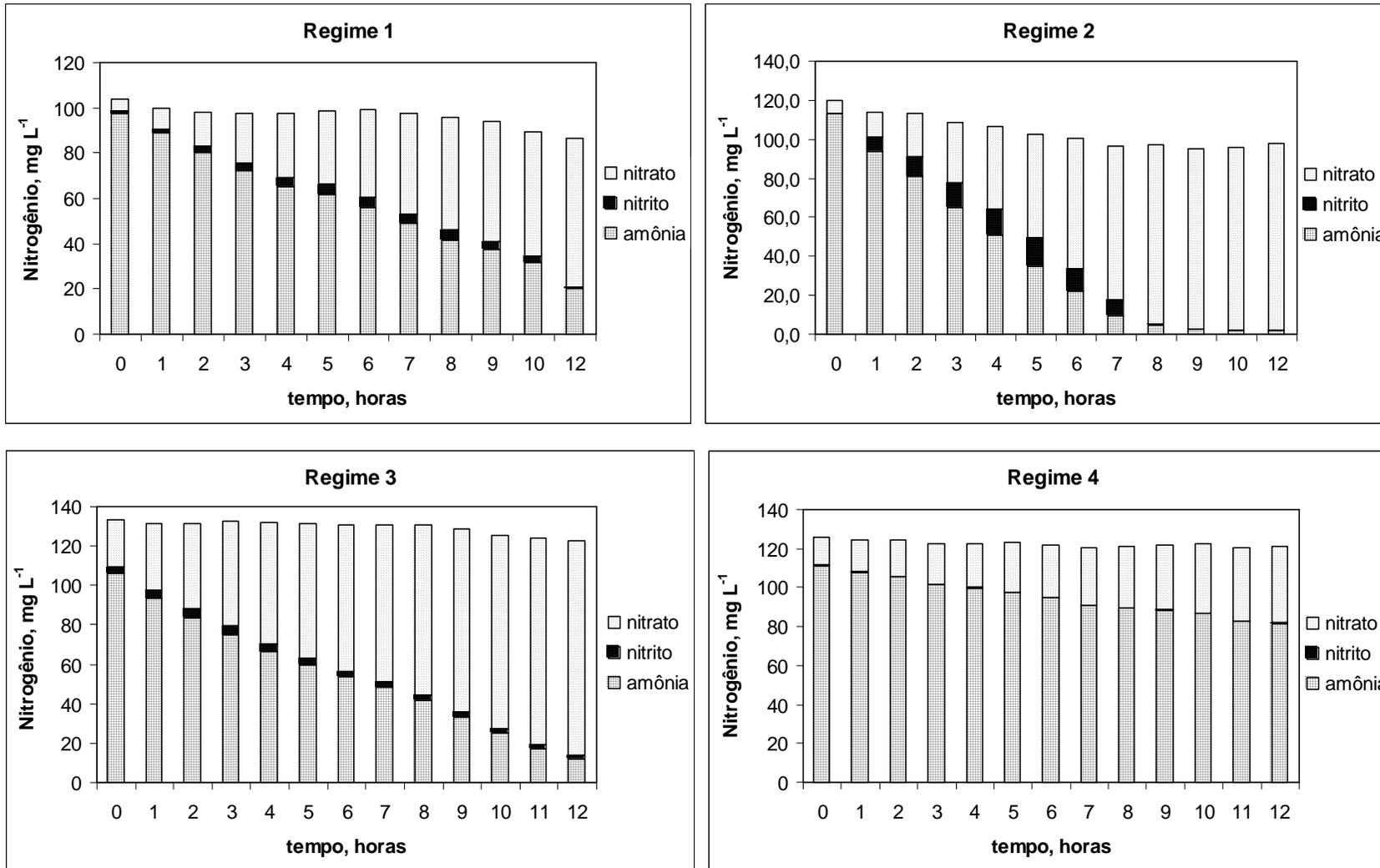


Figura 5.20 – Ilustração gráfica do balanço de nitrogênio para os ensaios cinéticos realizados nos quatro regimes operacionais estudados.

Conforme estudos realizados por SAWAITTAYOTHIN e POLPRASERT (2007), o balanço de massa para o nitrogênio em um sistema de tratamento de efluentes mostrou que cerca de 90% da entrada de nitrogênio total foi metabolizado pela biomassa nitrificante e que aproximadamente 8% desapareceu. Os autores atribuíram o fato à possibilidade de outras reações microbianas, bem como adsorção e volatilização que podem ocorrer em sistemas deste tipo.

A verificação da constante influência da matéria orgânica associada ao efluente no processo de nitrificação durante o trabalho levou a investigar, pela aplicação dos ensaios cinéticos, qual seria a contribuição das substâncias orgânicas na taxa de oxidação da amônia. Com este intuito, foram preparadas bateladas do efluente industrial com diluições de 25 e 50% (com água da rede) para a realização, em triplicata, dos testes cinéticos. Para a discussão destes resultados será assumida a seguinte nomenclatura para as bateladas de efluente utilizadas: i) efluente industrial diluído com 25% de água (EI75); ii) efluente industrial diluído com 50% de água (EI50). Estes testes foram realizados durante o terceiro regime operacional e, portanto, sob as mesmas condições operacionais aplicadas ao mesmo ($6 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$). Os ensaios realizados com o efluente diluído serão comparados com o ensaio, previamente apresentado, realizado durante o regime 3 sem diluição do efluente (100% de efluente industrial) que será denominado EI100.

A Tabela 5.9 apresenta os valores médios e respectivos desvios padrão, obtidos para o nitrogênio na forma de amônia, nitrito e nitrato nos tempos inicial e final (0 e 10 h) dos ensaios cinéticos realizados para EI50, EI75 e EI100, assim como a eficiência de remoção (conversão) alcançada para a amônia nos três casos.

Tabela 5.9 – Resumo dos resultados médios referentes à nitrificação, obtidos nos ensaios cinéticos realizados no terceiro regime operacional com diferentes diluições do efluente industrial.

Afluente	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)			N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)		N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	
	Inicial	Final	Remoção (%)	Inicial	Final	Inicial	Final
EI100	106 ± 2	25 ± 2	77 ± 1	3 ± 0,4	2 ± 0,2	8 ± 2	83 ± 1
EI75	100 ± 1	9 ± 3	91 ± 3	3 ± 0,3	2 ± 0,3	5 ± 2	86 ± 3
EI50	88 ± 6	3 ± 1	97 ± 3	7 ± 3	0	4 ± 3	84 ± 5

A Figura 5.21 expressa e permite comparar graficamente as curvas cinéticas obtidas para amônia, nitrito e nitrato, na condição de $6,0 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$, com diferentes teores de efluente industrial.

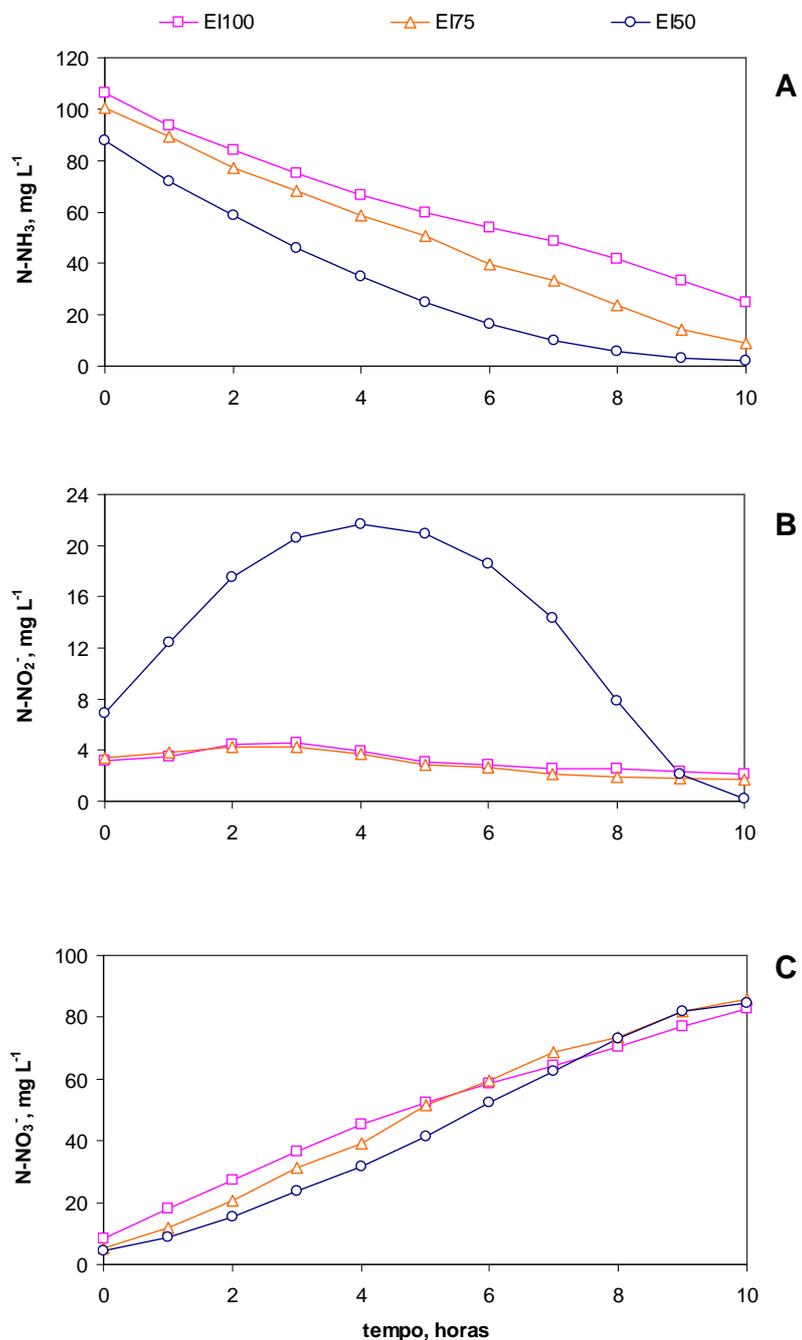


Figura 5.21 – Comparação dos perfis de variação de amônia (A), de nitrito (B) e de nitrato (C) obtidos durante os ensaios cinéticos realizados no regime 3 para EI100, EI75 e EI50.

Da Figura 5.21 infere-se que a maior diluição do afluente bruto (50%) favoreceu a atividade das AOB em relação às NOB, evidenciado pelo maior acúmulo de nitrito (Figura 5.21B) e melhor desempenho na conversão do nitrogênio amoniacal (97%).

A Tabela 5.10 apresenta os valores médios e respectivos desvios padrão, obtidos para a DQO_{dissolvida} e o COD nos tempos inicial e final (0 e 10 h) dos ensaios cinéticos apresentados na Figura 5.21. A razão DQO_{dissolvida}/COD também está representada na Tabela 5.10 para os dados referentes ao início e ao final dos testes.

Tabela 5.10 – Resultados médios, referentes à matéria orgânica, obtidos nos ensaios cinéticos realizados no terceiro regime operacional com diferentes diluições do efluente industrial.

Efluente	DQO _{dissolvida} (mg L ⁻¹)			COD (mg L ⁻¹)		DQO _d /COD	
	Inicial	Final	Remoção (%)	Inicial	Final	Inicial	Final
EI100	180 ± 9	154 ± 4	14 ± 1	49 ± 4	48 ± 4	3,6	3,2
EI75	142 ± 8	125 ± 3	12 ± 3	35 ± 2	35 ± 2	4,0	3,5
EI50	103 ± 4	87 ± 2	15 ± 3	24 ± 1	24 ± 2	4,2	3,6

As evidências experimentais apontam que a extensão e a velocidade da biodegradação da amônia foram afetadas negativamente nas condições de maior teor de matéria orgânica. A queda no desempenho da remoção de N-NH₃ foi de 97 para 77% quando se alterou a diluição do efluente de 50% para 0%, sendo que este desempenho não mostrou diferença considerável (91 e 97%) entre as condições EI75 e EI50, respectivamente. METCALF & EDDY (2003) com base em dados da literatura mostraram, para sistemas com biomassa aderida, que a taxa de nitrificação seria afetada pela razão DBO/NTK (matéria orgânica em termos da demanda bioquímica de oxigênio e nitrogênio total Kjeldahl), de forma que quanto maior fosse esta razão menor seria a taxa de nitrificação.

Embora a diferença nos teores de DQO e COD no efluente inicial, para as três situações investigadas, não seja tão significativa, dentre os compostos orgânicos presentes no afluente bruto podem existir substâncias inibidoras da atividade biológica nitrificante e que, portanto, a diluição das mesmas diminuiria este efeito inibitório.

Vale ressaltar que pela comparação dos perfis de OD obtidos nestes ensaios, a condição referente à diluição de 50% do efluente industrial (EI50) foi a que apresentou o consumo mais efetivo de oxigênio durante os testes, conforme pode ser visto na Figura 5.22. Embora neste caso os valores de OD não tenham sido inferiores a 2 mg L^{-1} , pode-se sugerir que, assim como proposto para o regime 2, ocorreu certa inibição na atividade das NOB por limitação de oxigênio e, conseqüentemente, acúmulo de nitrito, conforme observado na Figura 5.21B. O comportamento do pH nas três condições propostas não mostrou diferença significativa e, portanto, não será apresentado.

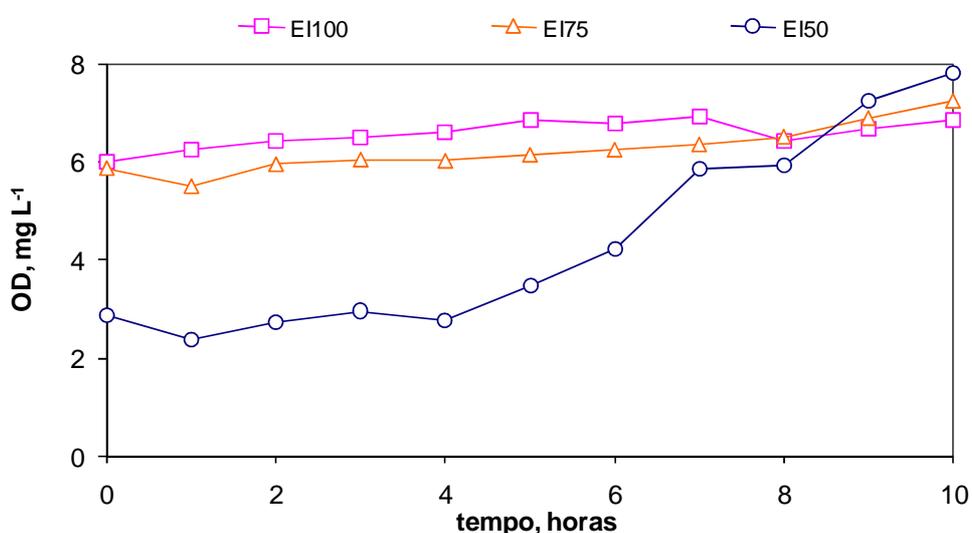


Figura 5.22 – Comparação dos perfis de OD obtidos durante os ensaios cinéticos realizados para EI100, EI75 e EI50.

Para os resultados obtidos nos ensaios cinéticos foram propostas expressões que os representassem matematicamente, levando em consideração a formação e a oxidação do nitrito, conforme apresentadas nas equações (1), (2) e (3).

$$\frac{dS_{NH_3}}{dt} = \frac{-k_A \cdot S_{NH_3}}{K_a + S_{NH_3}} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\frac{dS_{NO_2^-}}{dt} = \frac{a \cdot k_A \cdot S_{NH_3}}{K_a + S_{NH_3}} - \frac{k_N \cdot S_{NO_2^-}}{K_b + S_{NO_2^-}} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\frac{dS_{NO_3^-}}{dt} = \frac{b \cdot k_N \cdot S_{NO_2^-}}{K_b + S_{NO_2^-}} \quad \text{Eq. (3)}$$

Os parâmetros acima apresentados são definidos como segue:

S_{NH_3} é a concentração de amônia no meio reacional, mg L⁻¹;

k_A é a constante de velocidade específica de consumo da amônia, mg L⁻¹ d⁻¹;

K_a é a constante de saturação da amônia, mg L⁻¹;

$S_{NO_2^-}$ é a concentração de nitrito no meio reacional, mg L⁻¹;

k_N é a constante de velocidade específica de consumo do nitrito, mg L⁻¹ d⁻¹;

K_b é a constante de saturação do nitrato, mg L⁻¹;

$S_{NO_3^-}$ é a concentração de nitrato no meio reacional, mg L⁻¹;

a e b são os coeficientes estequiométricos das reações de oxidação.

Embora se observe na literatura grande número de modelos propostos para representar a oxidação da amônia, indiferente do processo utilizado para tal, é facilmente identificável que não existe consenso no sentido de quais são as variáveis relevantes para as equações cinéticas. Muitas vezes, modelos conceitualmente interessantes são propostos, porém a demasiada complexidade dos mesmos, sobretudo pela dificuldade de determinação de alguns de seus parâmetros, os torna inviáveis ou de difícil aplicação.

Por outro lado, existe certa tendência em simplificar os modelos típicos para a nitrificação convencional em uma única etapa, influenciado pelos modelos globais das estações de tratamento de esgoto sanitário, onde o acúmulo de nitrito é considerado insignificante. No entanto, em algumas situações específicas como a presença de substâncias inibidoras do processo, instabilidade operacional ou no tratamento de

efluentes industriais, o nitrito pode adquirir importante papel nas conversões microbianas (SIN *et al.*, 2008).

Para a maioria dos modelos que envolvem biorreatores, as expressões apresentadas incluem uma variável, muito relevante, que se refere ao crescimento microbiano. No entanto, existem limitações que dificilmente são consideradas como, por exemplo, comunidades típicas de sistemas de lodos ativados nas quais os grupos bacterianos autotróficos são minoria na biomassa presente e são quantificados globalmente ou, mais especificamente, em consórcios microbianos prioritariamente nitrificantes não ocorre distinção entre a biomassa que oxida amônia ou nitrito, sendo considerado como um parâmetro global. Assim, a dificuldade em se determinar de forma precisa e confiável parâmetros como a concentração microbiana ativa e real, acaba limitando o alcance e a utilização dos modelos propostos (SANT`ANNA JR, no prelo). No presente trabalho optou-se pela proposta de um modelo bastante simplificado, baseado somente no consumo dos substratos de interesse, sendo parâmetros factíveis de serem medidos e com bom grau de confiança.

Portanto, a partir do tratamento matemático dos dados experimentais obtidos em conjunto com as expressões propostas e utilizando o software matemático Mathcad* versão 14.0, foi possível obter os valores das constantes de velocidade específica de consumo dos substratos (k_A e k_N) assim como suas constantes de saturação (K_a e K_b). Cabe informar que a escolha dos parâmetros foi feita por inspeção visual, visando selecionar aqueles que levaram ao melhor ajuste dos dados experimentais. A Tabela 5.11 apresenta os parâmetros obtidos matematicamente.

Tabela 5.11 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir do tratamento matemático dos dados experimentais com o modelo proposto.

Cl ⁻¹ (g L ⁻¹)	Parâmetros Cinéticos			
	k_A (mg L ⁻¹)	K_a (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	k_N (mg L ⁻¹)	K_b (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
0,05	14	60	21	1,2
3,0	40	80	40	6,0
6,0 (EI100)	19,5	60	54	11
6,0 (EI75)	19,5	48	40	10
6,0 (EI50)	38	84	54	50
12	4,0	40	11	0,4

Verificou-se no processo de ajuste que havia vários conjuntos de parâmetros (k e K) que podiam levar a um resultado adequado. Portanto, além da instabilidade verificada no processo de nitrificação, esta questão dificultou a interpretação dos resultados. Não é possível observar da Tabela 5.11 uma tendência clara, a não ser pela queda significativa de todos os parâmetros na condição de 12 g Cl⁻¹ L⁻¹. Aparentemente, a variação da velocidade específica (k) de consumo dos substratos foi coerente com a discussão dos resultados até o momento, sendo que apresentou para a oxidação da amônia valores de k_A iguais a 40 e 38 mg L⁻¹ d⁻¹ para o regime 2 e para o teste EI50, respectivamente. Já a velocidade específica de consumo do nitrito não apresentou grandes alterações dentre as condições investigadas, a não ser para os regimes 1 e 4. Contudo, a avaliação individual de k e K não é muito assertiva e ademais as constantes de saturação não foram sensíveis às mudanças de comportamento da nitrificação. As Figuras 5.23, 5.24 e 5.25 ilustram graficamente os resultados referentes à contrastação do modelo com os dados experimentais para os regimes 1, 2, 3 e 4 e para as condições EI50 e EI75, respectivamente. Os dados apresentados são os valores médios obtidos das triplicatas.

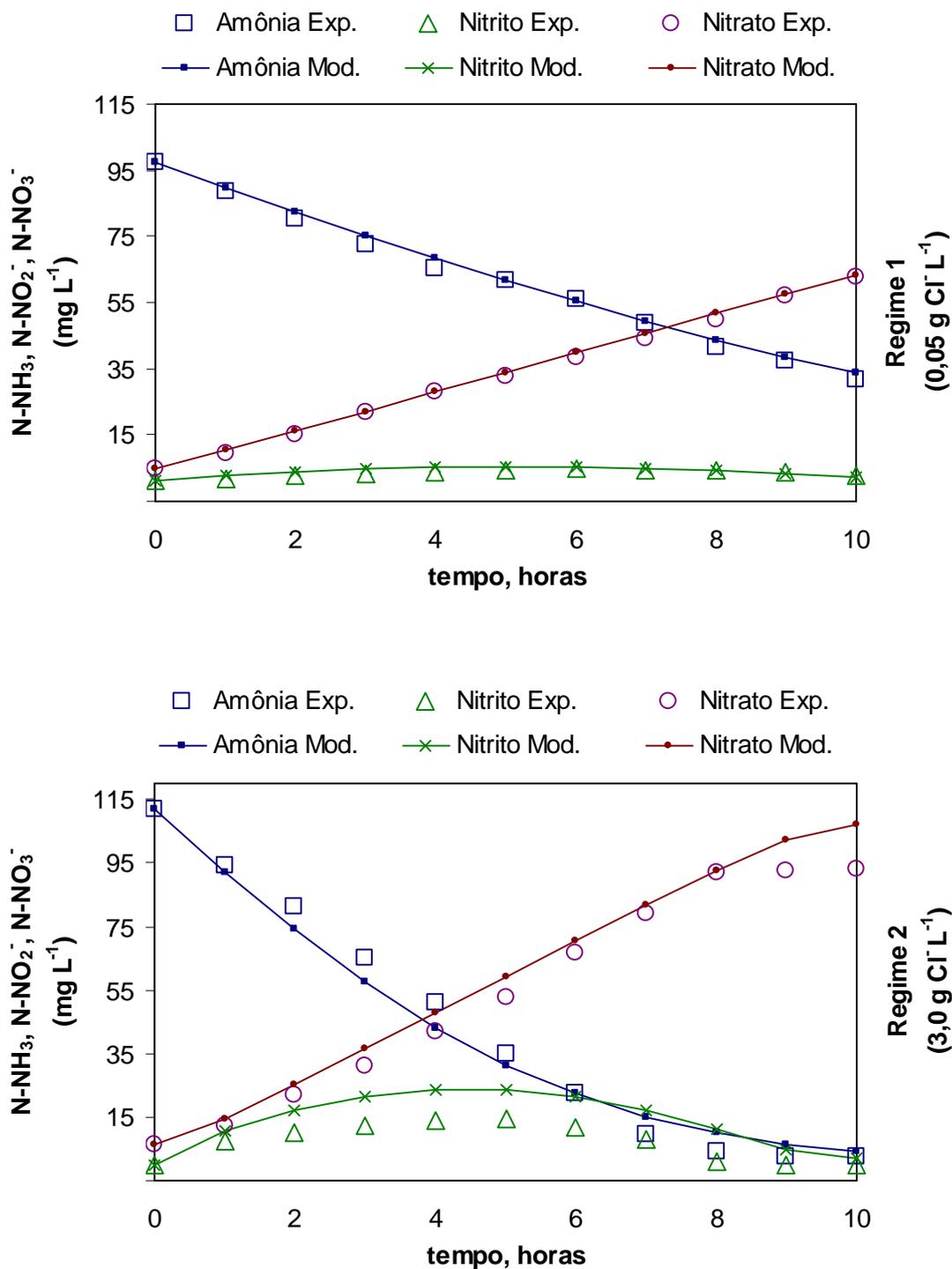


Figura 5.23 – Verificação do modelo proposto (linha cheia) com os dados experimentais obtidos dos ensaios cinéticos realizados nos regimes operacionais 1 e 2, com 0,05 e 3 g Cl⁻¹ L⁻¹, respectivamente.

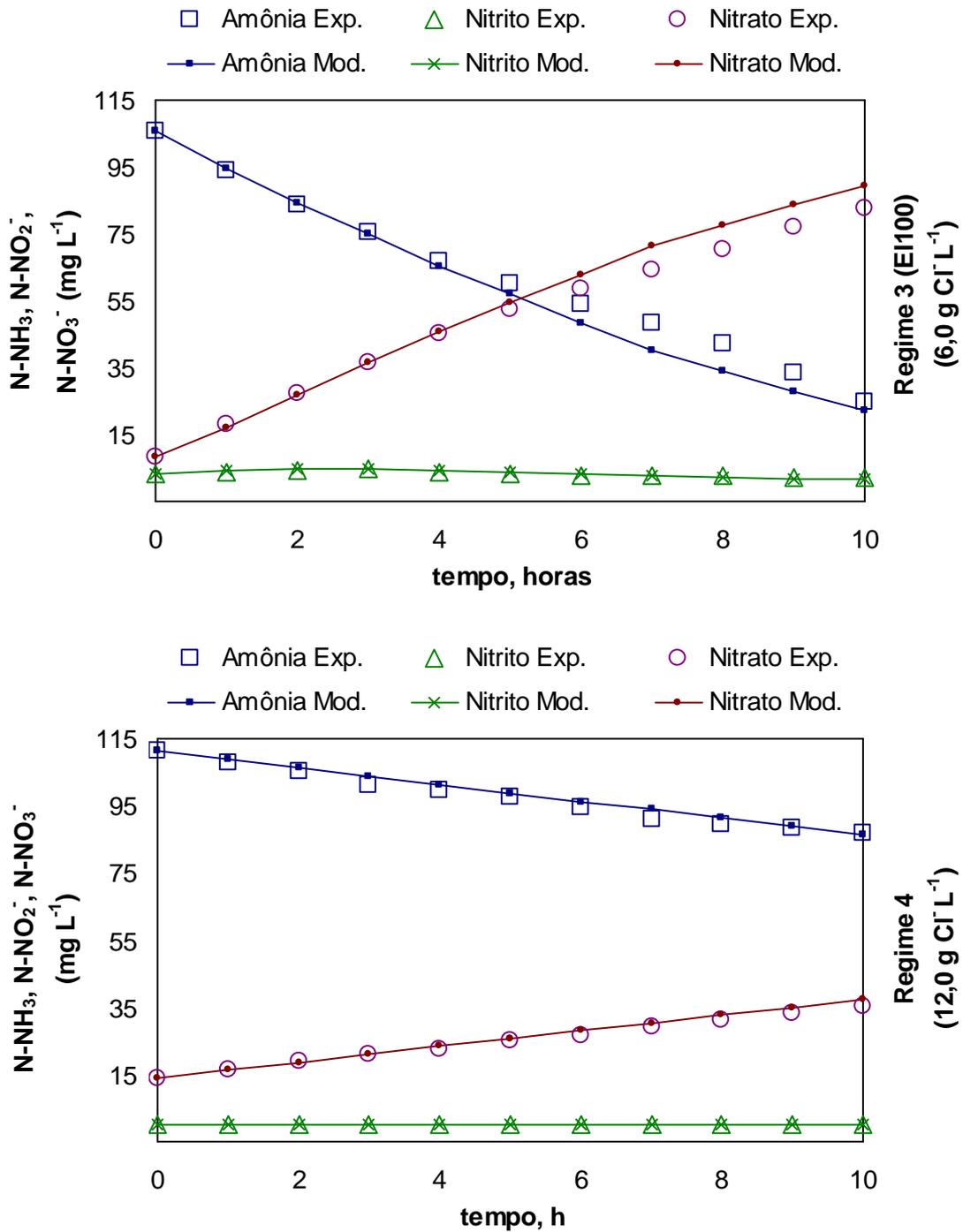


Figura 5.24 – Verificação do modelo proposto (linha cheia) com os dados experimentais obtidos dos ensaios cinéticos realizados nos regimes operacionais 3 e 4, com 6 e 12 g Cl⁻ L⁻¹, respectivamente.

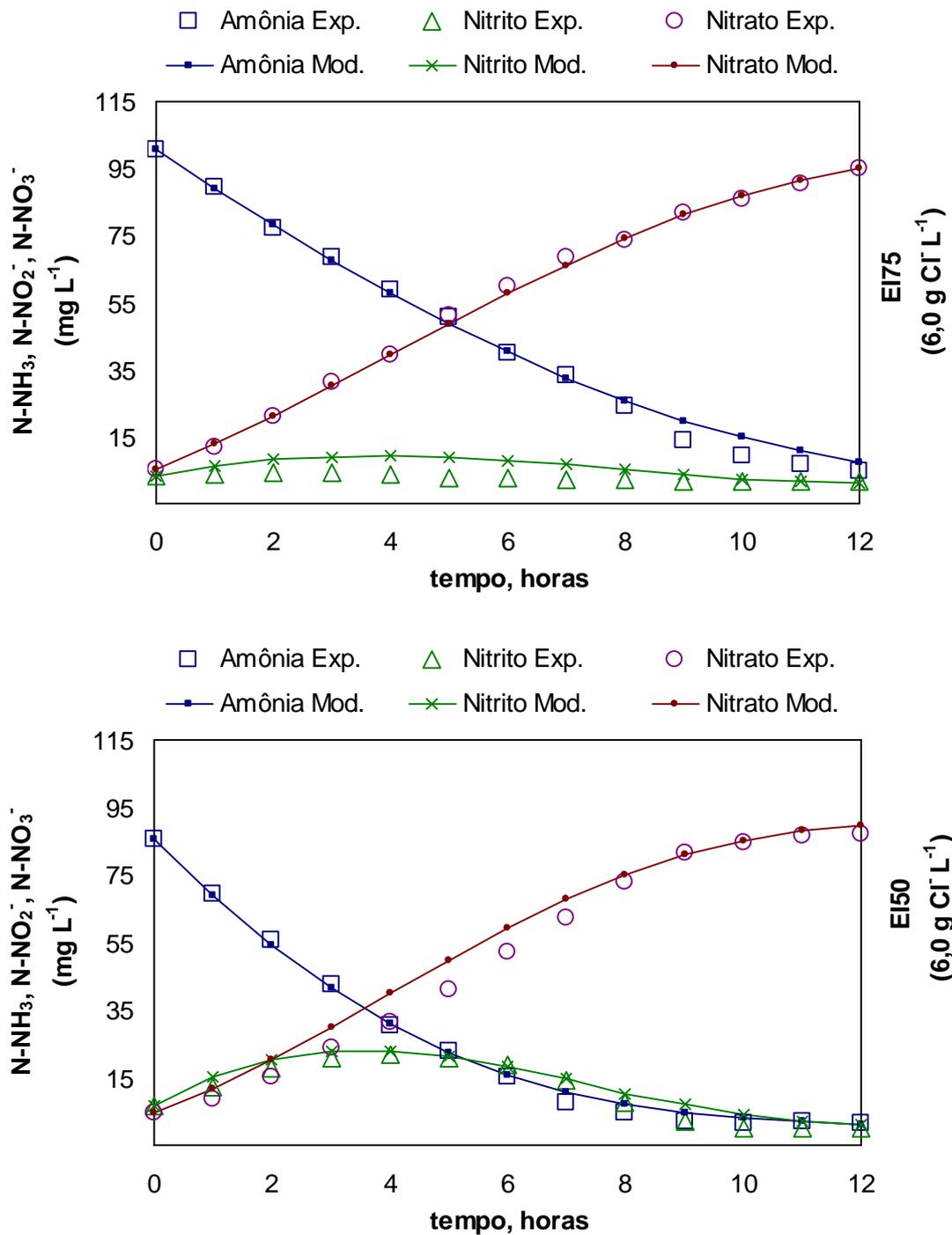


Figura 5.25 – Verificação do modelo proposto (linha cheia) com os dados experimentais obtidos dos ensaios cinéticos realizados com o efluente industrial diluído (EI75 e EI50) durante o terceiro regime operacional ($6 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$).

Da observação das Figuras 5.23, 5.24 e 5.25 depreende-se que as curvas obtidas, a despeito de todas as considerações realizadas, mostraram um ajuste razoável dos dados experimentais pelo modelo proposto. Este fato leva à indicação de que este modelo pode ser utilizado para a descrição do processo de nitrificação no MBBR em questão.

A comparação de parâmetros cinéticos para processos biológicos não é uma tarefa fácil de ser feita. Em geral, para cada tipo de sistema, deve-se obter os parâmetros específicos que irão depender das características do reator, das características do substrato e da biomassa. No caso de biorreatores que empregam biomassa aderida, a comparação destes valores é ainda mais prejudicada, pois as diferentes possibilidades de expressar os parâmetros envolvidos no processo (por unidade de área, por volume de líquido, por biomassa aderida) e as incertezas da maneira como estas formas são obtidas, praticamente inviabiliza o confronto dos dados disponíveis na literatura.

5.5 Experimentos de desnitrificação em biorreator de leito móvel

O afluente da unidade de desnitrificação foi o efluente final do MBBR sendo o mesmo caracterizado conforme consta da Tabela 5.12. A razão COD/N-NO₃⁻ igual a 4 foi escolhida arbitrariamente no início da operação do sistema. A fonte externa de carbono utilizada foi o etanol.

Tabela 5.12 – Caracterização do efluente (antes da adição de etanol) utilizado no sistema proposto para a desnitrificação.

Parâmetros	Média e Desvio
N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	29 ± 24
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	74 ± 21
COD (mg L ⁻¹)	55 ± 9
SST (mg L ⁻¹)	21 ± 4
SSV (mg L ⁻¹)	14 ± 4
pH	7,6 ± 0,4

Conforme apresentado no Capítulo 4 (seção 4.5.2), o crescimento da microbiota desnitrificante foi acompanhado durante os três meses de operação desta unidade. A Figura 5.26 expressa graficamente os valores médios obtidos para a biomassa aderida durante este período.

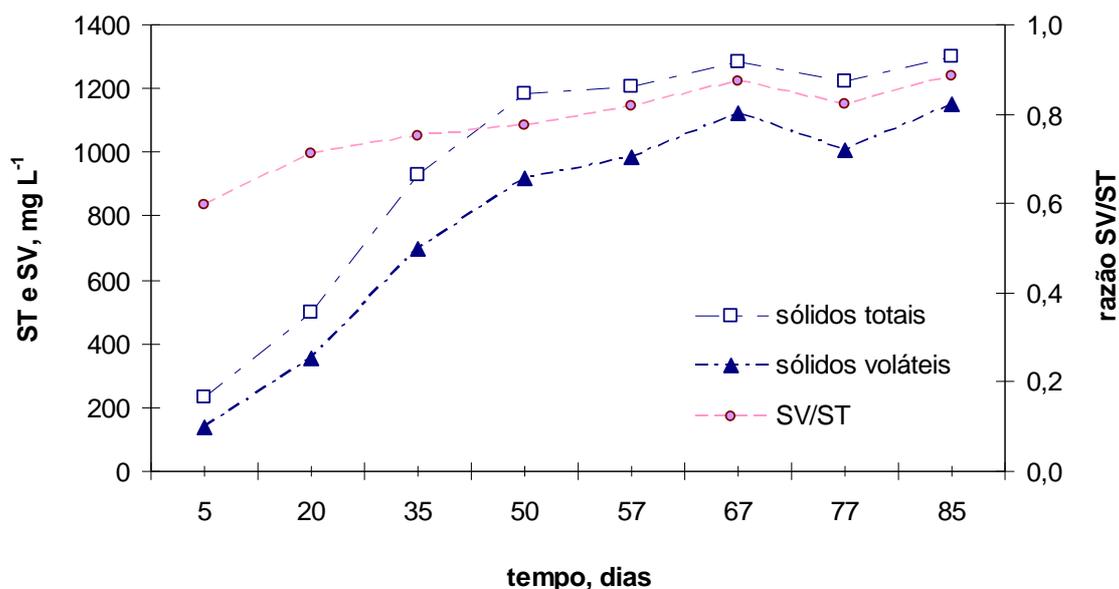


Figura 5.26 – Acompanhamento do teor de sólidos totais e voláteis e da razão SV/ST referente ao biofilme desnitrificante, durante 90 dias de operação.

Da Figura 5.26 é possível observar que a partir da adição de etanol ao sistema, com o intuito de favorecer a desnitrificação, ocorreu o crescimento rápido da biomassa, passando do patamar dos 150 mg L⁻¹ de sólidos voláteis em média, para em torno de 1.150 mg SV L⁻¹ após 50 dias do início da operação. A razão SV/ST mostrou que a porção de SV em relação aos ST também aumentou na mesma direção, apresentando-se numa faixa que variou entre 0,60 – 0,88.

Este desenvolvimento relativamente rápido da biomassa pode estar associado ao excesso de etanol adicionado ao biorreator. A partir do primeiro ensaio cinético realizado para este sistema detectou-se que o nitrato presente no efluente de alimentação estava sendo rapidamente consumido, e que grande parte da fonte externa de carbono estava se acumulando no meio reacional. A Figura 5.27 apresenta os valores obtidos para nitrogênio como nitrato e para os compostos orgânicos dissolvidos como COD, a partir de

um ensaio cinético realizado no sistema proposto para avaliar o processo de desnitrificação.

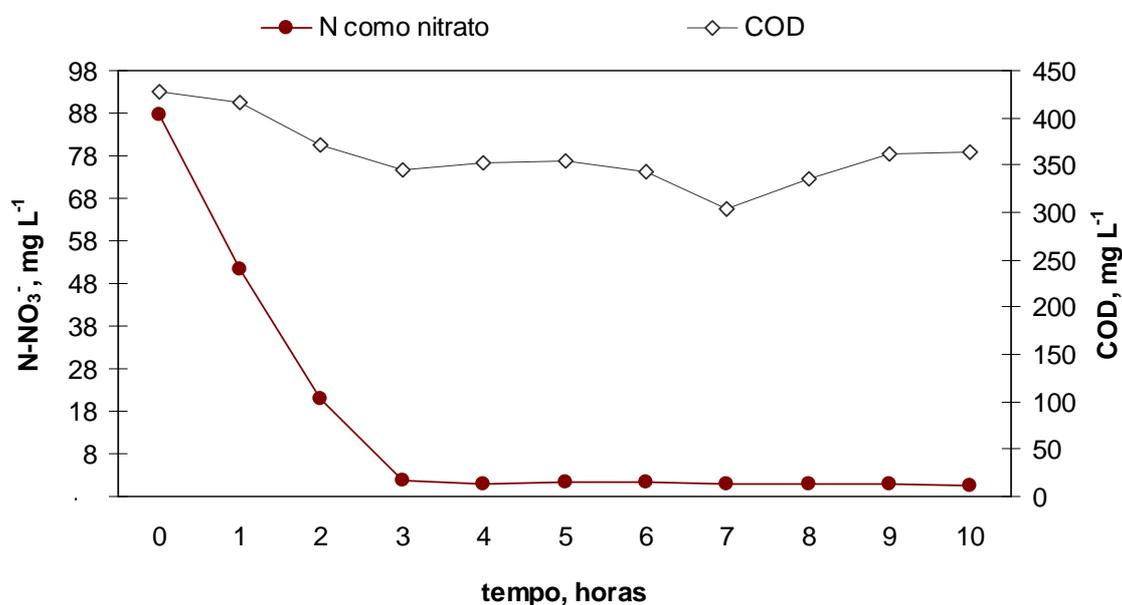


Figura 5.27 – Perfil de variação das concentrações de nitrato e carbono orgânico dissolvido durante um ensaio cinético de 10 h para avaliar a desnitrificação.

Da Figura 5.27 verifica-se que em três horas de reação praticamente todo o nitrato (97%) presente no efluente já havia sido removido e que apenas 19% do COD total havia sido consumido. A partir deste resultado foi calculada nova razão COD/N-NO₃⁻ que resultou no valor aproximado igual a 1, desde então se adicionou ao biorreator desnitrificante quantidade de etanol equivalente a este novo valor e não se utilizou mais a razão COD/N-NO₃⁻ igual a 4, como admitida inicialmente.

Após uma semana desta alteração ter sido realizada foi dado prosseguimento a novos ensaios cinéticos. A Figura 5.28 ilustra o perfil dos valores obtidos e seus respectivos desvios padrão para estes novos ensaios, os quais foram realizados em triplicata. Os valores de nitrito durante os testes ficaram abaixo do nível de detecção do método utilizado para a sua determinação no cromatógrafo de íons.

Oxigênio dissolvido e pH foram determinados esporadicamente, sendo o OD no interior do biorreator e o pH no efluente final. Os valores observados para OD estiveram

sempre próximos de zero, condição ideal para se alcançar a desnitrificação. No que se refere ao pH, os valores determinados no efluente ao final da batelada variaram em torno de 8,4 e 8,6, evidenciando a geração dos íons hidroxila no meio líquido.

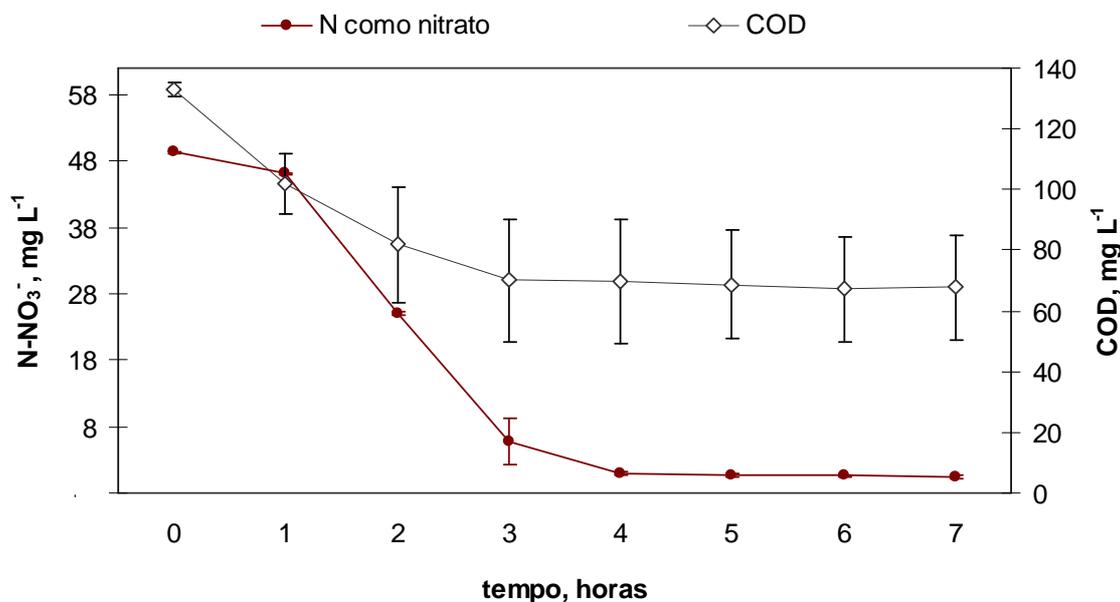


Figura 5.28 – Perfil de variação das concentrações de nitrato e carbono orgânico dissolvido durante 7 h de ensaios com a razão COD/N-NO₃⁻ igual a 1.

Para esta nova condição da razão C/N, como é possível observar na Figura 5.28, foi alcançada ótima redução (88%) do nitrato em torno de 3 h de reação. Porém, neste caso o consumo de carbono foi superior em aproximadamente 20 pontos percentuais quando comparado ao primeiro ensaio cinético, sendo que grande parte do COD não utilizado se deve provavelmente aos compostos orgânicos recalcitrantes oriundos do efluente industrial.

DUPLA *et al.* (2006) avaliando o desempenho de diferentes biomédias na desnitrificação de um efluente sintético salino (28 g L⁻¹), observaram 75% de remoção de NO_x para cargas volumétricas na faixa de 0,33 – 0,85 kg N-NO₃⁻ m⁻³ d⁻¹. O MBBR utilizado teve 30% do seu volume preenchido com as biomédias testadas e operou em modo contínuo com tempo de retenção hidráulica de 2 h. Estes resultados mostraram-se próximos àqueles obtidos para a desnitrificação no presente trabalho, porém, os autores utilizaram metanol como fonte externa de carbono e razão C/N igual a 4,3.

RUSTEN *et al.* (2006) em seus experimentos com MBBR para promover a desnitrificação constataram que a utilização do etanol dobrou as taxas de desnitrificação, quando comparado com o metanol nas mesmas condições experimentais. Os autores também relataram que o uso do metanol como fonte de carbono é mais empregado na desnitrificação por conta do seu baixo custo, porém, a partida de processos desnitrificantes com este substrato é mais lenta por conta de poucas bactérias terem a capacidade de utilizá-lo como fonte de carbono.

Portanto, o objetivo inicial de investigar a possível desnitrificação do efluente tratado no MBBR foi alcançado e em um tempo relativamente baixo se comparado com o processo de nitrificação. Infere-se que a condição salina de $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ não resultou em inibição evidente da comunidade microbiana desnitrificante e que a razão COD/N-NO_3^- igual a 1 foi adequada para alcançar a desnitrificação utilizando etanol como fonte externa de carbono no sistema proposto.

5.6 Caracterização e quantificação do biofilme

Biofilmes são sistemas muito complexos que consistem de células microbianas e colônias embebidas em uma matriz polimérica, cuja estrutura e composição são função da idade do biofilme e das condições ambientais (CAMMAROTA, 1998).

Embora existam relatos de que, há mais de um século, a adesão microbiana já causasse interesse e que desde a década de 70 (COSTERTON *et al.*, 1995) os estudos sobre os biofilmes se intensificaram, ainda hoje existem limitações para quantificar e caracterizar a biomassa aderida.

A maior dificuldade neste âmbito está em obter a biomassa sem grandes perdas ou prejuízo da sua estrutura e/ou do suporte. Este aspecto torna a investigação do crescimento microbiano aderido um desafio. Em geral, dependendo do tipo de análise ou determinação a ser realizada se empregam diferentes métodos de obtenção da biomassa.

Quando se trata de quantificar a biomassa de maneira global, dois parâmetros são comumente utilizados: peso seco ou sólidos voláteis. Estas são técnicas simples e

consolidadas para a biomassa em suspensão, porém, para biofilmes não há um procedimento padrão para a sua utilização e, além disso, por estas técnicas não é possível fazer distinção entre microrganismos ativos, massa inerte, exopolímeros e substratos adsorvidos.

Neste contexto uma alternativa é a determinação de proteínas e polissacarídeos. No entanto, estas substâncias estão presentes no interior das células microbianas e na sua matriz extracelular, sendo conhecidas como exopolímeros. Para avaliar apenas as substâncias presentes na matriz extracelular da biomassa são requeridas etapas preliminares de extração e coleta dos exopolímeros para proceder aos ensaios analíticos. A dificuldade destes métodos está em garantir a extração dos componentes de interesse sem romper a célula microbiana. Muitos são os procedimentos de extração propostos na literatura, no entanto, a eficácia de cada um deles não é satisfatoriamente comprovada.

Contudo, as pesquisas e informações referentes à quantificação e caracterização de sistemas com biofilme vêm crescendo, porém, ainda mantêm as incertezas inerentes aos métodos aplicados. Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de microscopia e de biologia molecular, muitas são as alternativas de caracterização deste tipo de biomassa. No entanto, essas técnicas são de custo elevado, exigem reagentes e equipamentos de difícil acesso e muito critério na avaliação dos resultados.

5.6.1 Quantificação do biofilme pela determinação de sólidos voláteis

Para se chegar ao procedimento proposto na seção 4.6.1 do presente trabalho, relativo ao desprendimento do biofilme aderido ao material suporte, foram necessários aproximadamente 2 meses de testes. A partir de então se deu início à quantificação da biomassa pela determinação dos sólidos voláteis (SV). A Figura 5.29 apresenta os resultados obtidos em termos de sólidos totais e voláteis para a biomassa aderida em função do tempo de operação do biorreator no período anterior ao início dos regimes operacionais propostos (250 dias iniciais).

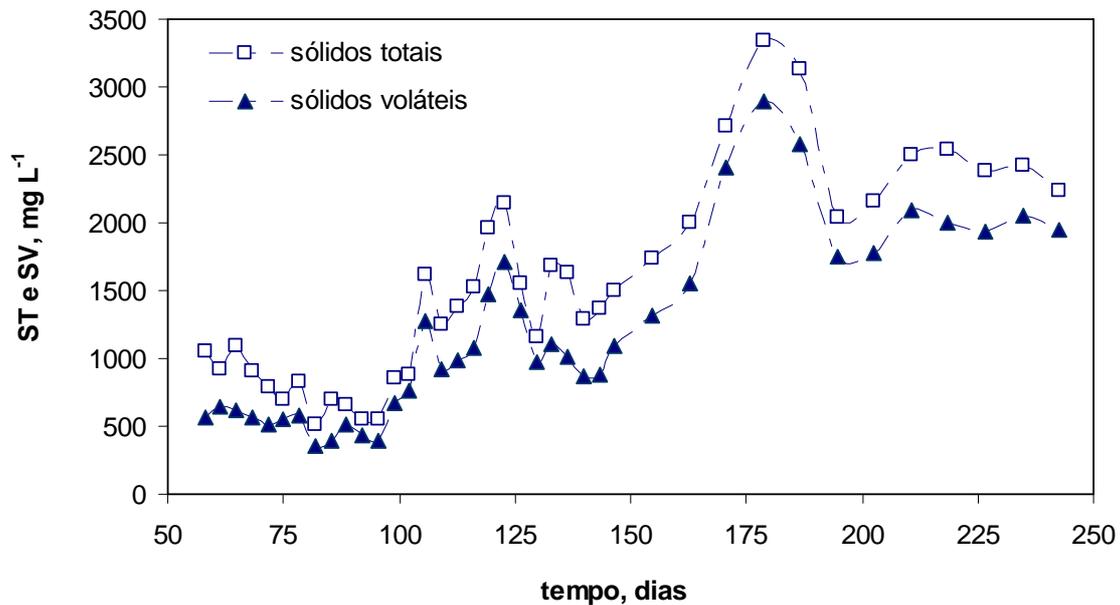


Figura 5.29 – Acompanhamento dos teores de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) indicativos do crescimento do biofilme no MBBR durante os primeiros 250 dias de operação.

Da Figura 5.29 depreende-se que até 100 dias de operação os sólidos voláteis variaram dentro de uma estreita faixa entre 350 e 650 mg L⁻¹, com incremento da porção volátil do biofilme em relação à de sólidos totais. O crescimento da biomassa após este período ocorreu, provavelmente, por conta da quantidade variável de matéria orgânica do efluente industrial, que levou ao desenvolvimento das bactérias heterotróficas. O crescimento exponencial da biomassa, a partir dos 150 dias de operação, coincidiu com o início da implementação da etapa desnitrificante, conforme comentado previamente. Infere-se que a adição de etanol ao sistema favoreceu o rápido crescimento da comunidade heterotrófica presente, levando a um patamar de aproximadamente 2.900 mg L⁻¹ de sólidos voláteis, representativo da biomassa aderida.

POLLARD (2006) quantificou a comunidade nitrificante em três condições distintas: em uma unidade de lodos ativados para o tratamento de esgoto doméstico em escala real (R1); em um biofiltro terciário alimentado com o esgoto tratado na unidade de lodos ativados (R2); e em um biofiltro piloto alimentado com água subterrânea suplementada com amônia e fosfato (R3). Para R1, no qual a nitrificação estava em segundo plano, foi determinado que as bactérias nitrificantes autotróficas presentes perfaziam apenas $2 \pm$

1,5% da comunidade microbiana total, e $31 \pm 4\%$ para R2 e $63 \pm 22\%$ para R3. Estes resultados mostraram a grande influência das substâncias orgânicas na dinâmica da microbiota heterotrófica e autotrófica nos sistemas de tratamento de efluentes. NOGUEIRA *et al.* (2002) quando investigaram a remoção combinada de nitrogênio e carbono em reator com biofilme, sob diferentes tempos de retenção hidráulica, constataram a formação de espessa camada de heterotróficos sobre o biofilme autotrófico. Esta ocorrência, muito provavelmente, levou à limitação da atividade nitrificante por falta de oxigênio e conseqüentes perdas no desempenho da nitrificação.

MARTIN *et al.* (2007) estudaram a remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) em biorreatores híbridos ligados em série. No primeiro foi utilizada argila como material suporte e no segundo biorreator, carbono ativado granular. Os pesquisadores quantificaram a biomassa aderida por determinações de SV e ST e utilizaram ultra-som para efetuar o desprendimento da mesma dos suportes. Embora tenham feito uso da mesma metodologia utilizada neste trabalho para quantificar o biofilme, os resultados não foram apresentados. Os autores justificaram a ausência destes pela dificuldade de alcançar boa reprodutibilidade dos resultados e, por outro foco, pela impossibilidade de diferenciar comunidades microbianas presentes na biomassa.

REIS (2007) investigou o efeito de elevadas cargas orgânicas no desempenho de um MBBR, utilizando o mesmo tipo de biomédias do presente trabalho. O efluente de estudo foi sintético e a concentração de matéria orgânica, em termos de DQO, foi, em média, de 700 mg L^{-1} . Os resultados obtidos para a quantificação da biomassa aderida variaram entre 2.770 e 4.590 mg L^{-1} . Os valores de SV determinados pelo autor são típicos de comunidades microbianas heterotróficas e, quando comparados aos valores obtidos para a biomassa no presente trabalho, são superiores até mesmo ao maior resultado individual observado.

A Figura 5.30 apresenta as variações na concentração de sólidos totais e voláteis, representativas do biofilme, durante os quatro regimes operacionais investigados.

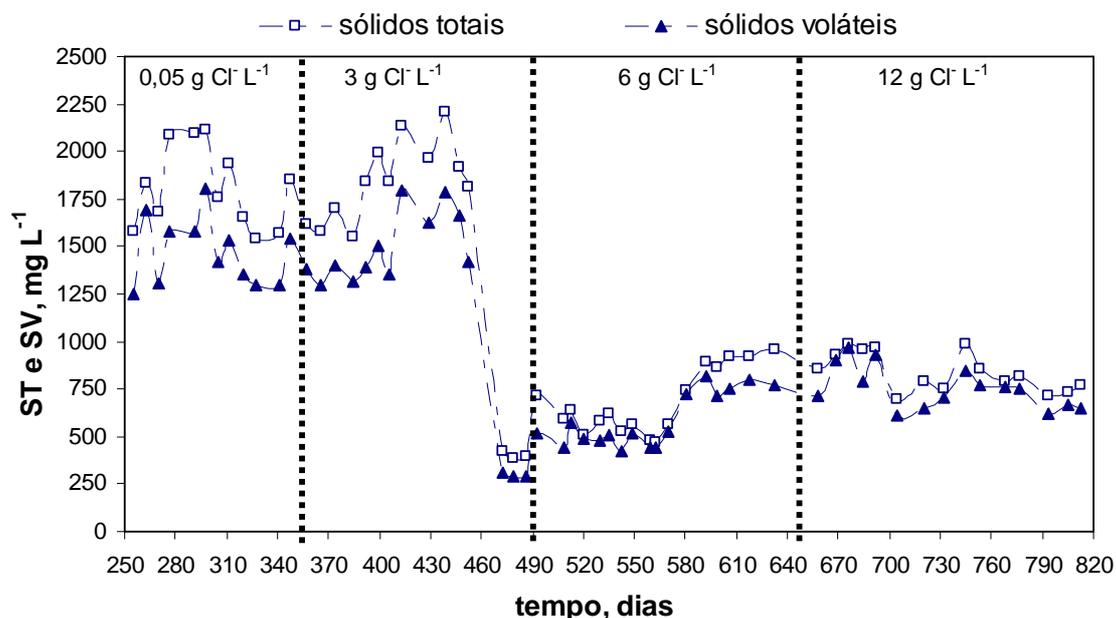


Figura 5.30 – Acompanhamento do teor de sólidos totais e voláteis referente ao biofilme, no MBBR, durante os quatro regimes operacionais investigados.

A Tabela 5.13 apresenta os valores médios dos resultados mostrados na Figura 5.30 para ST e SV e seus respectivos desvios padrão. Também está representada nesta tabela a razão SV/ST. Para o cálculo dos valores médios de ST e SV no regime 2, foram desconsiderados os dados referentes ao período de 460 a 490 dias, conforme será discutido adiante.

Tabela 5.13 – Valores médios obtidos para sólidos totais e voláteis representativos do biofilme durante os quatro regimes operacionais investigados.

Regimes operacionais	ST* (mg L ⁻¹)	SV* (mg L ⁻¹)	Razão SV/ST
1	3.101 ± 363	2.523 ± 301	0,81 ± 0,05
2	3.166 ± 361	2.562 ± 307	0,81 ± 0,04
3	1.166 ± 293	1.000 ± 244	0,86 ± 0,08
4	1.439 ± 177	1.295 ± 194	0,90 ± 0,06

*ST e SV representados em termos de massa aderida por volume de reação

Na Figura 5.30 é possível observar que nos dois primeiros regimes a biomassa aderida apresentou perfil variável. No final do segundo regime (dias 460 a 490) a queda brusca de ST e SV ocorreu por conta do desprendimento da maior parte do biofilme. Este material foi excluído do processo juntamente com o efluente tratado na forma de sólidos suspensos. Neste período, restou apenas uma película de biofilme no interior das biomédias, conforme será mostrado na Figura 5.33. A partir desta ocorrência, a biomassa apresentou, durante 90 dias, valores de SV em média três vezes menores do que no período anterior (em torno de 500 mg L^{-1}). Na metade do terceiro regime operacional ocorreu o crescimento mais acentuado da biomassa, passando em média de 850 mg L^{-1} para 1.350 mg L^{-1} . No regime 4, a biomassa apresentou perdas de sólidos voláteis associada ao aumento da alcalinidade no meio reacional pela entrada de quantidade inadequada de barrilha, conforme previamente relatado e manteve perfil variável até o final do período. Sugere-se que a elevada variabilidade observada pela quantificação da biomassa nos quatro regimes estudados não foi influenciada pelo teor salino no processo. Depreende-se que a matéria orgânica e problemas operacionais do sistema foram os principais fatores de interferência no crescimento microbiano.

A Figura 5.31 apresenta fotos comparativas das biomédias antes e após o desprendimento do biofilme. Na parte externa das biomédias, devido ao cisalhamento intenso entre as peças, o biofilme não é perceptível a olho nu, sendo visível somente na parte interna das mesmas. Das fotos se observa que mesmo na condição de maior crescimento microbiano (Figura 5.31A), o biofilme se mostrou bem fino, com característica distinta dos biofilmes predominantemente heterotróficos que, em geral, são mais espessos (REIS, 2007).

Algumas considerações podem ser feitas, no que se refere ao desprendimento do biofilme, ocorrido no final do segundo regime operacional. Este fenômeno de desprendimento “natural” da biomassa aderida vem sendo investigado por pesquisadores com o mesmo interesse que se tem pelos fenômenos associados à adesão do biofilme. A princípio, segundo CAMMAROTA (1998), o desprendimento se constitui na remoção de grandes quantidades ou seções inteiras do biofilme e, aparentemente, é um processo discreto que ocorre ao acaso.

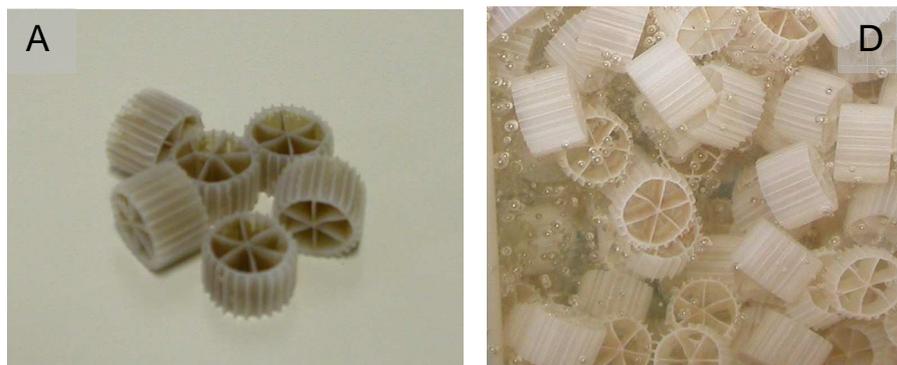


Figura 5.31 – Fotos comparativas do biofilme aderido às biomédias antes (A) e depois (D) do desprendimento do mesmo.

Alguns autores sugerem que as possíveis causas para este fenômeno seriam as taxas de cisalhamento aplicadas e a espessura do biofilme, sendo que biofilmes muito espessos poderiam causar limitações de transferência de oxigênio e de substrato, levando ao enfraquecimento da matriz da biomassa aderida (CHOI e MORGENROTH, 2003; HORN *et al.*, 2003; TELGMANN *et al.*, 2004). BELKHADIR (1986) *apud* CAMMAROTA (1998) considera, entretanto, que o desprendimento é o fim do crescimento do biofilme, que se caracteriza pela lise celular nas camadas mais profundas e pela destruição das células responsáveis pela fixação do biofilme à superfície.

Neste contexto, para o desprendimento da biomassa ocorrido neste trabalho infere-se que, devido à característica do biofilme relativamente fino que se desenvolveu, a possibilidade de limitação de oxigênio e substratos nas camadas mais profundas seria pouco provável. Em relação ao cisalhamento, conforme já comentado, o biofilme cresceu prioritariamente no interior das biomédias não estando exposto ao cisalhamento entre os suportes. A hipótese da causa do desprendimento mais provável, neste caso, estaria baseada nas considerações de BELKHADIR (1986) *apud* CAMMAROTA (1998), por se tratar de um biofilme com mais de 2 anos de desenvolvimento, podendo ser considerado um biofilme velho. Contudo, ainda não é satisfatoriamente compreendido que fração do biofilme que se desprende e como este desprendimento afeta a estrutura, a estabilidade, a ecologia microbiana e o próprio desempenho do processo biológico (ELENER *et al.*, 2007).

5.6.2 Determinação do teor de polissacarídeos e proteínas associados ao biofilme

A quantificação da biomassa em relação aos teores de polissacarídeos e proteínas livres, ligados e totais foi realizada somente durante o período de estudo dos quatro regimes operacionais propostos. Antes de iniciar tais determinações foram realizados testes de extração dos exopolímeros conforme descrito na seção 4.6.2.

A Figura 5.32 e a Tabela 5.14 apresentam os valores médios e seus respectivos desvios padrão, obtidos pela determinação dos polissacarídeos (PLS) livres, ligados e totais, relacionados ao biofilme. Também estão apresentados nesta tabela as razões $PLS_{\text{ligados}}/PLS_{\text{totais}}$, para os quatro regimes operacionais investigados.

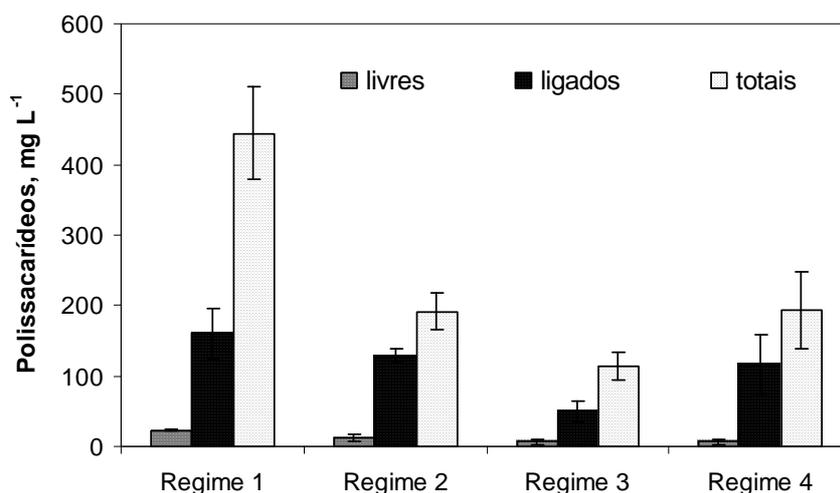


Figura 5.32 – Resultado das concentrações de polissacarídeos livres, ligados e totais obtidas nos quatro regimes operacionais investigados.

Observa-se da Figura 5.32 que os valores obtidos para as substâncias denominadas como livres, embora apresentem leve tendência de diminuição do regime 1 para o 4, podem ser considerados insignificantes quando comparados aos valores relativos aos PLS_{ligados} e aos PLS_{totais} .

Tabela 5.14 – Valores médios e seus respectivos desvios padrão obtidos para os polissacarídeos relacionados ao biofilme nos quatro regimes operacionais estudados.

Cl ⁻¹ (g L ⁻¹)	PLS (mg L ⁻¹)			
	Livres	Ligados	Totais	Ligados/Totais
0,05	23 ± 2	160 ± 35	445 ± 66	0,37 ± 0,12
3,0	13 ± 4	128 ± 10	192 ± 26	0,68 ± 0,10
6,0	7 ± 4	49 ± 16	113 ± 19	0,44 ± 0,13
12	7 ± 4	116 ± 43	192 ± 54	0,60 ± 0,08

A razão $PLS_{\text{ligados}}/PLS_{\text{totais}}$ permite observar que os resultados variaram em uma faixa razoavelmente ampla (0,37 – 0,68) sendo que: os PLS_{ligados} representaram em média 37% e 44% dos PLS_{totais} no primeiro e terceiro regimes operacionais, respectivamente, e 68% e 60% no segundo e quarto regimes de operação, respectivamente. Em decorrência, sugere-se que a relação entre a concentração de PLS_{ligados} e PLS_{totais} associada ao biofilme não foi diretamente influenciada pela matéria orgânica presente no meio reacional, mas sim pelo incremento dos íons cloreto. A adição de sal no regime 2, possivelmente, pode ter ativado algum mecanismo de proteção das células com relação ao estresse osmótico, o que resultou na maior quantidade de PLS_{ligados} em relação aos PLS_{totais} . Esta condição foi recorrente quando se dobrou a quantidade de íons cloreto no meio reacional do terceiro para o último regime, promovendo nova reação da microbiota presente.

A Figura 5.33 e a Tabela 5.15 apresentam os valores médios e seus respectivos desvios padrão, obtidos pela determinação das proteínas (PTN) livres, ligadas e totais, relacionadas ao biofilme. Também estão apresentadas na Tabela 5.15 as razões $PTN_{\text{ligadas}}/PTN_{\text{totais}}$, para os quatro regimes operacionais investigados.

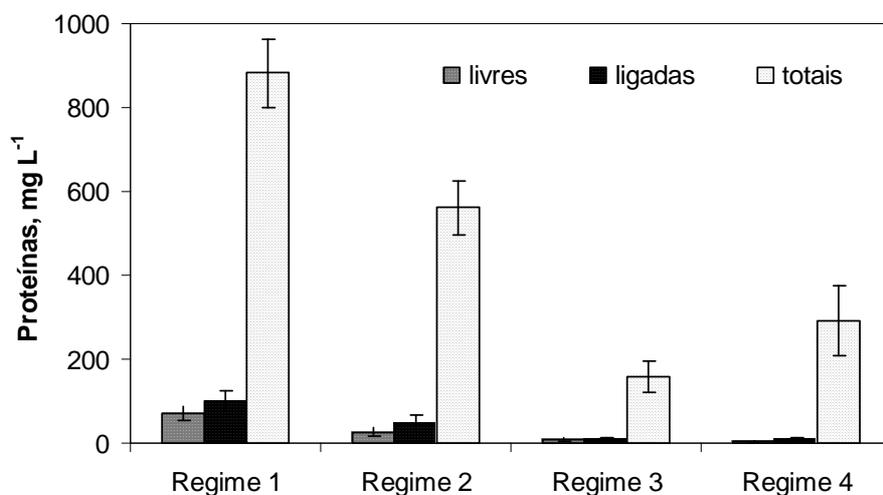


Figura 5.33 – Resultado das concentrações de proteínas livres, ligadas e totais obtidas nos quatro regimes operacionais investigados.

Tabela 5.15 – Valores médios e seus respectivos desvios padrão obtidos para as proteínas relacionadas ao biofilme nos quatro regimes operacionais estudados.

Cl ⁻¹ (g L ⁻¹)	PTN (mg L ⁻¹)			
	Livres	Ligadas	Totais	Ligadas/Totais
0,05	71 ± 17	99 ± 26	882 ± 80	0,11 ± 0,03
3,0	27 ± 11	48 ± 19	560 ± 63	0,08 ± 0,02
6,0	7 ± 4	8 ± 5	157 ± 38	0,06 ± 0,05
12	3 ± 2	9 ± 4	291 ± 82	0,03 ± 0,01

Observa-se da Figura 5.33 que os resultados obtidos para as proteínas denominadas como livres, embora apresentem leve perfil de queda do regime 1 para o 4, podem ser consideradas insignificantes em relação às PTN_{totais}. Da mesma forma, os valores das PTN_{ligadas} nos regimes 3 e 4 podem ser desconsiderados. Já os valores de PTN_{ligadas} nos regimes 1 e 2 podem estar associados à concentração de matéria orgânica no meio reacional. Quando na presença de razoável quantidade de compostos orgânicos biodegradáveis, as proteínas são mais atuantes por conta das enzimas que catalisam a hidrólise das macromoléculas orgânicas e do material particulado. Vale ressaltar que os regimes 1 e 2 foram caracterizados por apresentarem maior variabilidade na composição

orgânica do efluente, resultando inclusive em biofilmes mais densos e, que os regimes 3 e 4 trabalharam sob condições mais controladas destas substâncias.

A razão $PTN_{ligadas}/PTN_{totais}$ esteve compreendida em uma faixa mais estreita (0,03 – 0,11) do que aquela obtida para os PLS, apresentando valores próximos nos dois regimes intermediários (8% e 6% de $PTN_{ligadas}$ em relação às PTN_{totais}), 11% no regime 1, caracterizado pela maior interferência da matéria orgânica e, 3% no último regime, o qual esteve sob condições operacionais adversas, porém, sob menor influência do material carbonáceo no meio reacional.

Apesar de se observar claramente nas Figuras 5.32 e 5.33 a tendência de queda na concentração, tanto para as proteínas como para os polissacarídeos ligados e totais, do primeiro para o terceiro regime e leve aumento destas concentrações na condição de maior salinidade no meio, relacionar estas substâncias entre si e com a concentração da biomassa no MBBR, permite avaliar de maneira mais acurada o comportamento das mesmas e estabelecer uma possível comparação com os resultados apresentados na literatura. Portanto, a Figura 5.34 expressa graficamente os valores médios obtidos para as razões $PLS_{ligados}/SV$, PLS_{totais}/SV , PTN_{totais}/SV em cada condição experimental investigada, e a Tabela 5.16 apresenta os valores médios e os respectivos desvios padrão para estas razões.

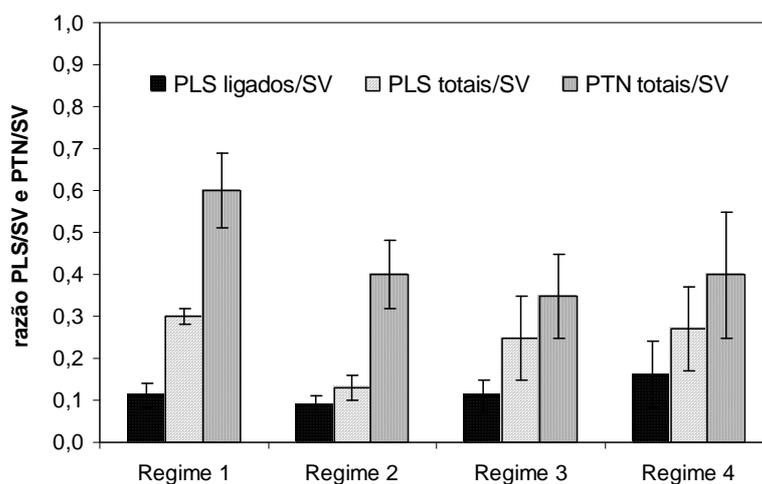


Figura 5.34 – Representação dos valores médios e seus respectivos desvios padrão para as razões polissacarídeos e proteínas em relação à biomassa aderida (SV) nos quatro regimes operacionais investigados.

Tabela 5.16 – Valores médios e seus respectivos desvios padrão obtidos para as razões polissacarídeos e proteínas em relação à biomassa aderida (SV) nos quatro regimes operacionais investigados.

Cl ⁻¹ (g L ⁻¹)	SV (mg L ⁻¹)	PLS/SV		PTN/SV Totais
		Ligados	Totais	
0,5	1.495 ± 182	0,11 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,60 ± 0,09
3,0	1.490 ± 217	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,40 ± 0,08
6,0	467 ± 76	0,11 ± 0,04	0,25 ± 0,10	0,35 ± 0,10
12	743 ± 103	0,16 ± 0,08	0,27 ± 0,10	0,40 ± 0,15

Dos dados apresentados na Figura 5.34 e Tabela 5.16 depreende-se que as três razões avaliadas mostraram perfil de comportamento distinto para os regimes operacionais investigados. A razão média dos PLS_{ligados}/SV permaneceu praticamente constante nos 3 primeiros regimes com leve acréscimo, porém maior dispersão, no regime 4. Os valores médios para a razão PLS_{totais}/SV se mostraram bastante próximos nos regimes 1, 3 e 4 e apresentaram decréscimo em torno de 50% para a condição de 3 g Cl⁻¹ L⁻¹ (regime 2). No caso da razão PTN_{totais}/SV na condição operacional sem adição de sal se obteve o valor médio mais expressivo (60% de proteínas em relação aos sólidos voláteis), sendo que os 3 regimes posteriores mantiveram praticamente o mesmo patamar em torno de 40% de proteína em relação aos SV. Os trabalhos realizados por FREIRE *et al.* (2001) e CAMPOS *et al.* (2002a) também constataram maior teor de proteínas do que de polissacarídeos na biomassa presente no tratamento biológico de efluentes industriais salinos.

DEORSOLA (2006) avaliou o comportamento de um lodo ativado, operado em modo de bateladas sequenciais, quando adicionado de diferentes concentrações de sais monovalentes e divalentes. Segundo a autora, no primeiro choque de salinidade, quando o teor dos íons monovalentes passou de 0% para 2% (m v⁻¹), houve redução da quantidade de PLS_{ligados} à biomassa. Porém, o aumento da salinidade de 2 para 4 e para 6% (m v⁻¹) foi acompanhado pelo aumento da razão PLS/SSV. No que se refere ao presente trabalho, a razão PLS_{ligados}/SV foi praticamente invariável até a condição de 0,6% (m v⁻¹) de íon cloreto, apresentando leve aumento quando alcançado o teor de cloreto de 1,2% (m v⁻¹) no MBBR.

A Figura 5.35 e a Tabela 5.17 apresentam os valores médios obtidos para as razões $PLS_{ligados}/PTN_{totais}$, $PTN_{ligadas}/PLS_{ligados}$, $PLS_{totais}/PTN_{totais}$ em cada condição experimental investigada.

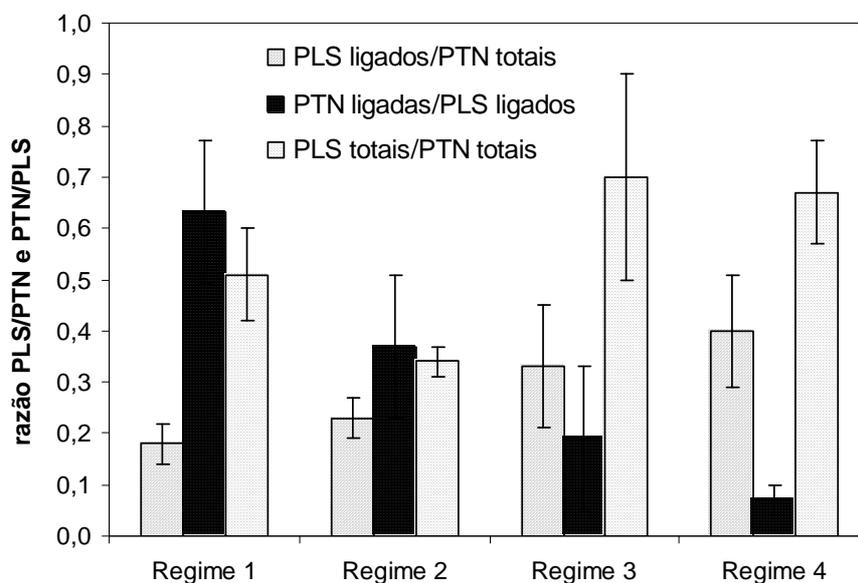


Figura 5.35 – Representação dos valores médios e seus respectivos desvios padrão para as razões polissacarídeos e proteínas em relação à biomassa aderida nos quatro regimes operacionais estudados.

Assim como para as razões PTN/SV e PLS/SV , da Figura 5.35 é possível observar que o perfil das razões $PLS_{ligados}/PTN_{totais}$, $PTN_{ligadas}/PLS_{ligados}$, $PLS_{totais}/PTN_{totais}$ em relação ao incremento do teor de sal no MBBR também foi distinto para os três parâmetros avaliados.

Neste caso optou-se pelo tratamento estatístico dos conjuntos de dados para auxiliar na discussão dos resultados. Por conta da expressiva variabilidade representada pelo desvio padrão destes parâmetros, utilizou-se o teste F de Fisher ao invés do teste t de Student, para comparar as razões PLS/PTN nos quatro regimes operacionais. O teste F trabalha com as variâncias dos conjuntos de dados, o que permite comparações mais eficientes entre diferentes variâncias amostrais. Os valores de F, assim como os intervalos de confiança das variâncias, foram obtidos com o auxílio do Programa Computacional Statistica versão 6.0.

Tabela 5.17 – Valores médios e seus respectivos desvios padrão obtidos para as distintas razões polissacarídeos e proteínas nos quatro regimes operacionais investigados.

Cl^{-1} (g L^{-1})	$\text{PLS}_{\text{ligados}}/\text{PTN}_{\text{totais}}$	$\text{PTN}_{\text{ligadas}}/\text{PLS}_{\text{ligados}}$	$\text{PLS}_{\text{totais}}/\text{PTN}_{\text{totais}}$
0,05	$0,18 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,14$	$0,51 \pm 0,09$
3,0	$0,23 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0,14$	$0,34 \pm 0,03$
6,0	$0,33 \pm 0,12$	$0,19 \pm 0,14$	$0,70 \pm 0,20$
12,0	$0,40 \pm 0,11$	$0,07 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,10$

No que diz respeito aos resultados apresentados para a razão $\text{PLS}_{\text{ligados}}/\text{PTN}_{\text{totais}}$, pode-se inferir que ocorreu leve incremento no teor de $\text{PLS}_{\text{ligados}}$ em relação às $\text{PTN}_{\text{totais}}$ da biomassa, do primeiro para o último regime operacional. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por DEORSOLA (2006) que em seu trabalho observou tendência crescente da razão $\text{PLS}_{\text{ligados}}/\text{PTN}_{\text{totais}}$ com o aumento do teor de sal, enfatizando que a salinidade provocou aumento da concentração dos polissacarídeos extracelulares e redução do teor de proteína da biomassa. Por outro lado, a aplicação do teste F mostrou que não existe diferença significativa entre os conjuntos de dados referentes às condições de 0,05 e 3 $\text{g Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e 6 e 12 $\text{g Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$, respectivamente, ou seja, os regimes 1 e 2 separadamente dos regimes 3 e 4 apresentam em média, com 95% de confiança, o mesmo comportamento para a razão $\text{PLS}_{\text{ligados}}/\text{PTN}_{\text{totais}}$. Desta maneira, sugere-se que menores teores de matéria orgânica, além do incremento da salinidade acima de 6 $\text{g Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$ foram os principais fatores de interferência nesta relação.

Para a razão $\text{PTN}_{\text{ligadas}}/\text{PLS}_{\text{ligados}}$ observa-se na Figura 5.35 a tendência de queda da condição com menor teor de sal para a mais salina. Portanto, ocorreu o decréscimo da porção de $\text{PTN}_{\text{ligadas}}$ à biomassa em relação aos $\text{PLS}_{\text{ligados}}$ com o incremento dos íons cloreto no meio reacional. Pelo teste F com nível de confiança de 95%, apenas o regime com 12 $\text{g Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$ apresentou diferença significativa em relação aos quatro regimes estudados. Isto sugere que somente o teor de sal mais elevado interferiu diretamente na relação $\text{PTN}_{\text{ligadas}}/\text{PLS}_{\text{ligados}}$.

No caso da razão $\text{PLS}_{\text{totais}}/\text{PTN}_{\text{totais}}$ não se identificou qualquer perfil de comportamento. A partir da aplicação do teste F para os conjuntos de dados

representativos desta razão, obteve-se com 95% de certeza que o regime 2 foi o único a apresentar diferença significativa entre as razões dos quatro regimes operacionais estudados. Depreende-se, portanto, que neste caso não é possível relacionar a variação destas substâncias com os parâmetros salinidade ou matéria orgânica.

AHN *et al.* (2007) avaliaram o teor de exopolímeros, como carboidratos e proteínas, no tratamento de um efluente sintético com alta carga orgânica e nitrogenada, utilizando um reator biológico com membranas submersas. Os autores constataram que não ocorreram diferenças significativas no conteúdo das proteínas e carboidratos associados ao biofilme formado sobre as membranas, em relação às diferentes taxas de recirculação do efluente aplicadas. Portanto, não foi possível observar qualquer tendência de variação da razão carboidratos/proteínas com as diferentes condições operacionais aplicadas ao processo.

Além do teste F, também foi calculada, com o auxílio do Programa Statistica, a matriz de correlação para as razões $PLS_{ligados}/PTN_{totais}$, $PTN_{ligadas}/PLS_{ligados}$, $PLS_{totais}/PTN_{totais}$, com a finalidade de conhecer o grau de dependência entre estas variáveis. Contrariamente ao que era esperado, os únicos parâmetros que apresentaram razoável grau de dependência, para os 4 regimes operacionais estudados, foram os PLS_{totais} e as PTN_{totais} . Para as razões $PLS_{ligados}/PTN_{totais}$ (relação mais utilizada na literatura) e $PLS_{ligados}/PTN_{ligadas}$ foi observada apenas leve correlação para o regime com maior teor salino ($12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$), sendo que se pode considerar que estes parâmetros apresentaram grau de flutuação independente entre eles. Este fato pode ser devido à interferência de diversos fatores na produção destas substâncias, e também por conta da elevada variabilidade dos resultados.

Conforme comentado anteriormente, as muitas variáveis relacionadas à extração e determinação dos exopolímeros (substâncias ligadas), assim como a diversidade das características inerentes à cada unidade de tratamento de efluentes, tornam muito complexa a comparação com os resultados apresentados na literatura. Por outro lado, quando comparados resultados obtidos a partir da mesma metodologia de determinação dos PLS e PTN os valores observados mostraram-se relativamente próximos. A Tabela 5.18 sumariza os valores encontrados por alguns autores que usaram a mesma metodologia para determinação destas razões. Os dados apresentados correspondem

aos $PLS_{ligados}$ e PTN_{totais} para sistemas com biomassa em suspensão (flocos) e biomassa aderida (biofilme). É interessante observar que, apesar da diversidade das características dos trabalhos desenvolvidos, estas relações mostraram-se bem próximas para os flocos microbianos e biofilmes.

Tabela 5.18 – Razões dos parâmetros SSV, PTN e PLS para flocos e biofilmes, adaptado de SANT'ANNA JR. (2007).

	PLS_{lig}/SSV	PTN_{tot}/SSV	PLS_{lig}/PTN_{tot}	Reator ou Processo	Referência
Biofilmes	0,09 – 0,16	0,35 – 0,60	0,18 – 0,40	MBBR	este trabalho
	0,05 – 0,07	0,39 – 0,52	0,12 – 0,20	leito submerso	VENDRAMEL, 2004
			0,04 – 0,35	fluxo sobre placas	CAMMAROTA, 1998
Flocos	0,02 – 0,03	0,23 – 0,38	0,10	SBR*	FREIRE <i>et al.</i> , 2001
		0,18 – 0,32		air-lift	CAMPOS <i>et al.</i> , 2002a
	0,06 – 0,08	0,17 – 0,46	0,10 – 0,24	lodo ativado	MATIAS, 2000
	0,01 – 0,04	0,12 – 0,25	0,08 – 0,20	SBR*	DEORSOLA, 2006

*reator de batelada seqüencial – efluente salino

Apesar da importância das substâncias poliméricas, principalmente as extracelulares (EPS), na formação de flocos microbianos e biofilmes e o contínuo interesse dos pesquisadores no tema, o entendimento da dinâmica dos EPS nos consórcios microbianos ainda é limitado e a elucidação de sua composição e funções ainda se faz necessária (PARK e HELM, 2008).

5.6.3 Caracterização do biofilme por microscopia óptica

A microscopia óptica é uma ferramenta que vem sendo utilizada com crescente frequência como controle operacional em estações de tratamento de efluentes (ETEs) com biomassa em suspensão (ex. lodos ativados) por conta da significativa presença de protozoários e metazoários nos processos biológicos aeróbios. Neste contexto, estudos da interação entre protozoários, metazoários e flocos microbianos estão praticamente consolidados (JENKINS *et al.*, 1993), podendo ser diretamente relacionados ao desempenho das ETEs e à qualidade dos efluentes tratados.

Por outro lado, esta é uma realidade somente para a biomassa em suspensão em tratamentos secundários – os quais têm como objetivo principal a remoção da matéria orgânica dissolvida. No caso da biomassa aderida (biofilmes) não existe muito conhecimento a respeito da importância ou relação desses micro-organismos com as questões operacionais, sobretudo quando se trata do processo de nitrificação no tratamento terciário.

Portanto, as observações do biofilme ao microscópio óptico, realizadas durante o presente experimento, tiveram como objetivo acompanhar a dinâmica dos possíveis protozoários presentes na microbiota desenvolvida no MBBR em questão. A Figura 5.36 apresenta as observações realizadas ao microscópio no final da primeira etapa de operação do biorreator (primeiros 250 dias).

As fotomicrografias da Figura 5.36 mostram que a biomassa desenvolvida até então pode ser considerada densa, sem a presença de bactérias filamentosas (características da biomassa em suspensão) e com boa diversidade de protozoários e metazoários, porém, com baixa densidade dos mesmos.

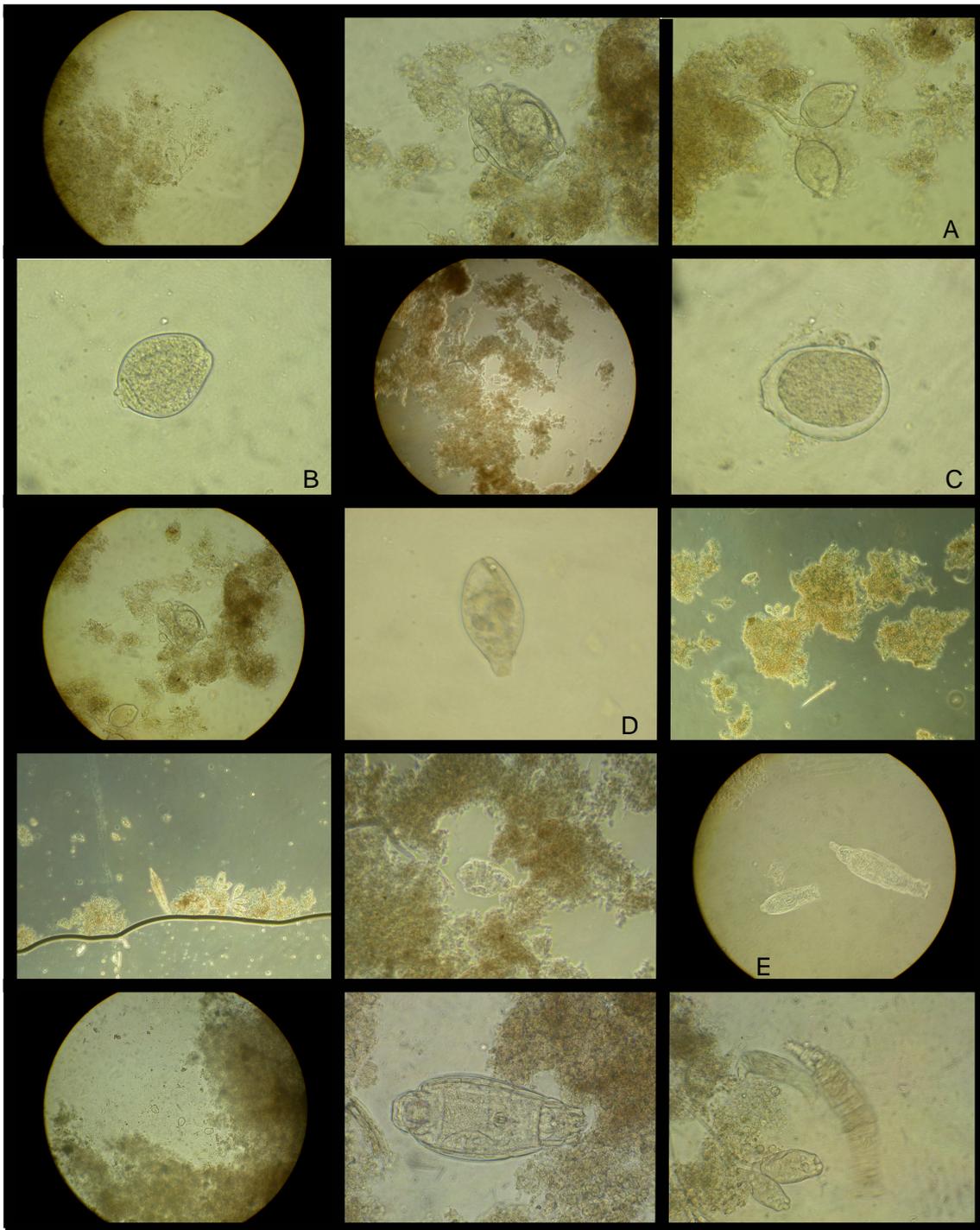


Figura 5.36 – Fotomicrografias do biofilme no final dos primeiros 250 dias de operação do MBBR. (A) ciliado sésil da espécie *Epistylis* sp.; (B) ciliado livre-natante da espécie *Euplotes* sp.; (C) ameba com teca; (D) ciliado livre-natante da espécie *Paramecium* sp.; (E) rotíferos.

As Figuras 5.37, 5.38, 5.39 e 5.40 apresentam as observações realizadas ao microscópio óptico durante os regimes 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

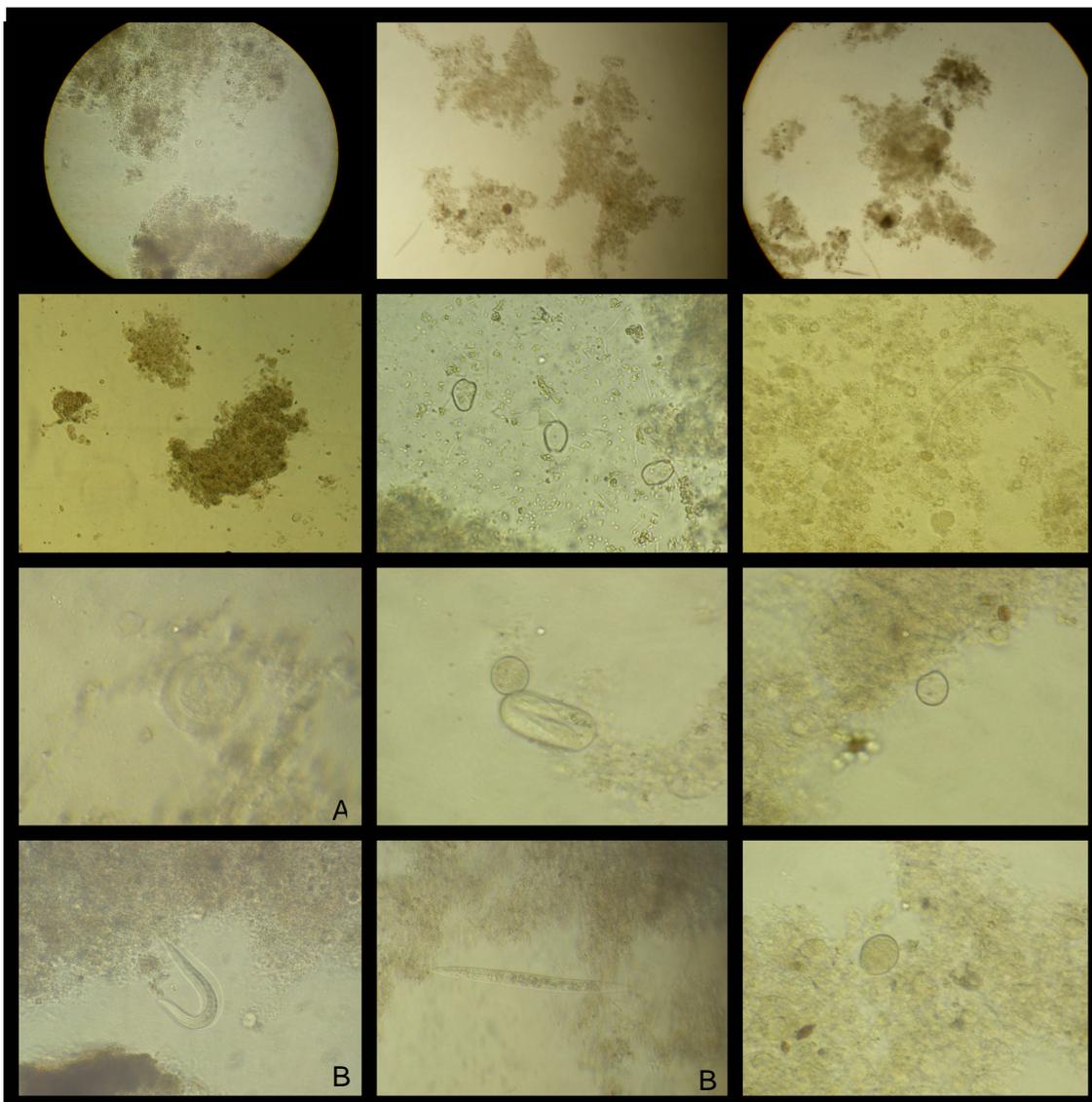


Figura 5.37 – Fotomicrografias do biofilme durante o primeiro regime de operação do MBBR (regime 1 = $0,05 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$). (A) provável ameba com teca; (B) nematódeos; os demais organismos presentes nas microfotografias não foram identificados.

Das fotomicrografias que representam as características gerais visualizadas no regime 1 (Figura 5.37), depreende-se que o biofilme manteve-se denso como na condição anterior (Figura 5.36), porém, com menor diversidade de protozoários, ausência dos metazoários (rotíferos) e presença de nematódeos, que estão normalmente associados a

lodos velhos (SALVADO *et al.*, 2004). Comparando-se o regime 1 com o final da etapa operacional anterior, infere-se que as alterações visualizadas na microbiota coincidem com a queda de desempenho no processo de nitrificação e, ademais, que os mesmos parâmetros que afetaram o processo, conforme previamente explicado, provocaram alterações na dinâmica dos protozoários e o desaparecimento dos rotíferos.

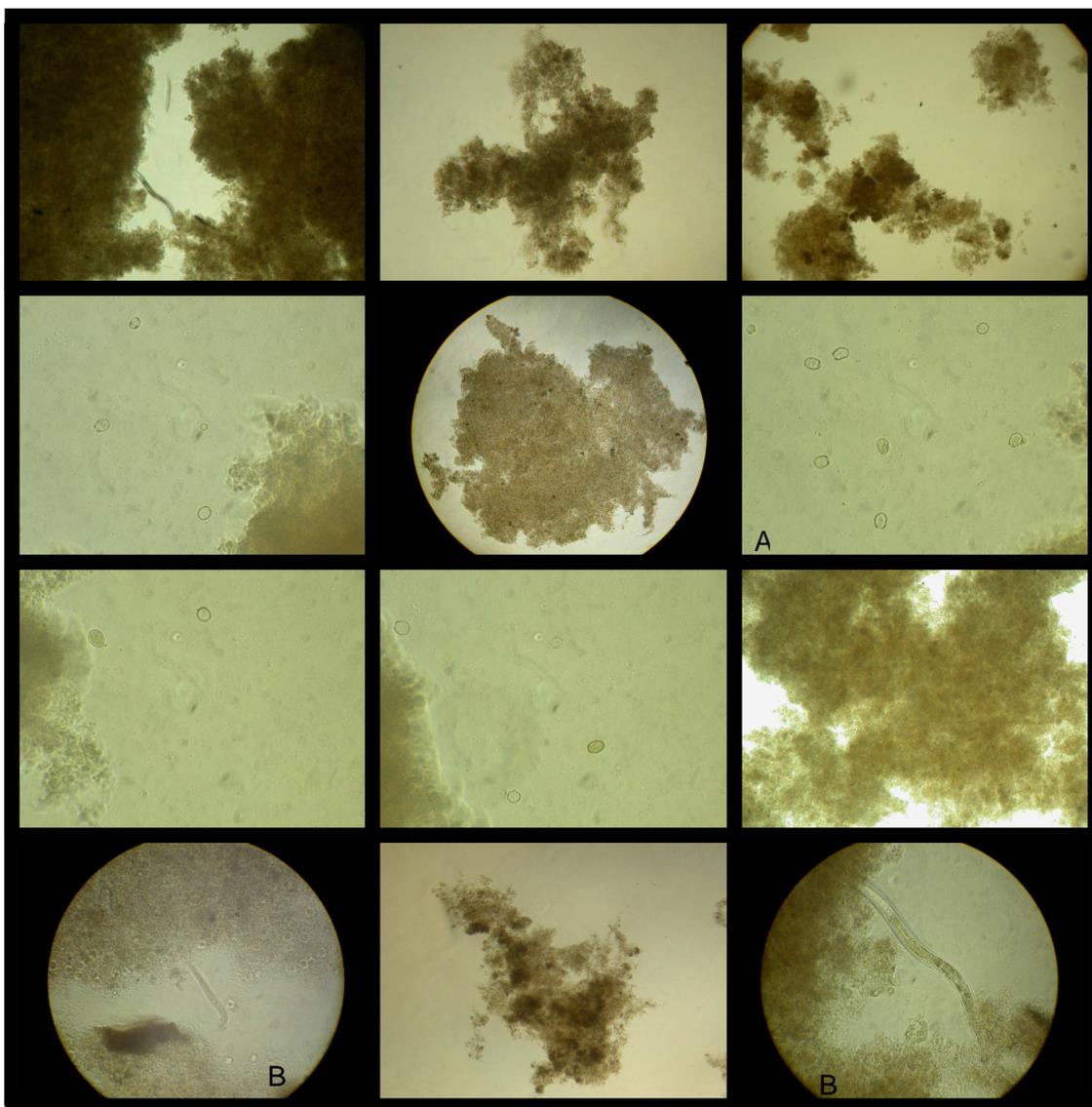


Figura 5.38 – Fotomicrografias do biofilme durante o segundo regime de operação do MBBR (regime 2 = 3 g Cl⁻ L⁻¹). (A) ciliados livre-natantes; (B) nematódeos.

No regime 2, as fotomicrografias apresentadas na Figura 5.38 mostram que o biofilme tornou-se ainda mais denso do que nos períodos anteriores e que ocorreu a

presença de protozoários apenas da classe *Ciliata* do tipo livre-natantes, porém de uma dimensão que não foram passíveis de identificação. Os nematódeos permaneceram durante esta condição operacional.

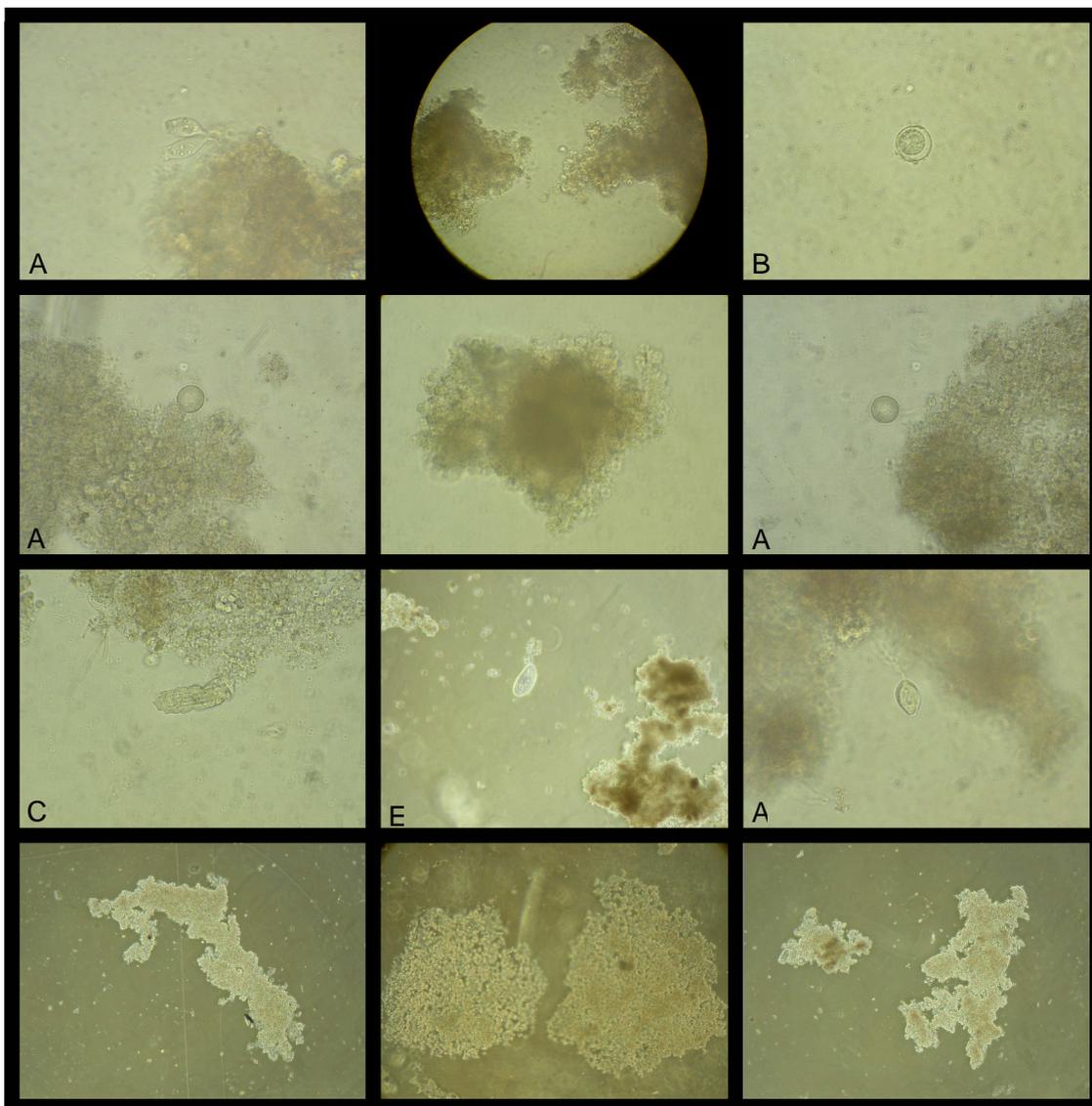


Figura 5.39 – Fotomicrografias do biofilme durante o terceiro regime de operação do MBBR (regime 3 = 6 g Cl⁻ L⁻¹). (A) ciliados sésseis; (B) ameba com teca; (C) possível rotífero; (E) ciliado livre-natante.

Da Figura 5.39, referente ao regime 3, observa-se pelas microfotografias que mesmo após a ocorrência do desprendimento do biofilme no final do regime 2, o mesmo se desenvolveu satisfatoriamente apresentando certa densidade e baixa diversidade de

protozoários. Infere-se que a biomassa, prioritariamente autotrófica, também gerou condições para o crescimento de alguns protozoários e que a concentração de $6 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ não teve efeito inibitório sobre os mesmos. Os nematódeos, nesta condição, não se fizeram presentes em qualquer das observações realizadas ao microscópio.

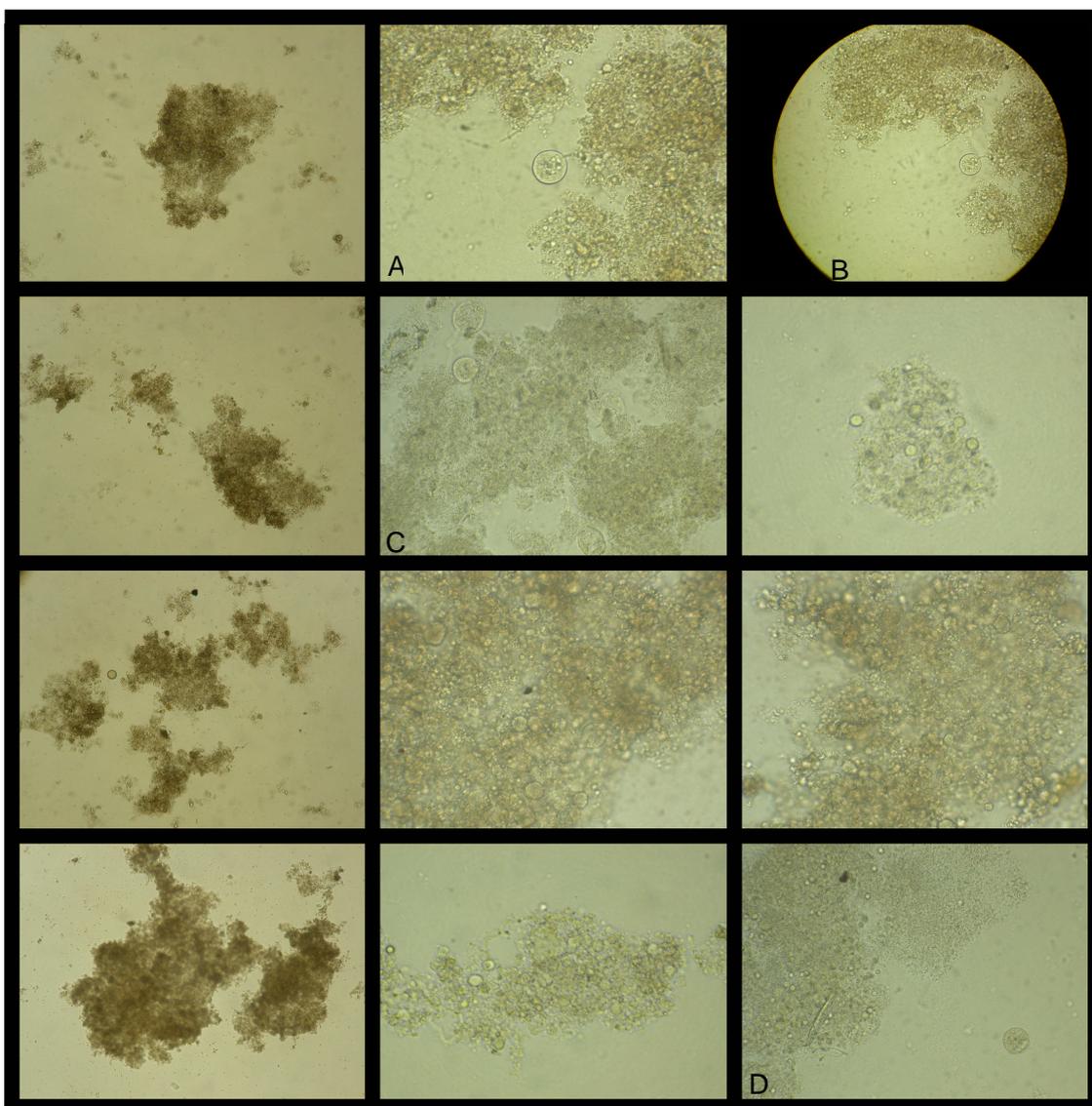


Figura 5.40 – Fotomicrografias do biofilme durante o último regime de operação do MBBR (regime 4 = $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$). (A), (B), (C) e (D) ciliados sésseis.

No caso do regime 4, representado pelas fotomicrografias da Figura 5.40, sugere-se que $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ levou à efetiva diminuição da diversidade e densidade dos protozoários. Foi detectada apenas a presença de ciliados sésseis e de uma única espécie. Sugere-se

que as pequenas partículas brilhantes associadas à biomassa, nesta condição salina, possam ser decorrentes do acúmulo de cristais de sal no biofilme.

DEORSOLA (2006) verificou no processo de lodos ativados o desaparecimento de protozoários e metazoários em concentrações de NaCl a partir de 2% ($m\ v^{-1}$), condizente com a condição de salinidade do regime 4 no presente trabalho. Durante seus experimentos, DEORSOLA (2006) também observou o aumento da turbidez no meio líquido, indicando fragmentação dos flocos em suspensão com o incremento da salinidade, pela incorporação dos cátions à biomassa microbiana. Esta ocorrência contribuiu para a defloculação da biomassa em suspensão, resultando em problemas na sedimentação do lodo. No caso da biomassa aderida, a possível incorporação de sais ao biofilme não acarretou problemas operacionais ao processo por conta da inexistência da etapa de sedimentação.

Segundo POOLE (1984) *apud* ABREU (2004), em estações de tratamento de lodos ativados as amebas tecadas são abundantes ou dominantes em condições de operação caracterizadas por baixa carga orgânica, longo tempo de retenção e alta concentração de OD, sendo estas características consideradas ideais para alcançar excelente desempenho na remoção de amônia pela via biológica convencional. No que se refere ao presente trabalho, em todas as observações do biofilme realizadas ao microscópio, quando em condições de bom desempenho para a nitrificação, pode-se constatar a presença de amebas tecadas, porém, muito aquém da ocorrência sugerida por POOLE (1984) *apud* ABREU (2004).

O índice biótico de lodos (IBL) é um método que foi proposto por MADONI (1994) para avaliar a abundância e diversidade dos protozoários sob os diferentes fatores físico-químicos aplicados aos sistemas de tratamento biológico. Fazendo uso do IBL, MADONI (1994) concluiu que a riqueza em espécies de protozoários tende a se alterar com a carga orgânica presente. O maior número de espécies foi observado para cargas compreendidas entre 0,2 e 0,3 kg DBO₅ kg⁻¹ SSV d⁻¹, ocorrendo o decréscimo da densidade da microbiota com a diminuição da carga mássica. Contudo, este autor sugere que em unidades de tratamento com objetivo de remoção da amônia, espera-se encontrar uma microbiota menos abundante do que nos processos que visam a biodegradação de

compostos orgânicos, sendo que esta consideração coincidiu com as observações realizadas no presente trabalho.

O teor mínimo de NaCl e o tempo de contato requeridos para a total eliminação de protozoários e metazoários sem afetar a atividade das bactérias autotróficas foi investigado por MOUSSA *et al.* (2005). Os autores cultivaram a comunidade nitrificante em um SBR com biomassa em suspensão e constataram que a adição de 5 g Cl⁻ L⁻¹ ao meio e exposição a esta condição por 1 h foi totalmente deletério aos protozoários e metazoários, porém não afetou a atividade das bactérias nitrificantes. Visualizações ao microscópio permitiram constatar a perda na mobilidade destes organismos e consequente inchaço dos mesmos, provavelmente por conta do aumento da pressão osmótica.

5.7 Caracterização do biofilme pela técnica de Hibridização *in situ* por Fluorescência

A técnica de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH) foi aplicada com o objetivo de detectar as bactérias responsáveis pela nitrificação convencional no MBBR e, possivelmente, associar a dinâmica das mesmas com as características dos quatro regimes operacionais investigados.

Por conta das dificuldades encontradas na detecção das bactérias presentes na biomassa, primeiramente pela autofluorescência associada às amostras, e por não se ter alcançado as condições ideais de aplicação do método para a comunidade microbiana em questão, o objetivo da utilização do FISH foi parcialmente alcançado.

5.7.1 Cultivo das células para validação das sondas de FISH

Pelo procedimento descrito na seção 4.7.1 foi possível promover o crescimento isolado de pelo menos uma espécie de AOB e uma de NOB. Após 10 dias de incubação na estufa a 37°C, as culturas inoculadas nas placas de Petri apresentaram as características visualizadas na Figura 5.41.

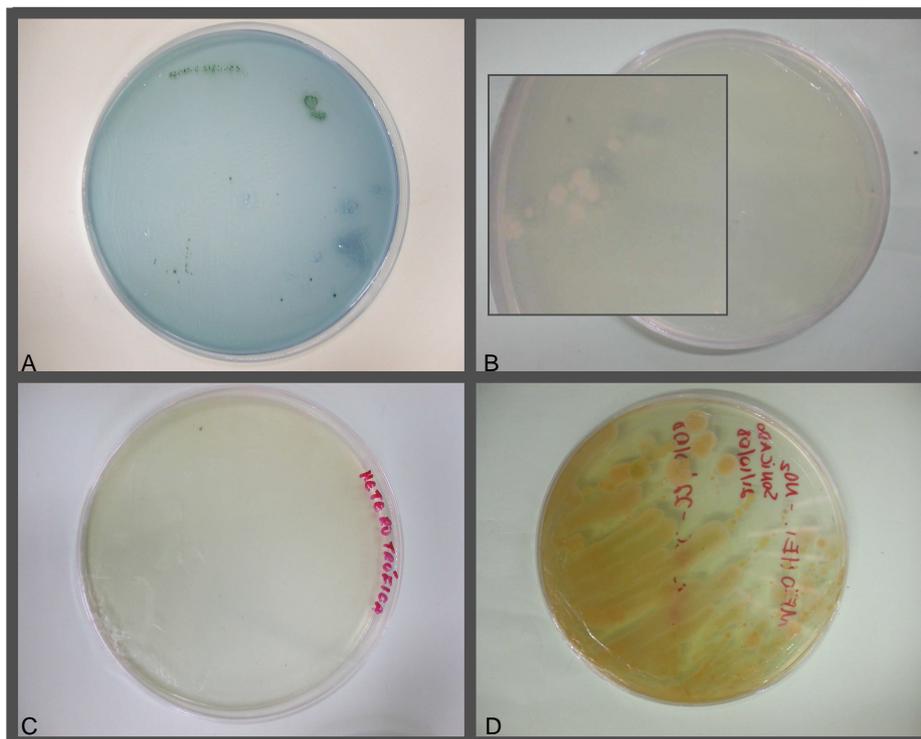


Figura 5.41 – Placas após 10 dias de incubação para o isolamento das bactérias que oxidam amônia e nitrito. (A) placa para isolamento das AOB; (B) placa para isolamento das NOB com a cultura destacada no detalhe; (C) placa com meio heterotrófico antes da incubação; (D) placa com meio heterotrófico depois da incubação.

A coloração esverdeada observada na placa para isolamento das AOB (Figura 5.41A) ocorreu por conta da presença do mesmo indicador de pH utilizado no meio de isolamento líquido e, conseqüentemente, pela produção dos íons H^+ durante a conversão de amônia.

Depreende-se da visualização das placas apresentadas na Figura 5.41 que o crescimento das bactérias autotróficas foi praticamente insignificante quando comparado com o das heterotróficas no mesmo período de tempo. Das placas A e B, apresentadas na Figura 5.41, as culturas foram removidas, lavadas com tampão fosfato e fixadas para a validação das sondas de FISH, seguindo os procedimentos apresentados no Anexo I.4.

As culturas removidas das placas de isolamento, depois de fixadas, foram hibridizadas com as respectivas sondas de identificação para cada grupo de bactérias de

interesse, sonda Nso1225 para as AOB e sonda Nit3 para as NOB. Durante a preparação das lâminas, para cada poço com sonda foi montado um poço apenas com a amostra e o tampão de hibridização para o controle negativo da possível autofluorescência das culturas, ou seja, nesta condição não se deveria observar fluorescência. DAPI foi adicionado a todos os poços para verificar a integridade das células. Assim, as sondas para a identificação das AOB e das NOB foram validadas, conforme ilustram as Figuras 5.42 e 5.43.

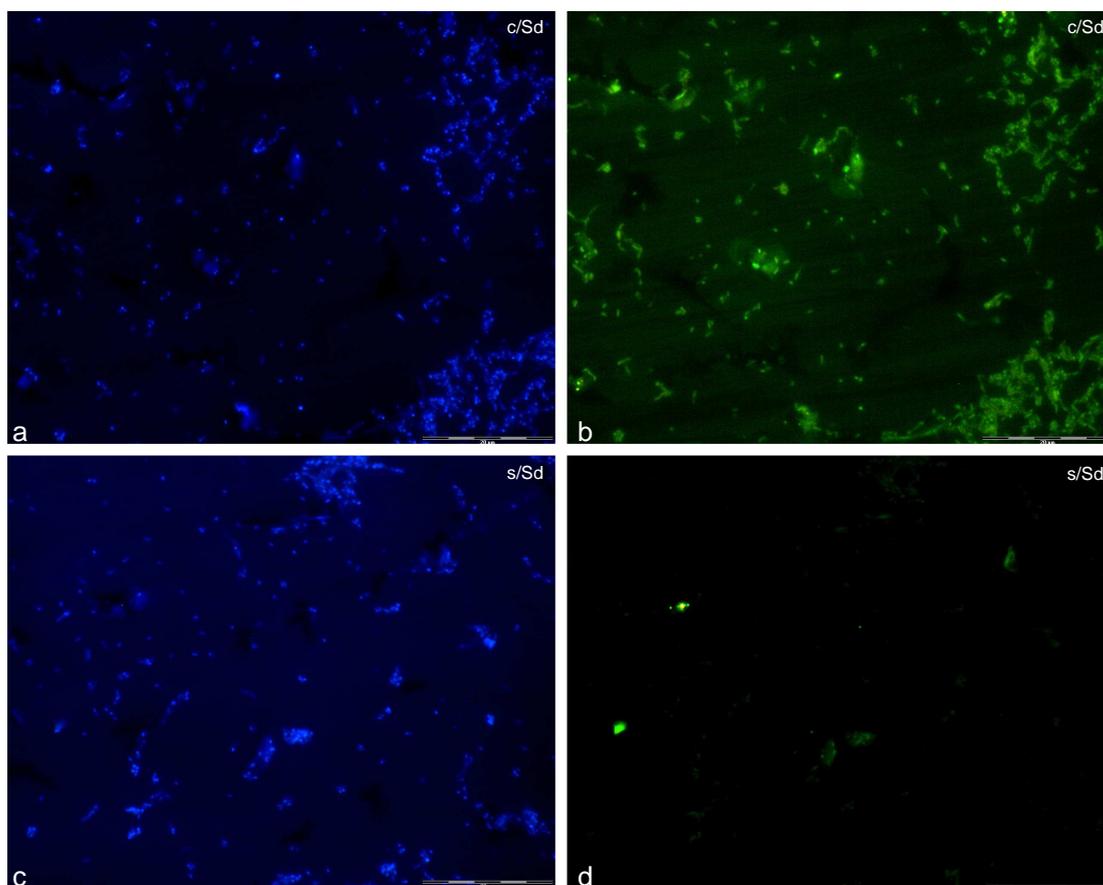


Figura 5.42 – Fotomicrografias dos resultados obtidos para a validação da sonda Nso1225 referente à identificação das AOB pela aplicação da técnica de FISH. As imagens lado a lado estão focadas no mesmo campo de visualização do microscópio, porém, com filtros distintos para DAPI (a – c) e para a sonda específica Nso1225 (b – d). As imagens da linha inferior são o controle da autofluorescência sem adição da sonda (s/sd) e as da linha superior são os testes com sonda (c/sd); barra igual a 20 μ m.

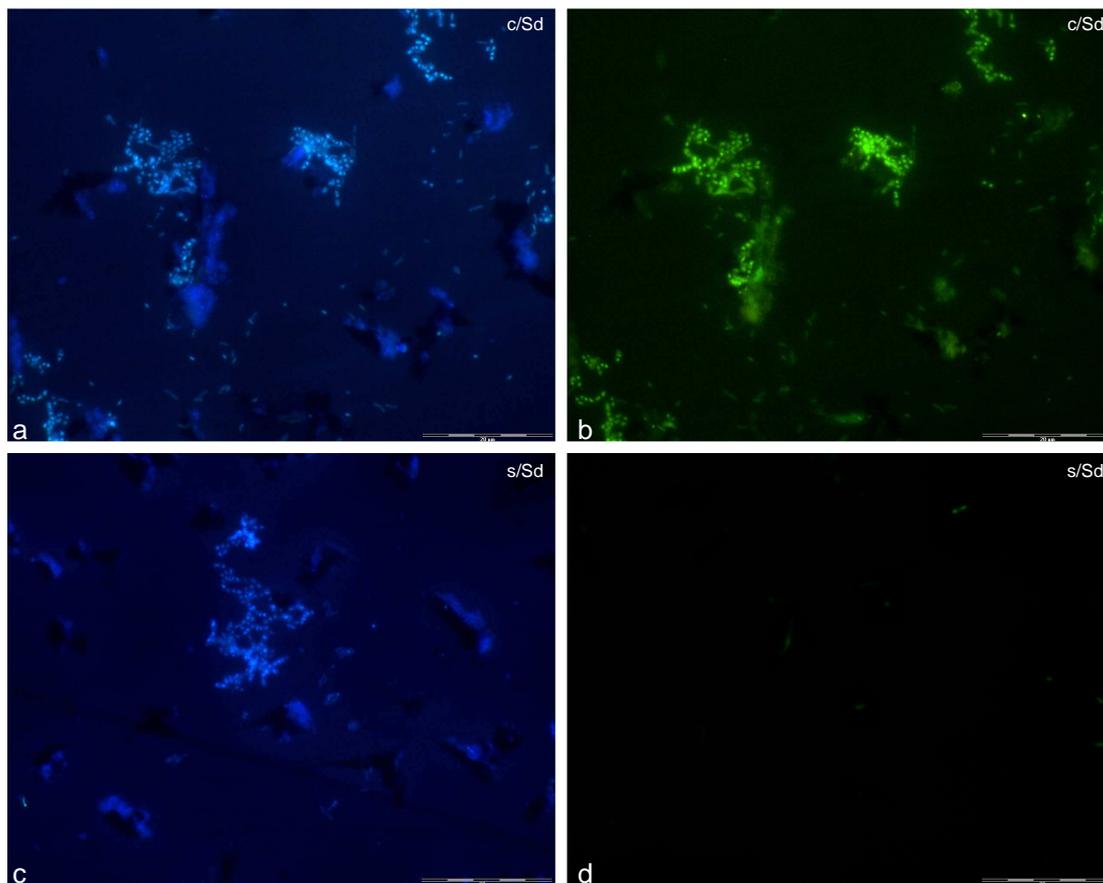


Figura 5.43 – Fotomicrografias dos resultados obtidos para a validação da sonda Nit3 referente à identificação das NOB pela aplicação da técnica de FISH. As imagens lado a lado estão focadas no mesmo campo de visualização do microscópio, porém com filtros distintos para DAPI (a – c) e para a sonda específica Nit3 (b – d). As imagens da linha inferior são o controle da autofluorescência sem adição da sonda (s/sd) e as da linha superior são os testes com sonda (c/sd); barra igual a 20 µm.

As sondas foram validadas com sucesso, porém depreende-se pela visualização das imagens nas Figuras 5.42d e 5.43d, que existe uma leve autofluorescência associada às culturas, mais evidente para as AOB. Este fato será discutido na próxima seção.

5.7.2 Aplicação da técnica de FISH no biofilme do MBBR

A primeira dificuldade encontrada na aplicação da técnica de FISH para as amostras do MBBR foi a autofluorescência inerente às mesmas. O resultado obtido pela primeira realização do teste (regime 1) apenas com DAPI e a sonda EUB338 (domínio *Bacteria*), gerou a necessidade de investigar maneiras de dissociar a biomassa, sem danificar as células, para diminuir a influência da autofluorescência identificada nas amostras. A Figura 5.44 apresenta as imagens obtidas no microscópio de fluorescência que ilustram o ocorrido.

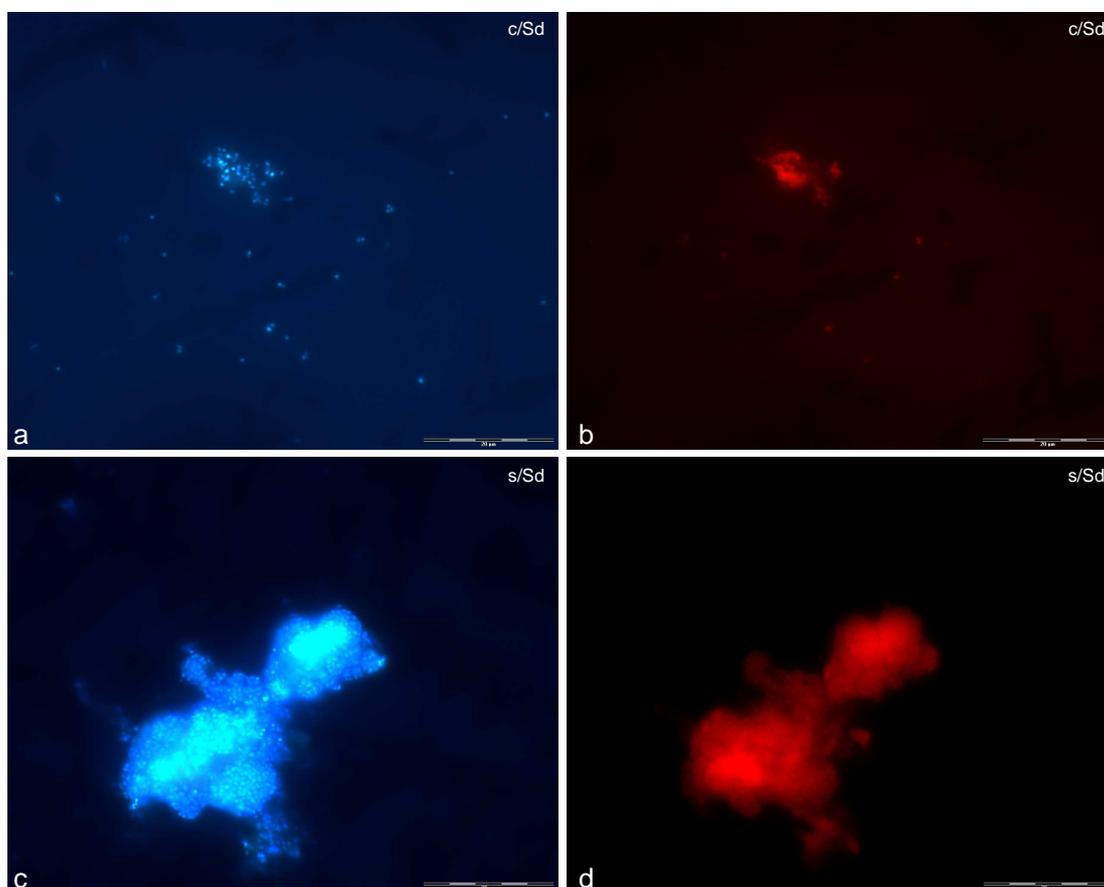


Figura 5.44 – Fotomicrografias dos resultados obtidos da aplicação de FISH para as amostras da biomassa do regime 1. As imagens lado a lado estão focadas no mesmo campo de visualização do microscópio, porém com filtros distintos para DAPI (a – c) e para a sonda EUB338 (b – d). As imagens da linha inferior são o controle da autofluorescência sem adição da sonda (s/sd) e as da linha superior são os testes com sonda (c/sd); barra igual a 20 µm.

Infere-se da Figura 5.44d, sem adição de sonda, que as amostras apresentaram forte autofluorescência, principalmente quando associadas ao aglomerado microbiano (grumos). No caso dos testes com a sonda EUB338 (Figura 5.44b) a autofluorescência na região onde as células estão organizadas em grumos impediu a visualização da marcação individual das mesmas. Por outro lado, nem todas as células individualizadas observadas com DAPI (Figura 5.44a) apresentaram marcação, o que sugere que as condições aplicadas ao ensaio não permitiram o adequado acesso da sonda às células. Infere-se que a autofluorescência observada seja inerente à matriz extracelular do biofilme, representada pelos grumos e que esta seja autofluorescente ou, ainda, que esta matriz possa estar se unindo à sonda de maneira inespecífica.

Segundo DE LOS REYS *et al.* (1997), amostras de lodos ativados contêm matéria orgânica e células que autofluorescem, resultando em incertezas na marcação das sondas de oligonucleotídeos. Contudo, nenhum dos trabalhos consultados na literatura coloca qualquer relato sobre problemas de autofluorescência na identificação de bactérias nitrificantes. Ademais, pouquíssimos artigos publicados comentam sobre problemas com a autofluorescência das amostras ambientais, talvez por conta da maioria dos trabalhos serem realizados com amostras a partir de meios sintéticos, sugerindo que o problema da autofluorescência pode estar associado a amostras de biomassa destinadas ao tratamento de efluentes reais.

A partir destas considerações, primeiramente foram testadas todas as etapas do ensaio para verificar se algum reagente poderia estar conferindo esta autofluorescência às amostras. Os resultados relativos a este teste mostraram que a amostra em si, depois de fixada, já se apresentava autofluorescente. Neste caso, poderia ainda se associar o fato aos reagentes utilizados na etapa de fixação, porém, isto não poderia ser averiguado para todos os regimes por não existirem amostras disponíveis para nova etapa de fixação. Portanto, focou-se no objetivo de desagregar o aglomerado microbiano em que se encontravam as células de interesse.

Duas metodologias foram aplicadas com este intuito: cisalhamento da biomassa pré-fixada com pérolas de vidro e utilização do sonicador sob várias condições de tempo. Os dois métodos mostraram sensível melhora nos resultados, porém, não solucionaram totalmente o problema. Contudo, deu-se preferência à utilização do sonicador pela maior

facilidade de aplicação, sendo que as amostras, antes de serem hibridizadas, foram sonicadas por 30s, com intervalos de 30s, por 3 vezes consecutivas.

Para as amostras dos regimes 3 e 4 foi possível utilizar novos reagentes para a fixação das células, no entanto, este procedimento não apresentou diferença significativa em relação à autofluorescência.

No que se refere à fraca marcação da sonda nas células individualizadas, foram testados tempos de hibridização mais longos (3, 12 e 18h) e 5 pontos percentuais a mais nos teores de formamida utilizados no tampão de hibridização. Contudo, não foi possível identificar melhorias no resultado final pela aplicação destas novas condições. Portanto, optou-se por permanecer com as condições sugeridas na literatura, conforme apresentadas na Tabela 4.2 da seção 4.7.3 para a formamida e 90 minutos para o tempo de hidridização.

Considerações sobre a intensidade do sinal das sondas, que a princípio é proporcional ao conteúdo de rRNA das células e, conseqüentemente, à sua atividade, necessitam ainda ser exploradas. Contudo, nitrificantes parecem manter o seu conteúdo de rRNA durante os períodos de baixa atividade, assim a intensidade do sinal não necessariamente reflete a atividade metabólica do momento da fixação destas células (MANSER *et al.*, 2005).

A Figura 5.45 apresenta um resultado típico do controle positivo e do controle negativo efetuados para todos os testes realizados. O controle positivo refere-se à utilização de uma cultura pura de *Escherichia coli* (*E. coli*), sendo que um dos poços efetua-se a hibridização com a sonda EUB338 e em outro sem a sonda para verificar a efetividade do teste. Para o controle negativo foi hibridizada com a sonda EUB338 (específica para bactérias) uma cultura pura de protozoários flagelados (*Trypanosoma cruzi* - *T. cruzi*), para garantir que a sonda estivesse se fixando apenas a bactérias.

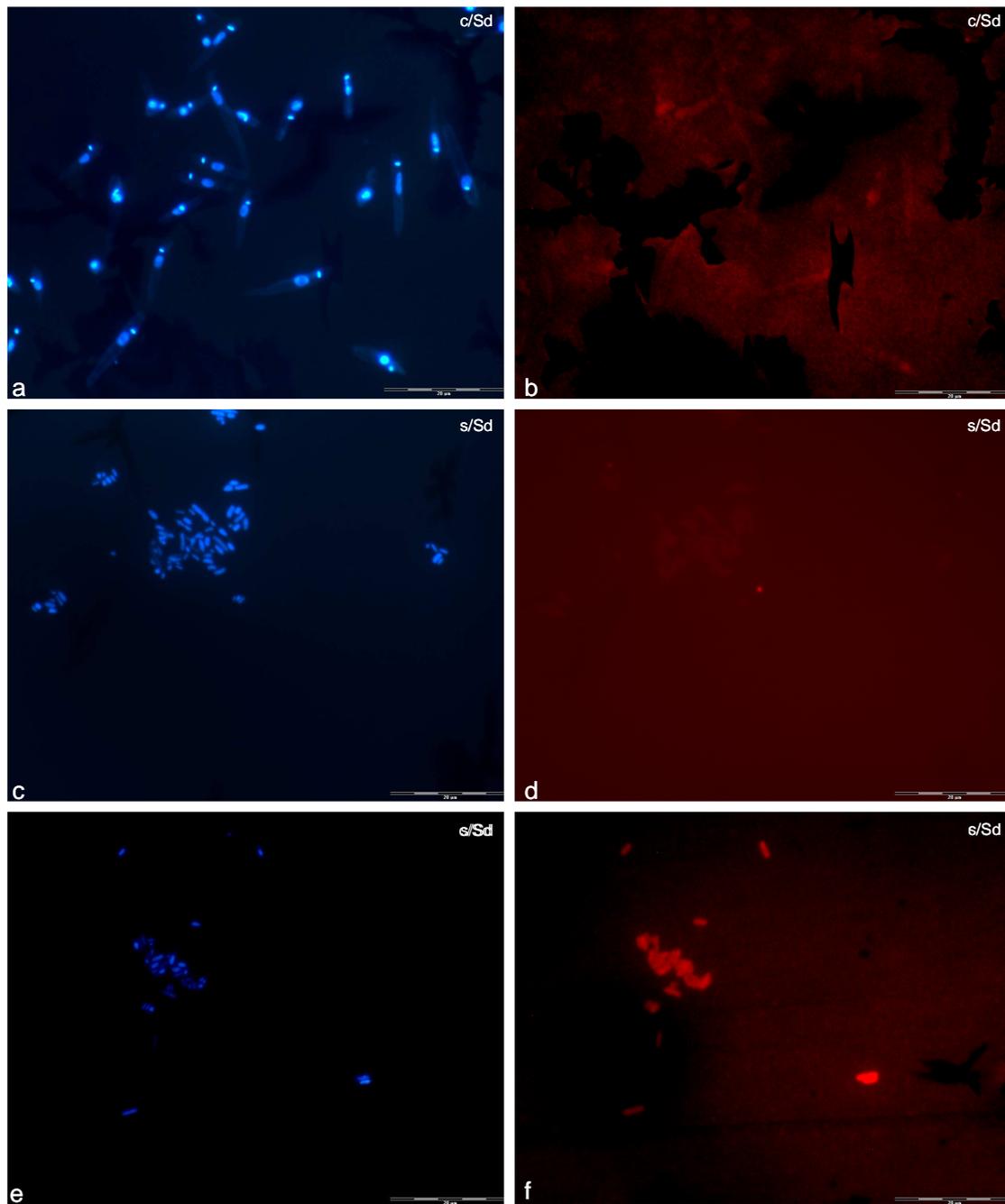


Figura 5.45 – Fotomicrografias típicas do controle negativo com *T. cruzi* (primeira linha) e com *E. coli* (segunda linha), e do controle positivo com *E. coli* (terceira linha) para os ensaios de FISH realizados. As imagens lado a lado estão focadas no mesmo campo de visualização do microscópio, porém, com filtros distintos para DAPI (a – c – e) e para EUB338 (b – d – f); barra igual a 20 µm.

Da Figura 5.45 depreende-se que as condições de hibridização utilizadas foram adequadas para promover a marcação eficiente das células *E. coli* e que o controle negativo atestou a aplicabilidade da sonda.

A Figura 5.46 apresenta as imagens obtidas para o controle da autofluorescência dos ensaios de FISH nos quatro regimes experimentais investigados. Neste caso as amostras hibridizadas sem sonda mostraram que mesmo com a presença de pontos de autofluorescência associada aos aglomerados microbianos, evidenciados nas Figuras 5.46d e 5.46f, foi possível visualizar o sinal de fluorescência das sondas quando ligadas às células de interesse.

Nas Figuras 5.47 e 5.48 estão apresentadas as imagens obtidas no microscópio de fluorescência após a aplicação da técnica de FISH para o biofilme desenvolvido nos regimes operacionais 1, 2, 3 e 4. A Figura 5.47 mostra imagens típicas obtidas pela visualização das amostras da biomassa hibridizadas com a sonda Nso1225 para a detecção das AOB. A Figura 5.48 apresenta as imagens típicas obtidas para a detecção das NOB com a sonda Nit3. Ambas as Figuras 5.47 e 5.48 apresentam na primeira coluna as amostras marcadas com DAPI, na segunda coluna as amostras marcadas com as sondas específicas (Nso1225 e Nit3) e, na terceira coluna, a mesma região de visualização das duas primeiras colunas em campo claro.

Observou-se pelos ensaios de FISH realizados e conforme pode ser visualizado nas Figuras 5.47 e 5.48 que o sinal da fluorescência em todos os casos foi muito fraco, dificultando a avaliação da dinâmica das bactérias nitrificantes com o acréscimo de sal ao meio. Em geral, quando ocorre a ausência de sinal sugere-se que as células fixadas poderiam estar mortas ou com baixa atividade metabólica. No caso de sinal fraco, pode-se atribuir o fato à deficiente permeabilização das sondas. Para melhorar a permeabilidade das células é possível utilizar agentes químicos e ou biológicos que favorecem este processo, porém, não é comum a utilização dos mesmos para células Gram-negativas, como é o caso das nitrificantes (ABREU, 2004). A diferença na tonalidade do fundo das imagens se deu por conta da busca pela melhor condição na visualização do sinal das sondas, com o intuito de diminuir o ruído de fundo e minimizar o efeito da autofluorescência.

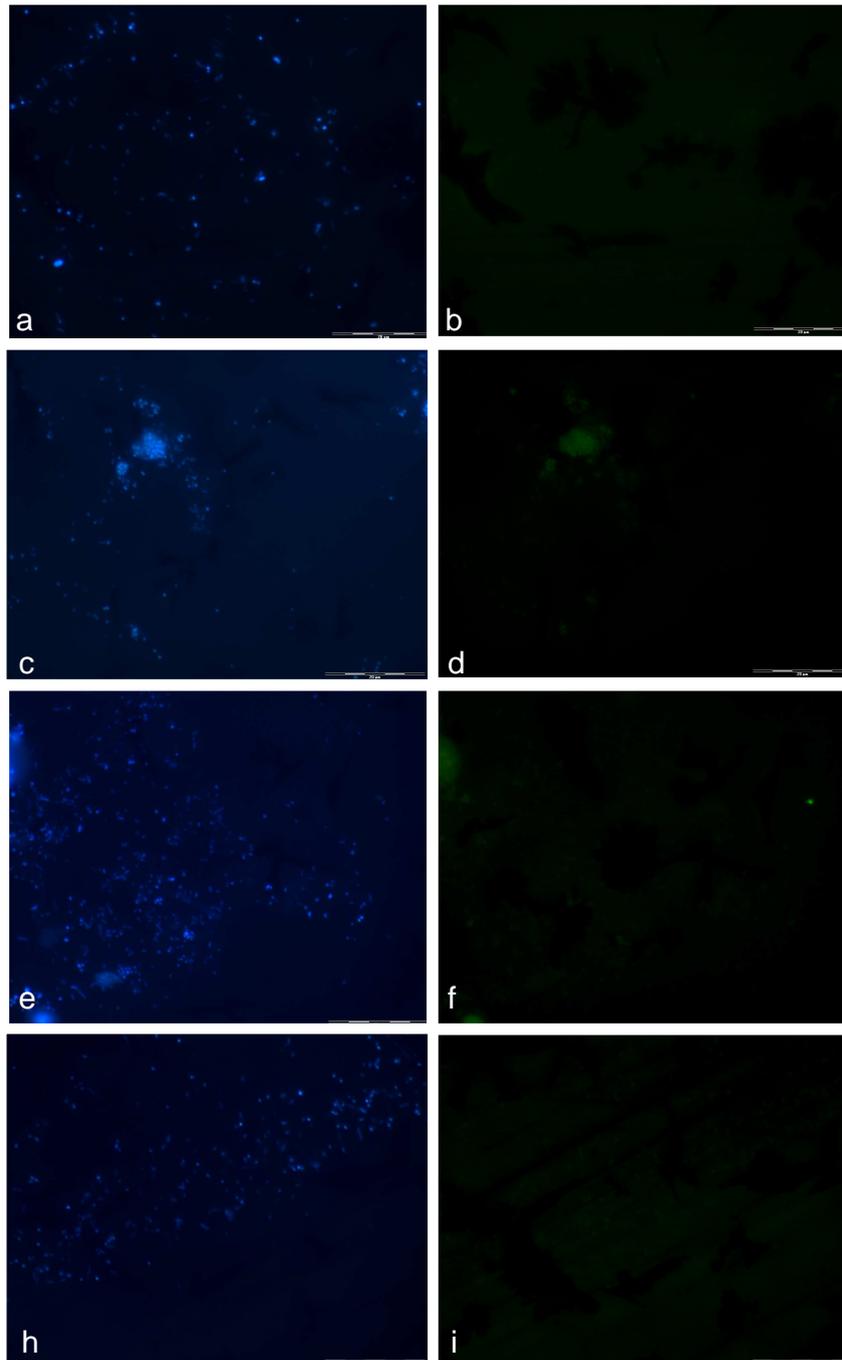


Figura 5.46 – Fotomicrografias do controle negativo dos ensaios típicos de FISH para os quatro regimes operacionais investigados. As imagens lado a lado estão focadas no mesmo campo de visualização do microscópio com filtros distintos para DAPI (a – c – e – h) e para as sondas específicas (b – d – f – i). As imagens referentes às linhas correspondem aos regimes 1, 2, 3 e 4, respectivamente da primeira para a última linha; barra igual a 20 µm.

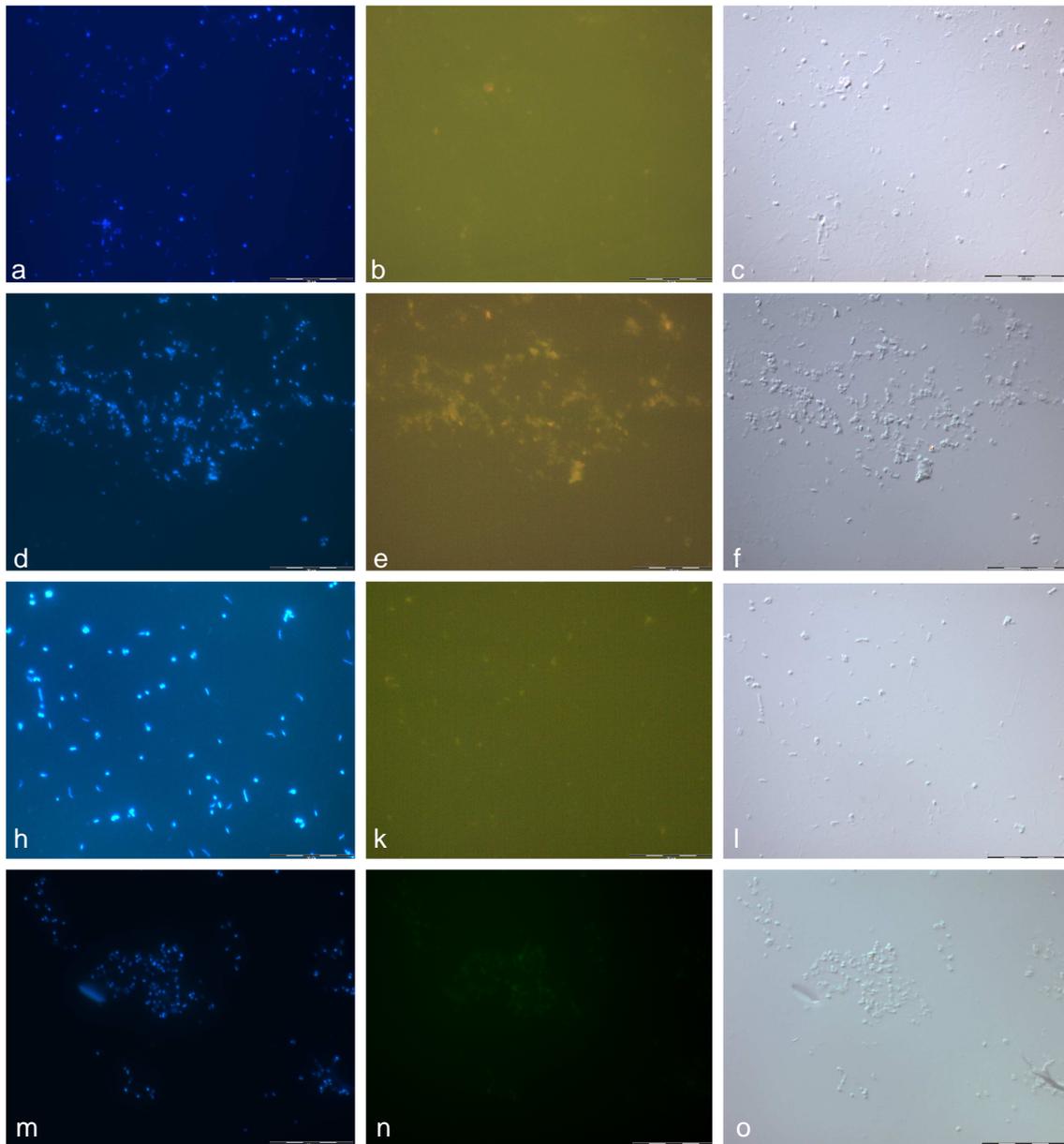


Figura 5.47 – Fotomicrografias dos ensaios típicos para a detecção das bactérias que oxidam amônia com a sonda Nso1225 para os quatro regimes operacionais investigados. As imagens lado a lado estão focadas no mesmo campo de visualização do microscópio, porém, com filtros distintos para DAPI (a – d – h – m), para a sonda Nos1225 (b – e – k – n) e em campo claro (c – f – l – o). As imagens referentes às linhas correspondem aos regimes 1, 2, 3 e 4, respectivamente da primeira para a última linha; barra igual a 20 µm.

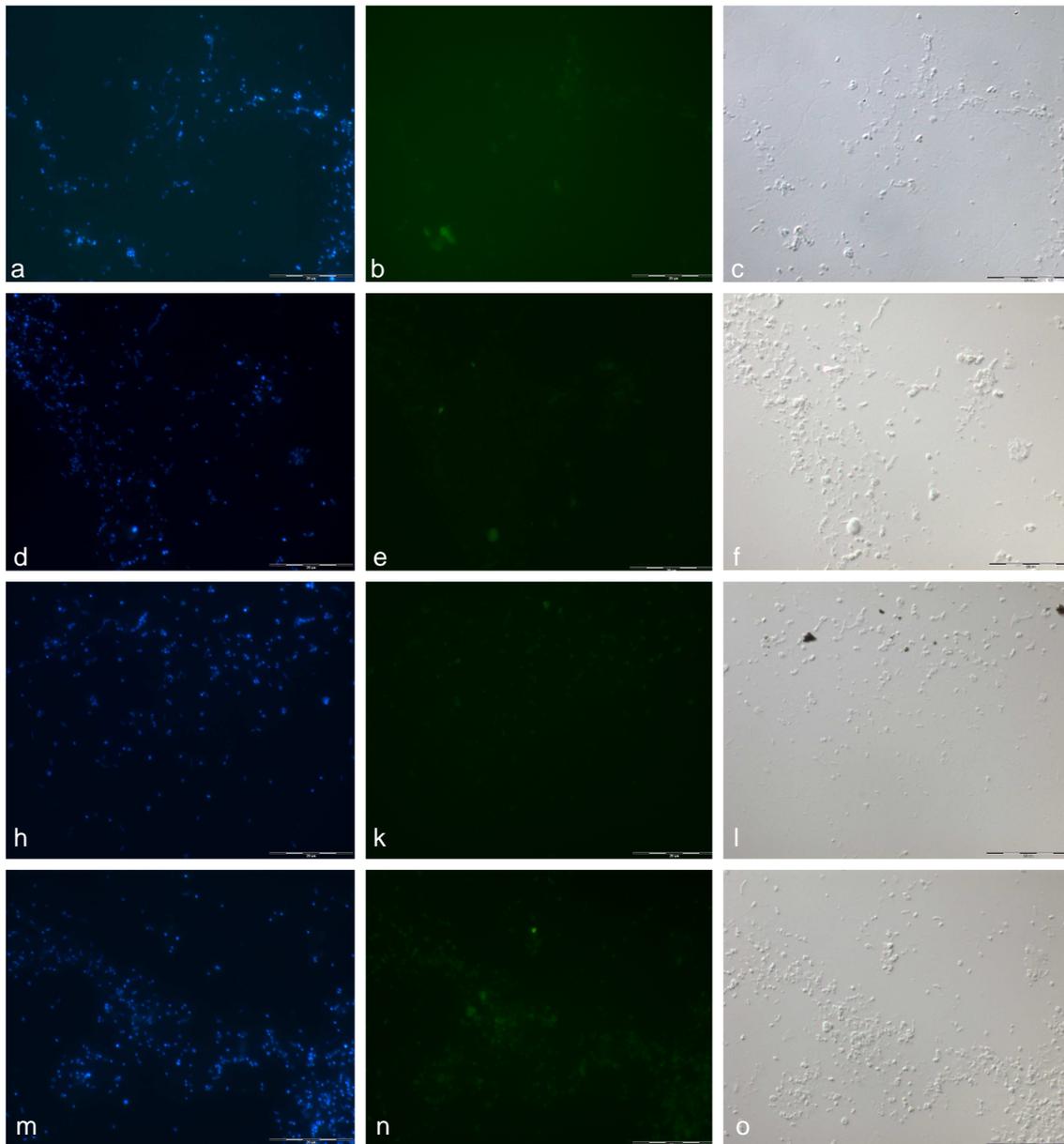


Figura 5.48 – Fotomicrografias dos ensaios típicos para a detecção das bactérias que oxidam nitrito com a sonda Nit3 para os quatro regimes operacionais investigados. As imagens lado a lado estão focadas no mesmo campo de visualização do microscópio, porém, com filtros distintos para DAPI (a – d – h – m), para a sonda Nos1225 (b – e – k – n) e em campo claro (c – f – l – o). As imagens referentes às linhas correspondem aos regimes 1, 2, 3 e 4, respectivamente da primeira para a última linha; barra igual a 20 µm.

A aplicação da técnica de FISH no presente trabalho não permitiu avaliar a densidade das bactérias nitrificantes assim como a sua dinâmica em relação ao incremento de sal por conta da dificuldade em visualizar os sinais emitidos pelas sondas hibridizadas. Contudo, foi possível constatar o crescimento da comunidade nitrificante no MBBR com representantes dos domínios *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*.

Melhorias no nível de detecção das sondas e diferenciação da autofluorescência poderiam ser alcançadas com a utilização do microscópio confocal de varredura a laser – CLSM (De Los REYS *et al.*, 1997), porém, este equipamento ainda tem disponibilidade restrita no Brasil. KIM *et al.* (2006) utilizaram sondas Nso1225 e Nsm156 para detectar as AOB e, Nit3 e Ntspa662 para as NOB em um biorreator tipo “airlift” com biofilme. Os autores observaram, utilizando FISH com CLSM, que as AOB se distribuíram na superfície da biomassa aderida até 100 µm de profundidade, sendo que 60% do total das AOB foram identificadas como *Nitrosomonas*. A hibridização para a identificação das NOB mostrou distribuição similar entre *Nitrobacter* (Nit3) e *Nitrospira* (Ntspa662).

A partir de dados recentes da literatura, WHANG *et al.* (2009) relataram que *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* são consideradas as bactérias mais importantes envolvidas no processo de nitrificação. Contudo, as possibilidades de identificação a nível molecular indicam que *Nitrospira* é tão presente quanto *Nitrosomonas* e que, freqüentemente, *Nitrospira* (bactérias que oxidam nitrito) são dominantes em sistemas de lodos ativados. Estes autores também consideraram que apesar de vários estudos destinados à investigação das comunidades de bactérias nitrificantes em processos de tratamento de efluentes, o entendimento da dinâmica entre a presença destes micro-organismos e o desempenho da nitrificação em instalações em escala real ainda é muito limitado.

6 Conclusões

Dos estudos desenvolvidos no presente trabalho, no qual se utilizou um biorreator com biomassa aderida (MBBR), operado de modo descontínuo (bateladas seqüenciais), para promover a nitrificação de um efluente industrial, foi possível obter as seguintes conclusões:

Verificou-se que o ajuste do pH do meio reacional foi primordial para garantir as condições de implantação e manutenção da atividade das bactérias que oxidam amônia (AOB) e, possivelmente, das que oxidam nitrito (NOB). Constatou-se que para valores de pH abaixo de 7,0 e acima de 8,0 a atividade das AOB foi negativamente afetada, sendo que em alguns casos houve inibição total da nitrificação. Valores de pH entre 7,0 e 7,5 foram considerados ideais para promover eficiente conversão do nitrogênio amoniacal.

Em relação ao nível de oxigênio dissolvido (OD) no meio reacional, não foi observada, durante a operação do MBBR, a inibição do processo por insuficiência deste acceptor de elétrons. Os menores valores de OD observados durante o período de trabalho estiveram sempre acima de 2,0 mg L⁻¹, com exceção do período final do regime 2, quando os valores de OD variaram entre 0,5 e 1,5 mg L⁻¹ nas primeiras 5 h de aeração de cada ciclo. Porém, mesmo nessas condições, foi constatada intensa atividade das bactérias nitrificantes.

A matéria orgânica remanescente no efluente industrial, que alimentou o MBBR, mostrou considerável interferência na atividade das bactérias nitrificantes. No período inicial de operação do MBBR, com maior teor afluente de matéria orgânica (DQO solúvel inicial de 111 a 365 mg L⁻¹), a conversão da amônia variou em uma ampla faixa (entre 42 e 98%), desconsiderados os eventos operacionais atípicos e o período relativo à tentativa de implantar a desnitrificação no reator. O efeito negativo do teor de matéria orgânica alimentada ao MBBR, principalmente sobre a atividade das AOB, tornou-se mais evidente a partir dos resultados obtidos nos ensaios cinéticos, visto que a oxidação da amônia alcançou eficiências de 97, 91 e 77% quando a DQO dissolvida inicial foi de 103, 142 e 180 mg L⁻¹, respectivamente. Estes resultados confirmaram que, mesmo para uma faixa

restrita de variação da DQO e para valores relativamente baixos, a matéria orgânica teve pronunciado efeito prejudicial sobre o desempenho da nitrificação.

O incremento dos íons cloreto no meio reacional pela adição de NaCl não teve influência significativa sobre a nitrificação até teores de $6 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$. Para a condição de $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$ (regime 4), o efeito da salinidade sobre a comunidade microbiana nitrificante foi mais pronunciado e acarretou em queda da conversão da amônia de cerca de 30 pontos percentuais em relação aos valores médios dos regimes 2 e 3. A alteração do tempo de aeração no MBBR (regime 4), de 12 para 24 h, não foi suficiente para compensar a perda de atividade, em especial das AOB, visto que praticamente todo o nitrito gerado foi oxidado a nitrato.

Os testes cinéticos realizados nos 4 regimes operacionais investigados, que permitiram obter os perfis de variação das concentrações das substâncias de interesse, corroboraram as observações feitas durante o acompanhamento operacional diário, além de possibilitar a determinação do perfil de variação do nitrito. O acúmulo de nitrito no meio reacional mostrou-se um pouco mais pronunciado no regime 2 quando comparado com os demais. Nos regimes 1, 3 e 4 o valor máximo de N-NO_2^- observado foi menor do que 5 mg L^{-1} , enquanto no regime 2 essa espécie alcançou o patamar de aproximadamente 15 mg L^{-1} .

O modelo cinético proposto para representar os perfis de variação dos substratos e produtos permitiu ajuste satisfatório dos dados experimentais. O teor de nitrito foi o parâmetro que apresentou maior discrepância em relação às previsões do modelo, provavelmente, em função dos baixos valores observados no meio reacional. Não foi possível verificar claramente o efeito da crescente salinidade na cinética de oxidação da amônia, porém, foi notório que o ajuste dos dados do regime 4, de maior salinidade ($12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$), foi alcançado com os menores valores das constantes do modelo.

Em relação ao biofilme (biomassa aderida) foi possível constatar a elevada influência da matéria orgânica no acúmulo do mesmo. Nos períodos em que a DQO inicial foi maior houve intenso crescimento da biomassa por favorecimento das bactérias heterotróficas. O balanço de nitrogênio, nos regimes 1 e 2, também apresentou as maiores diferenças para o seu fechamento, provavelmente por conta do maior consumo

assimilatório do nitrogênio. Nos regimes 1 e 2 a concentração de biomassa aderida no interior do biorreator (em torno de 2500 mg L^{-1}) foi pelo menos 2 vezes maior do que nos regimes 3 e 4, nos quais se considerou que o biofilme seria prioritariamente autotrófico por conta da menor influência da DQO e após o episódio de desprendimento natural da biomassa aderida.

Durante todo o período experimental o biofilme se desenvolveu mais intensamente na superfície interna das biomédias. Portanto, infere-se que o desprendimento natural da biomassa aderida, ao final do regime 2, ocorreu, muito provavelmente, por conta da idade do biofilme, visto que o mesmo não estava exposto ao constante cisalhamento das biomédias no interior do MBBR.

O acompanhamento dos polissacarídeos e proteínas ligados e totais associados ao biofilme, durante os 4 regimes operacionais, não permitiu observar tendências claras do efeito do incremento da salinidade no MBBR. A alteração mais detectável referiu-se às razões entre proteínas e polissacarídeos ligados ($\text{PTN}_{\text{ligadas}}/\text{PLS}_{\text{ligados}}$) e esta última variável e proteínas totais ($\text{PLS}_{\text{ligados}}/\text{PTN}_{\text{totais}}$), que apresentaram tendências de queda e de aumento, respectivamente, com o aumento da salinidade. Destes resultados depreende-se que a salinidade promoveu o aumento na produção dos $\text{PLS}_{\text{ligados}}$ em relação ao conteúdo de $\text{PTN}_{\text{totais}}$ e $\text{PTN}_{\text{ligadas}}$. Este comportamento era esperado, pois, em geral, o aumento de exopolímeros produzidos por bactérias corresponde a um mecanismo de defesa em relação às condições adversas do meio em que estão submetidas, no caso do presente trabalho, ao estresse salino.

As observações do biofilme por microscopia óptica revelaram gradual diminuição da abundância e diversidade dos protozoários e metazoários com o aumento do teor de sal no MBBR. Este comportamento também coincidiu com o decréscimo na variabilidade e nos aportes de DQO ao biorreator. No regime 4, com o maior teor de sal ($1,2\%, \text{ m v}^{-1}$), foram observadas pequenas partículas brilhantes associadas à biomassa, provavelmente decorrentes do acúmulo de cristais de sal no biofilme.

Não se teve o êxito esperado com a técnica de FISH para identificar as bactérias nitrificantes e, possivelmente, avaliar a sua dinâmica em relação ao incremento de sal ao meio reacional. Contudo, apesar das dificuldades encontradas foi possível constatar, com

a aplicação da técnica, a presença das bactérias nitrificantes do gênero *Nitrosomonas* (representante das AOB) e do gênero *Nitrobacter* (representantes das NOB) no biofilme desenvolvido no MBBR.

A desnitrificação do efluente tratado (regime 4) no MBBR foi conduzida em outra unidade experimental. Os resultados indicaram remoção de 88% de nitrogênio a partir do nitrato em 3 horas de reação. Este tempo equivale a aproximadamente 40% do tempo necessário para obter altas eficiências de nitrificação (8 horas de aeração). Este desempenho foi alcançado sob a condição salina de $12 \text{ g Cl}^- \text{ L}^{-1}$, o que permite inferir que esta concentração de íons cloreto não promoveu inibição da comunidade microbiana desnitrificante. A quantidade de carbono (etanol) necessária para promover eficiente redução do nitrato no meio reacional correspondeu à razão COD/N-NO₃⁻ igual a 1.

A automação da unidade experimental em questão foi de grande relevância por permitir desenvolver os experimentos em modo de operação descontínuo por um longo período de tempo, de maneira controlada e relativamente estável. Problemas operacionais ocorridos durante os experimentos foram relativos somente ao entupimento das válvulas solenóides, que possivelmente teriam sido evitados se houvesse manutenção preventiva das mesmas por períodos pré-determinados. A escolha da operação do MBBR em modo de bateladas sequenciais foi adequada por proporcionar maior flexibilidade na alteração dos parâmetros operacionais, principalmente no que se refere ao tempo de reação. Ademais, possibilitou a realização dos ensaios cinéticos no próprio biorreator sem qualquer alteração das condições experimentais aplicadas.

A despeito da complexidade do processo de nitrificação, pode-se afirmar que foi alcançada com êxito a nitrificação do efluente industrial, que possuía uma matriz extremamente complexa e variável, no MBBR proposto.

7 Referências Bibliográficas

- ABELING, U. e SEYFRIED, C. F., 1992, "Anaerobic-Aerobic Treatment of High-strength Ammonium Wastewater – nitrogen removal via nitrite", *Water Science Research*, v. 26, n. 5 – 6, pp. 1007 – 1015.
- ABREU, A. A. V., 2004, *Identificação de Bactérias Filamentosas em Processos de Lamas Activadas através da Técnica de Hibridização in situ de Fluorescência (FISH)*. Dissertação de M.Sc., EQ/DEB/Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- ÆSØY, A., ØDEGAARD, H., BACH, K., *et al.*, 1998, "Denitrification in a Packed Bed Biofilm Reactor (Biofor): experiments with different carbon sources", *Water Research*, v. 32, n. 5, pp. 1463 – 1470.
- AHMED, Z., LIM, B-R., CHO, J., *et al.*, 2008, "Biological Nitrogen and Phosphorus Removal and Changes in Microbial Community Structure in a Membrane Bioreactor: effect of different carbon sources", *Water Research*, v. 42, pp. 198 – 210.
- AHN, Y. H., 2006, "Sustainable Nitrogen Elimination Biotechnologies: A Review", *Process Biochemistry*, v. 41, pp. 1709 – 1721.
- AHN, Y. T., KANG, S. T., CHAE, S. R., *et al.*, 2007, "Simultaneous High-Strength Organic and Nitrogen Removal with Combined Anaerobic Upflow Bed Filter and Aerobic Membrane Bioreactor", *Desalination*, v. 202, pp. 114 – 121.
- AKIN, B. S. e UGURLU, A., 2004, "The Effect of an Anoxic Zone on Biological Phosphorus Removal by a Sequential Batch Reactor", *Bioresource Technology*, v. 94, pp. 1 – 7.
- AKIN, B. S. e UGURLU, A., 2005, "Monitoring and Control of Biological Nutrient Removal in a Sequencing Batch Reactor", *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 2873 – 2878.

- AMANN, R. I., KRUMHOLZ, L. e STAHL, D. A., 1990, "Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology", *Journal of Bacteriology*, v. 172, n. 2, pp. 762 – 770.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W. e SCHLEIFER, K. H., 1995, "Phylogenetic Identification and *in situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation", *Microbiological Reviews*, v. 59, pp. 143 – 169.
- AMANN, R e LUDWIG, W., 2000, "Ribosomal RNA-targeted Nucleic Acid Probes for Studies in Microbial Ecology", *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, pp. 555 – 565.
- ANDREOTTOLA, G., FOLADORI, P. e RAGAZZI, M., 2001, "On-line Control of a SBR System for Nitrogen Removal from Industrial Wastewater", *Water Science and Technology*, v. 43, n. 3, pp. 93 – 100.
- ANTHONISEN, A. C., LOEHR, R. C., PRAKASAM, T. B. S., *et al.*, 1976, "Inhibition of Nitrification of Ammonia and Nitrous Acid", *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 48, n. 5, pp. 835 – 852.
- AOI, Y., MIYOSHI, T., OKAMOTO, T., *et al.*, 2000, "Microbial Ecology of Nitrifying Bacteria in Wastewater Treatment Process Examined by Fluorescence *in situ* Hybridization", *Journal of Bioscience And Bioengineering*, v. 90, n. 3, pp. 234 – 240.
- APHA, AWWA, WPCF, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.
- APHA, AWWA, WPCF, 2005, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.
- ARTIGA, P., OYANEDEL, V., GARRLDO, J. M., *et al.*, 2005, "An Innovative Biofilm-Suspended Biomass Hybrid Membrane Bioreactor for Wastewater Treatment", *Desalination*, v. 179, pp. 171 – 179.

- ARTIGA, P., GARCÍA-TORIELLO, G., MÉNDEZ, R., *et al.*, 2008, "Use of a Hybrid Membrane Bioreactor for the Treatment of Saline Wastewater from a Fish Canning Factory", *Desalination*, v. 221, pp. 518 – 525.
- ASLAN, S. e DAHAB, M., 2008, "Nitritation and Denitritation of Ammonium-Rich Wastewater using Fluidized-Bed Biofilm Reactors", *Journal of Hazardous Materials*, v. 156, pp. 56 – 63.
- BABARY, J. P. e BOURREL, S., 1999, "Sliding Mode Control of a Denitrifying Biofilter", *Applied Mathematical Modelling*, v. 23, pp. 609 – 620.
- BAO, R., YU, S., SHI, W., *et al.*, 2009, "Aerobic Granules Formation and Nutrients Removal Characteristics in Sequencing Batch Airlift Reactor (SBAR) at Low Temperature", *Journal of Hazardous Materials*, v. 168, pp. 1334 – 1340.
- BAIRD, C., 2006, *Química Ambiental*. 2ª ed. São Paulo, Bookman.
- BASSIN, J. P., 2008, *Nitrificação de Efluentes Salinos em Reatores de Leito Móvel com Biofilme e Biorreatores Agitados*. Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BELMONTE, M., VAZQUEZ-PADIN, J. R., FIGUEROA, M., *et al.*, 2009, "Characteristics of Nitrifying Granules Developed in an Air Pulsing SBR", *Process Biochemistry*, v. 44, pp. 602 – 606.
- BERNET, N., DELGENE, S., AKUNNA., O., *et al.*, 2000, "Combined Anaerobic-Aerobic SBR for the Treatment of Piggery Wastewater", *Water Research*, v. 34, n. 2, pp. 611 – 619.
- BERNET, N., SANCHEZ, O., CESBRON, D., *et al.*, 2005, "Modeling Control of Nitrite Accumulation in a Nitrifying Biofilm Reactor", *Biochemical Engineering Journal*, v. 24, pp. 173 – 183.

- BOOPATHY, R., BONVILLAIN, C., FONTENOT, Q., *et al.*, 2007, “Biological Treatment of Low-Salinity Shrimp Aquaculture Wastewater Using Sequencing Batch Reactor”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 59, pp. 16 – 19.
- BORREGAARD, V. R., 1997, “Experience with Nutrient Removal in a Fixed-Film System at Full-Scale Wastewater Treatment Plants”, *Water Science and Technology*, v. 36, n. 1, pp. 129 – 137.
- BRAGA, B., HESPANHOL, I., CONEJO, J. G. L., *et al.*, 2005, *Introdução à Engenharia Ambiental*. 2ª ed. São Paulo, Pearson.
- BRANDT, K. K., SØE, M. H., ROSLEV, P., *et al.*, 2001, “Toxic Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate on Metabolic Activity, Growth Rate, and Microcolony Formation of *Nitrosomonas* and *Nitrosospira* Strains”, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, pp. 2489 – 2498.
- BROCK, T. D., MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., *et al.*, 1997, *Biology of Microorganisms*. 8ª ed. New Jersey, Prentice Hall.
- CALLI, B., MERTOGLU, B., INANC, B., *et al.*, 2005, “Effects of High Free Ammonia Concentrations on the Performances of Anaerobic Bioreactors”, *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 1285 – 1292.
- CAMMAROTA, M. C., 1998, *Produção de Exopolímeros e Adesão Microbiana*. Tese de D.Sc., IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- CAMPOS, J. L., GARRIDO-FERNANDEZ, J. M., MENDEZ, R.; *et al.*, 1999, “Nitrification at High Ammonia Loading Rates in an Activated Sludge Unit”, *Bioresource Technology*, v. 68, pp.141 – 148.
- CAMPOS, J. C., BORGES, R. M. H., OLIVEIRA FILHO, A. M., *et al.*, 2002a, “Oilfield Wastewater Treatment by Combined Microfiltration and Biological Processes”, *Water Research*, v. 36, pp. 95 – 104.

- CAMPOS, J. L., MOSQUERA-CORRAL, A., SÁNCHEZ, M., *et al.*, 2002b, "Nitrification in Saline Wastewater with High Ammonia Concentration in an Activated Sludge Unit", *Water Research*, v. 36, pp. 2555 – 2560.
- CAMPOS, J. L., SÁNCHEZ, M., MOSQUERA-CORRAL, A., *et al.*, 2003, "Coupled BAS and Anoxic USB System to Remove Urea and Formaldehyde from Wastewater", *Water Research*, v. 37, pp. 3445 – 3451.
- CANTO, C. S. A., RODRIGUES, J. A. D., RATUSZNEI, S. M., *et al.*, 2007, "Feasibility of Nitrification/Denitrification in a Sequencing Batch Biofilm Reactor with Liquid Circulation Applied to Post-Treatment", *Bioresource Technology*, v. 99, n. 3, pp. 644 – 654.
- CARLIELL, C. M., BARCLAY, S. J., SHAW, C., *et al.*, 1998, "The Effect of Salts Used in Textile Dyeing on Microbial Decolourisation of a Reactive Azo Dye", *Environmental Technology*, v. 19, pp. 1133 – 1137.
- CARRERA, J., JUBANY, I., CARVALLO, L., *et al.*, 2004, "Kinetic Models for Nitrification Inhibition by Ammonium and Nitrite in a Suspend and Immobilised Biomass System", *Process Biochemistry*, v. 39, n. 9, pp. 1159 – 1165.
- CARVALHO, G., MEYER, R. L., YUAN, Z., *et al.*, 2006, "Differential Distribution of Ammonia and Nitrite-Oxidising Bacteria in Flocs and Granules from a Nitrifying/Denitrifying Sequencing Batch Reactor", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, pp. 1392 – 1398.
- CASSIDY, D. P. e BELIA, E., 2005, "Nitrogen and Phosphorus Removal from an Abattoir Wastewater in a SBR with Aerobic Granular Sludge", *Water Research*, v. 39, pp. 4817 – 4823.
- CERVANTES, F. J., De La ROSA, D. A. e GOMEZ, J., 2001, "Nitrogen Removal from Wastewaters at Low C/N Ratios with Ammonium and Acetate as Electron Donors", *Bioresource Technology*, v. 79, pp. 165 – 170.

- CHAE, K-J., RAMESHWAR, T., JANG, A., *et al.*, 2008, "Analysis of the Nitrifying Bacterial Community in Biocube Sponge Media using Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) and Microelectrodes", *Journal of Environmental Management*, v. 88, pp. 1426 – 1435.
- CHEN, G., WONG, M., OKABE, S. *et al.*, 2003, "Dynamic Response of Nitrifying Activated Sludge Batch Culture to Increased Chloride Concentration", *Water Research*, v. 37, pp. 3125 – 3135.
- CHEN, Y., YIN, J. e WANG, K., 2005, "Long-Term Operation of Biofilters for Biological Removal of Ammonia", *Chemosphere*, v. 58, pp. 1023 – 1030.
- CHEN, S., LING, J. e BLANCHETON, J-P., 2006, "Nitrification Kinetics of Biofilm as Affected by Water Quality Factors", *Aquacultural Engineering*, v. 34, pp. 179 – 197.
- CHIU, Y. e CHUNG, M., 2003, "Determination of Optimal COD/Nitrate Ratio for Biological Denitrification", *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 51, pp. 43 – 49.
- CHOI, Y. C. e MORGENROTH, E., 2003, "Monitoring Biofilm Detachment under Dynamic Changes in Shear Stress Using Laser-Based Particle Size Analysis and Mass Fractionation", *Water Science and Technology*, v. 47, n. 5, pp. 69 – 76.
- CLIPPELEIR, H., VLAEMINCK, S. E., CARBALLA, M., *et al.*, 2009, "A Low Volumetric Exchange Ratio Allows High Autotrophic Nitrogen Removal in a Sequencing Batch Reactor", *Bioresource Technology*, v. 100, n. 21, pp. 5010 – 5015.
- COELHO, M. A. Z., 1998, *Modelagem e Otimização do Processo de Nitrificação de Efluentes em Reator Batelada Seqüencial*. Tese de D.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- COMTE, S., GUIBAUD, G. e BAUDU, M., 2006, "Relations between Extraction Protocols for Activated Sludge Extracellular Polymeric Substances (EPS) and EPS Complexation Properties Part I. Comparison of the Efficiency of Eight EPS Extraction Methods", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, pp. 237 – 245.

- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., *et al.*, 1995, "Microbial Biofilms", *Annual Review of Microbiology*, v. 49, pp. 711 – 745.
- DAPENA-MORA, A., CAMPOS, J.L., MOSQUERA-CORRAL, A., *et al.*, 2004, "Stability of the ANAMMOX Process in a Gas-Lift Reactor and a SBR", *Journal of Biotechnology*, v. 110, pp. 159 – 170.
- DATE, Y., ISAKA, K., IKUTA, H., *et al.*, 2009, "Microbial Diversity of ANAMMOX Bacteria Enriched from Different Types of Seed Sludge in an Anaerobic Continuous-Feeding Cultivation Reactor", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, n. 3, pp. 281 – 286.
- DELATOLLA, R., TUFENKJI, N., COMEAU, Y., *et al.*, 2009, "In situ Characterization of Nitrifying Biofilm: minimizing biomass loss and preserving perspective", *Water Research*, v. 43, pp. 1775 – 1787.
- DE LOS REYES, F. L., RITTER, W. e RASKIN, L., 1997, "Group-Specific Small-Subunit rRNA Hybridization Probes to Characterize Filamentous Foaming in Activated Sludge-Systems", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, pp. 1107 – 1117.
- DEORSOLA, A. B., 2006, *Influência dos Cátions (Sódio, Potássio, Cálcio e Magnésio) no Tratamento Biológico de Efluentes*. Tese de D.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- DONG, Z. e SUN, T., 2007, "A Potential New Process for Improving Nitrogen Removal in Constructed Wetlands—Promoting Coexistence of Partial-Nitrification and ANAMMOX", *Ecological Engineering*, v. 31, pp. 69 – 78.
- DOSTA, J., GALI, A., EI-HADJ, T. B., *et al.*, 2007, "Operation and Model Description of a Sequencing Batch Reactor Treating Reject Water for Biological Nitrogen Removal via Nitrite", *Bioresource Technology*, v. 98, pp. 2065 – 2075.

- DOWNING, L. S. e NERENBERG, R., 2008, "Total Nitrogen Removal in a Hybrid, Membrane-Aerated Activated Sludge Process", *Water Research*, v. 42, n. 14, pp. 3697 – 3708.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., *et al.*, 1956, "Colorimetric Method for Determination of sugars and related substances", *Analytical Chemistry*, v. 28, pp. 350 – 355.
- DUPLA, M., COMEAU, Y., PARENT, S., *et al.*, 2006, "Design Optimization of a Self-Cleaning Moving-Bed Bioreactor for Seawater Denitrification", *Water Research*, v. 40, pp. 249 – 258.
- DYTCHAK, M. A., LONDRY, K. L. e OLESZKIEWICZ, J. A., 2008, "Activated Sludge Operational Regime has Significant Impact on the Type of Nitrifying Community and its Nitrification Rates", *Water Research*, v. 42, pp. 2320 – 2328.
- ELEENTER, D., MILFERSTEDT, K., ZHANG, W., *et al.*, 2007, "Influence of Detachment on Substrate Removal and Microbial Ecology in a Heterotrophic/Autotrophic Biofilm", *Water Research*, v. 41, pp. 4657 – 4671.
- EPA, 1993, *Nitrogen Control – EPA/625/R-93/010* - Office of Enforcement and Compliance Assurance U.S. Environmental Protection Agency, Washington.
- ETCHEBEHERE, C., 2007, "Microbiología, Ecología y Bioquímica". In: Schmidell, W., Soares, H.M., Etchebehere, C., Menes, R.J., Bertola, N.C., Contreras, E.M. (eds), *Tratamento Biológico de Águas Residuárias*, 1ª ed., capítulo VI.1, Florianópolis, SC, Brasil, Editora Tribo da Ilha.
- ETCHEBEHERE, C. e MENES, R. J., 2007, "Principios Básicos de Biología Molecular". In: Schmidell, W., Soares, H.M., Etchebehere, C., Menes, R.J., Bertola, N.C., Contreras, E.M. (eds), *Tratamento Biológico de Águas Residuárias*, 1ª ed., capítulo II.3, Florianópolis, SC, Brasil, Editora Tribo da Ilha.

- FEEMA, 1986, *Crêterios e Padrões para Lançamento de Efluentes Líquidos*, Norma Técnica NT – 202. R-10, Funda o Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro, Brasil.
- FERRAI, M., GUGLIELMI, G. e ANDREOTTOLA, G., 2009, “Modelling Respirometric Tests for the Assessment of Kinetic and Stoichiometric Parameters on MBBR Biofilm for Municipal Wastewater Treatment”, *Environmental Modelling and Software*, doi:10.1016/j.envsoft.2009.05.005.
- FICA-PIRAS, P. R., 2000, *Estudo sobre Nitrifica o de Efluentes de Refinaria em Biorreatores Trifásicos*. Tese de D.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FREIRE, D. D. C. e SANT’ANNA Jr., G. L., 1998, “A Proposed Method Modification for the Determination of COD in Saline Waters”, *Environmental Technology*, v. 19, pp. 1243 – 1247.
- FREIRE, D. D. C., CAMMAROTA, M. C. e SANT’ANNA Jr., G. L., 2001, “Biological Treatment of Oil Field Wastewater in a Sequencing Batch Reactor”, *Environmental Technology*, v. 22, pp. 1125 – 1135.
- GAO, D., PENG, Y., LI, B., *et al.*, 2009, “Shortcut Nitrification–Denitrification by Real-Time Control Strategies”, *Bioresource Technology*, v. 100, pp. 2298 – 2300.
- GARRIDO, J. M., Van BENTHUM, W. A. J., Van LOOSDRECHT, M. C. M., *et al.*, 1997, “Influence of Dissolved Oxygen Concentration on Nitrite Accumulation in a Biofilm Airlift Suspension Reactor”, *Biotechnology Bioengineering*, v. 53, pp. 168 – 178.
- GERARDI, M.H., 2002, *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*. 3th ed. New York, John Wiley and Sons.
- GIESEKE, A., ARNZ, P., AMANN, R., *et al.*, 2002, “Simultaneous P and N Removal in a Sequencing Batch Biofilm Reactor: insights from reactor and microscale investigations”, *Water Research*, v. 36, pp. 501 – 509.

- GIESEKE, A., TARRE, S., GREEN, M., *et al.*, 2006, "Nitrification in a Biofilm at Low pH Values: role of *in situ* microenvironments and acid tolerance", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 6, pp. 4283 – 4292.
- GLASS, C. e SILVERSTEIN, J., 1999, "Denitrification of High-Nitrate, High-Salinity Wastewater", *Water Research*, v. 33, n. 1, pp. 223 – 229.
- GOMEZ, M. A, GONZALEZ-LOPEZ, J. e HONTORIA-GARCIA, E., 2000, "Influence of Carbon Source on Nitrate Removal of Contaminated Groundwater in a Denitrifying Submerged Filter", *Journal of Hazardous Materials*, v. B80, pp. 69 – 80.
- GONG, Z., LIU, S., YANG, F., *et al.*, 2008, "Characterization of Functional Microbial Community in a Membrane-Aerated Biofilm Reactor Operated for Completely Autotrophic Nitrogen Removal", *Bioresource Technology*, v. 99, pp. 2749 – 2756.
- GRAHAM, D. W., KNAPP, C. W., Van VLECK, E. S., *et al.*, 2007, "Experimental Demonstration of Chaotic Instability in Biological Nitrification", *International Society for Microbial Ecology*, v. 1, pp. 385 – 393.
- GRUNDITZ, C., GUMAELIUS, L. e DALHAMMAR, G., 1998, "Comparison of Inhibition Assays Using Nitrogen Removing Bacteria: application to industrial wastewater", *Water Research*, v. 32, pp. 2995 – 3000.
- GUO, H., ZHOU, J., SU, J., *et al.*, 2005, "Integration of Nitrification and Denitrification in Airlift Bioreactor", *Biochemical Engineering Journal*, v. 23, pp. 57 – 62.
- GUO, J., PENG, Y., WANG, S., *et al.*, 2009, "Long-term Effect of Dissolved Oxygen on Partial Nitrification Performance and Microbial Community Structure", *Bioresource Technology*, v. 100, pp. 2796 – 2802.
- GUISASOLA, A., PETZET, S., BAEZA, J. A., *et al.*, 2007, "Inorganic Carbon Limitations on Nitrification: Experimental Assessment and Modelling", *Water Research*, v. 41, pp. 277 – 286.

- HAGOPIAN, D. S. e RILEY, J. G., 1998, "A Closer Look at the Bacteriology of Nitrification", *Aquacultural Engineering*, v. 18, pp. 223 – 244.
- HALLIN, S. e PELL M., 1998, "Metabolic Properties of Denitrifying Bacteria Adapting to Methanol and Ethanol in Activated Sludge", *Water Research*, v. 32, pp. 13 – 18.
- HAMODA, M. F. e AL-ATTAR, I. M. S., 1995, "Effects of High Sodium Chloride Concentrations on Activated Sludge Treatment", *Water Science and Technology*, v. 31, n. 9, pp. 61 – 72.
- HEAD, M. A. e OLESZKIEWICZ, J. A., 2004, "Bioaugmentation for Nitrification at Cold Temperatures", *Water Research*, v. 38, pp. 523 – 530.
- HELLINGA, C., SCHELLEA, A. A. J. C., MULDER, J. W., *et al.*, 1998, "The SHARON Process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater", *Water Science Technology*, v. 9, pp. 135 – 142.
- HELMER, C. e KUNST, S., 1998, "Simultaneous Nitrification/Denitrification in an Aerobic Biofilm System", *Water Science and Technology*, v. 30, pp. 183 – 187.
- HENZE, M., HARREMÖES, P., ARVIN, E., *et al.*, 2002, *Wastewater Treatment - Biological and Chemical Process*. 3^a ed. Berlin, Springer.
- HOLMAN, J. B. e WAREHAM, D.G., 2005, "COD, Ammonia and Dissolved Oxygen Time Profiles in the Simultaneous Nitrification/Denitrification Process", *Biochemical Engineering Journal*, v. 22, pp. 125 – 133.
- HORN, H., REIFF, H. e MORGENROTH, E., 2003, "Simulation of Growth and Detachment in Biofilm Systems under Defined Hydrodynamic Conditions", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 5, pp. 607 – 617.
- HU, Z., CHANDRAN, K., GRASSO, D., *et al.*, 2002, "Effect of Nickel and Cadmium Speciation on Nitrification Inhibition", *Environmental Science and Technology*, v. 36, pp. 3074 – 3078.

- HU, Z., CHANDRAN, K., GRASSO, D., *et al.*, 2004, "Comparison of Nitrification Inhibition by Metals in Batch and Continuous Flow Reactors", *Water Research*, v. 38, pp. 3949 – 3959.
- HU, S., YANG, F., SUN, C., *et al.*, 2008, "Simultaneous Removal of COD and Nitrogen using a Novel Carbon-Membrane Aerated Biofilm Reactor", *Journal of Environmental Sciences*, v. 20, pp. 142 – 148.
- HU, J., LI, D., LIU, Q., *et al.*, 2009, "Effect of Organic Carbon on Nitrification Efficiency and Community Composition of Nitrifying Biofilms", *Journal of Environmental Sciences*, v. 21, pp. 387 – 394.
- ISAKA, K., YOSHIE, S., SUMINO, T., *et al.*, 2007, "Nitrification of Landfill Leachate Using Immobilized Nitrifying Bacteria at Low Temperatures", *Biochemical Engineering Journal*, v. 37, pp. 49 – 55.
- JENKINS, D., RICHARD, M. G. e DAIGGER, G. T., 1993, *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. 2nd. Michigan, Lewis Publishers.
- JEONG, J., HIDAKA, T., TSUNO, H., *et al.*, 2006, "Development of Biological Filter as Tertiary Treatment for Effective Nitrogen Removal: biological filter for tertiary treatment", *Water Research*, v. 40, pp. 1127 – 1136.
- JETTEN, M. S. M., LOGEMANN, S., MUYZER, G., *et al.*, 1997, "Novel Principles in the Microbial Conversion of Nitrogen Compounds", *Applied Water Management Research*, v. 71, pp.75 – 93.
- JETTEN, M. S. M., STROUS, M., van de PAS-SCHOONEN, K. T., *et al.*, 1999, "The Anaerobic Oxidation of Ammonium", *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, pp. 421 – 437.

- JONSSON, K., GRUNDITZ, C., DALHAMMAR, G., *et al.*, 2000, "Occurrence of Nitrification Inhibition in Swedish Municipal Wastewaters", *Water Research*, v. 34, n. 9, pp. 2455 – 2462.
- JUBANY, I., LAFUENTE, J., BAEZA, J. A., *et al.*, 2009, "Total and Stable Washout of Nitrite Oxidizing Bacteria from a Nitrifying Continuous Activated Sludge System using Automatic Control Based on Oxygen Uptake Rate Measurements", *Water Research*, v. 43, n. 17, pp. 2761 – 2772.
- KAMPSCHREUR, M. J., TEMMINK, H., KLEEREBEZEM, R., *et al.*, 2009, "Nitrous Oxide Emission During Wastewater Treatment", *Water Research*, v. 43, n. 17, pp. 4093 – 4103.
- KARGI, F. e DINCER, A. R., 1996, "Effect of Salt Content on Biological Treatment of Saline Wastewater by Fed-Batch Operation", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, pp. 529 – 537.
- KARGI, F. e DINCER, A. R., 1998, "Saline Wastewater Treatment by Halophile-Supplemented Activated Sludge Culture in an Aerated Rotating Biodisc Contactor", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, pp. 427 – 433.
- KARGI, F. e DINCER, A. R., 1999, "Salt Inhibition of Nitrification and Denitrification in Saline Wastewater", *Environmental Technology*, v. 20, pp. 1147 – 1153.
- KARGI, F. e DINCER, A. R., 2000, "Use of Halophilic Bacteria in Biological Treatment of Saline Wastewater by Fed-Batch Operation", *Water Environmental Research*, v. 72, n. 2, pp. 170 – 174.
- KARGI, F. e DINCER, A. R., 2001, "Kinetics of Sequential Nitrification and Denitrification Processes", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, pp. 37 – 42.
- KARGI, F. e UYGUR, A., 2003, "Effect of Carbon Source on Biological Nutrient Removal in a Sequencing Batch Reactor", *Bioresource Technology*, v. 89, pp. 89 – 93.

- KARGI, F. e UYGUR, A., 2004, "Salt Inhibition on Biological Nutrient Removal from Saline Wastewater in a Sequencing Batch Reactor", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, pp. 313 – 318.
- KIELING, D. D., 2004, *Estudo da Remoção Biológica de Nitrogênio a partir de Lodo Nitrificante Cultivado em Meio Autotrófico sob Condições Anóxicas*. Dissertação de M.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- KIM, D-J. e KIM, S-H., 2006, "Effect of Nitrite Concentration on the Distribution and Competition of Nitrite-Oxidizing Bacteria in Nitrataion Reactor Systems and their Kinetic Characteristics", *Water Research*, v. 40, pp. 887 – 894.
- KIM, D-J. e SEO, D., 2006, "Selective Enrichment and Granulation of Ammonia Oxidizers in a Sequencing Batch Airlift Reactor", *Process Biochemistry*, v. 41, pp. 1055 – 1062.
- KIM, D-J., LEE, D-I. e KELLER, J., 2006, "Effect of Temperature and Free Ammonia on Nitrification and Nitrite Accumulation in Landfill Leachate and Analysis of its Nitrifying Bacterial Community by FISH", *Bioresource Technology*, v. 97, pp. 459 – 468.
- KRAUSE, L. G. T., 2006, *Influência das Relações DQO/N e S_0/X_0 na Atividade de Microrganismos Desnitrificantes*. Tese de M.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- LAZAROVA V., CAPDEVILLE, B. e NIKOLOV, L., 1994, "Influence of Seeding Conditions on Nitrite Accumulation in a Denitrifying Fluidized Bed Reactor", *Water Research*, v. 28, pp. 1189 – 1197.
- LAZAROVA V., NOGUEIRA, R., MANEM, J., *et al.*, 1997, "Control of Nitrification Efficiency in a New Biofilm Reactor", *Water Science and Technology*, v. 36, n. 1, p. 31 – 41.
- LEE, H-W., LEE, S-Y., LEE, J-W., *et al.*, 2002, "Molecular Characterization of Microbial Community in Nitrate-Removing Activated Sludge", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 41, pp. 85 – 94.

- LI, Y., MENVIEL, L e PENG, T., 2006, "Nitrate Deficits by Nitrification and Denitrification Processes in the Indian Ocean", *Deep-Sea Research*, v. I-53, pp. 94 – 110.
- LIN, Y., HE, Y., KONG, B., *et al.*, 2005, "Isolation and Characterization of Heterotrophic Nitrifying Bacteria in MBR", *Journal of Environmental Sciences*, v. 17, n. 4, pp. 589 – 592.
- LIU, H. e FANG, H. H. P., 2002, "Extraction of Extracellular Polymeric Substances (EPS) of Sludges", *Journal of Biotechnology*, v. 95, pp. 249 – 256.
- LITTLETON, H. X., DAIGGER, G. T., STROM, P. F., *et al.*, 2002, "Evaluation of Autotrophic Denitrification, Heterotrophic Nitrification, and PAOs in Full Scale Simultaneous Biological Nutrient Removal Systems", *Water Science and Technology*, v. 46, n. 1-2, pp. 305 – 312.
- LOUZEIRO, N. R., MAVINI, D. S., OLDHAM, W. K., *et al.*, 2002, "Methanol-Induced Biological Nutrient Removal Kinetics in a Full-Scale Sequencing Batch Reactor", *Water Research*, v. 36, pp. 2721 – 2732.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. H., FARR, A. L., *et al.*, 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 173, pp. 265 – 275.
- LUOSTARINEN, S., LUSTE, S., VALENTIN, L., *et al.*, 2006, "Nitrogen Removal from on-site Treated Anaerobic Effluents Using Intermittently Aerated Moving Bed Biofilm Reactors at Low Temperatures", *Water Research*, v. 40, pp. 1607 – 1615.
- MACE, S. e MATA-ALVAREZ, J., 2002, "Utilization of SBR Technology for Wastewater Treatment: an overview", *Industrial Engineering Research*, v. 41, pp. 5539 – 5553.
- MADONI, P., 1994, "A Sludge Biotic Index (SBI) for the evaluation of the Biological Performance of Activated Sludge Based on the Microfauna Analysis", *Water Research*, v. 28, p. 67 – 75.

- MANSELL, B. O. e SCHROEDER, E. D., 1999, "Biological Denitrification in a Continuous Flow Membrane Reactor", *Water Research*, v. 33, n. 8, pp. 1845 – 1850.
- MANSER, R., MUCHE, K., GUJER, W., *et al.*, 2005, "A Rapid Method to Quantify Nitrifiers in Activated Sludge", *Water Research*, v. 39, pp. 1585 – 1593.
- MANSER, R., GUJER, W. e SIEGRIST, H., 2006, "Decay Processes of Nitrifying Bacteria in Biological Wastewater Treatment Systems", *Water Research*, v. 40, pp. 2416 – 2426.
- MARTIN, M. A. M., ENRIQUEZ, L. L., FERNANDEZ-POLANCO., M., *et al.*, 2007, "Nutrients Removal in Hybrid Fluidised Bed Bioreactors Operated with Aeration Cycles", *Water Science and Technology*, v. 55, n. 8-9, pp. 51 – 58.
- MATIAS, V. R. F., 2000, *Extração e Caracterização Parcial de Exopolímeros de Lodos Ativados*. Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MATSUMOTO, S., TERADA, A. e TSUNEDA, S., 2007, "Modeling of Membrane-Aerated Biofilm: effects of C/N ratio, biofilm thickness and surface loading of oxygen on feasibility of simultaneous nitrification and denitrification", *Biochemical Engineering Journal*, v. 37, pp. 98 – 107.
- METCALF e EDDY, 2003, *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*. 4th ed. Boston, McGraw Hill.
- MEYER, R. L., ZENG, R. J., GIUGLIANO, V., *et al.*, 2005, "Challenges for Simultaneous Nitrification, Denitrification, and Phosphorus Removal in Microbial Aggregates: mass transfer limitation and nitrous oxide production", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 52, pp. 329 – 338.
- MOBARRY, B. K., WAGNER, M., URBAIN, V., *et al.*, 1996, "Phylogenetic Probes for Analyzing Abundance and Spatial Organization of Nitrifying Bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 6, pp. 2156 – 2162.

- MODIN, O., FUKUSHI, K. e YAMAMOTO, K., 2007, "Denitrification with Methane as External Carbon Source", *Water Research*, v. 41, pp. 2726 – 2738.
- MONTRAS, A., PYCKE, B., BOON, N., *et al.*, 2008, "Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in an Autotrophic Nitrifying Biofilm Reactor as Depicted by Molecular Analyses and Mathematical Modeling", *Water Research*, v. 42, pp. 1700 – 1714.
- MOSQUERA-CORRAL, A., DAPENA-MORA, A., CAMPOS, J. L., *et al.*, 2005, "Partial Nitrification in a SHARON Reactor in the Presence of Salts and Organic Carbon Compounds", *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 3109 – 3118.
- MOTA, C., RIDENOURE, J., CHENG, J., *et al.*, 2005, "High Levels of Nitrifying Bacteria in Intermittently Aerated Reactors Treating High Ammonia Wastewater", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 54, pp. 391 – 400.
- MOTER, A. e GÖBEL, U. B., 2000, "Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) for Direct Visualization of Microorganisms", *Journal of Microbiological Methods*, v. 41, pp. 85 – 112.
- MOURA, I e MOURA, J. J. G., 2001, "Structural Aspects of Denitrifying Enzymes", *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, pp. 168 – 175.
- MOUSSA, M. S., HOOIJMANS, C. M., LUBBERDING, H. J., *et al.*, 2005, "Modelling Nitrification, Heterotrophic Growth and Predation in Activated Sludge", *Water Research*, v. 39, pp. 5080 – 5098.
- MOUSSA, M. S., SUMANASEKERAA, D. U., IBRAHIMA, S. H., *et al.*, 2006, "Long Term Effects of Salt on Activity, Population Structure and Floc Characteristics in Enriched Bacterial Cultures of Nitrifiers", *Water Research*, v. 40, pp. 1377 – 1388.
- MUNZ, G., GUALTIERO, M., SALVADORI, L., *et al.*, 2008, "Process Efficiency and Microbial Monitoring in MBR (membrane bioreactor) and CASP (conventional activated

- sludge process) Treatment of Tannery Wastewater”, *Bioresource Technology*, v. 99, pp. 8559 – 8564.
- NHGRI-USA, National Human Genome Research Institute – National Institutes of Health. <http://www.genome.gov/10000206>. Consultado em: 06/06/2009.
- NOGUEIRA, R., MELOA, L. F., PURKHOLDB, U., *et al.*, 2002, “Nitrifying and Heterotrophic Population Dynamics in Biofilm Reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon”, *Water Research*, v. 36, pp. 469 – 481.
- OBAJA, D., MAC, S., COSTA, J., *et al.*, 2003, “Nitrification, Denitrification and Biological Phosphorus Removal in Piggery Wastewater using a Sequencing Batch Reactor”, *Bioresource Technology*, v. 87, pp. 103 – 111.
- OBAJA, D., MAC, S. e MATA-ALVAREZ, J., 2005, “Biological Nutrient Removal by a Sequencing Batch Reactor (SBR) Using an Internal Organic Carbon Source in Digested Piggery Wastewater”, *Bioresource Technology*, v. 96, pp. 7 – 14.
- ØDEGAARD, H., RUSTEN, B. e WESTRUM, T., 1994, “A New Moving Bed Biofilm Reactor – Applications and Results”, *Water Science and Technology*, v. 29, n. 10-11, pp. 157 – 165.
- OKABE, S., OZAWA, Y., HIRATA, K., *et al.*, 1996, “Relationship between Population Dynamics of Nitrifiers in Biofilms and Reactor Performances at various C/N Ratios”, *Water Research*, v. 30, n. 7, pp. 1563 – 1572.
- PANSWAD, T. e ANAN, C., 1999, “Specific Oxygen, Ammonia and Nitrate Uptake Rates of a Biological Nutrient Removal Process Treating Elevated Salinity Wastewater”, *Biosource Technologies*, v. 70, pp. 237 – 243.
- PARK, S., BAE, W., CHUNG, J., *et al.*, 2007, “Empirical Model of the pH Dependence of the Maximum Specific Nitrification Rate”, *Process Biochemistry*, v. 42, pp. 1671 – 1676.

- PARK, C. e HELM, R. F., 2008, "Application of Metaproteomic Analysis for Studying Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Activated Sludge Flocs and their Fate in Sludge Digestion", *Water Science and Technology*, v. 57, n. 12, pp. 2009 – 2015.
- PARK, J. J., BYUN, I. G., YU, J. C., PARK, R. S., JU, D. J., HUR, S. H. e PARK, T. J., 2008, "Analysis of Nitrifying Bacterial Communities in Aerobic Biofilm Reactors with Different DO Conditions Using Molecular Techniques", *Water Science and Technology*, v. 57, n. 12, p. 1889 – 1889.
- PARK, S. e BAE, W., 2009, "Modeling Kinetics of Ammonium Oxidation and Nitrite Oxidation under Simultaneous Inhibition by Free Ammonia and Free Nitrous Acid", *Process Biochemistry*, v. 44, pp. 631 – 640.
- PERSSON, F., WIK, W., SORENSSON, F., *et al.*, 2002, "Distribution and Activity of Ammonia Oxidizing Bacteria in a Large Full-Scale Trickling Filter", *Water Research*, v. 36, pp. 1439 – 1448.
- PHILLIPS, R. B. e REED, K. M., 1996, "Application of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) Techniques to Fish Genetics: a review", *Aquaculture*, v. 140, pp. 197 – 216.
- POLLARD, P. C., 2006, "A Quantitative Measure of Nitrifying Bacterial Growth", *Water Research*, v. 40, pp. 1569 – 1576.
- PRINCIPI, P., VILLA, F., BERNASCONI, M., *et al.*, 2006, "Metal Toxicity in Municipal Wastewater Activated Sludge Investigated by Multivariate Analysis and *in situ* Hybridization", *Water Research*, v. 40, pp. 99 – 106.
- PUZNAVA, N., PAYRAUDEAU, M. e THORNBERG, D., 2000, "Simultaneous Nitrification and Denitrification in Biofilters with Real-Time Aeration Control", *Water Science and Technology*, v. 43, n. 1, pp. 269 – 276.
- QIAO, S., MATSUMOTO, N., SHINOHARA, T., *et al.*, 2009, "High-rate Partial Nitrification Performance of High Ammonium Containing Wastewater under Low Temperatures", *Bioresource Technology*, v. 101, n. 1, pp. 111 – 117.

- RABAH, F. K. J. e DAHAB, M. F., 2004a, "Nitrate Removal Characteristics of High-Performance Fluidized-Bed Biofilm Reactors", *Water Research*, v. 38, pp. 3719 – 3728.
- RABAH, F. K. J. e DAHAB, M. F., 2004b, "Biofilm and Biomass Characteristics in High-Performance Fluidized-Bed Biofilm Reactors", *Water Research*, v. 38, pp. 4262 – 4270.
- RAMALHO, R. S., 1983, *Introduction to Wastewater Treatment Processes*. 2ª ed. Quebec, Academic Press.
- REIS, G. G., 2007, *Influência da Carga Orgânica no Desempenho de Reatores de Leito Móvel com Biofilme (MBBR)*. Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ROBERTS, G. S. e LEWIS, G., 2001, "In Situ Analysis of *Nitrosomonas* spp. in Wastewater Treatment Wetland Biofilms", *Water Research*, v. 35, n. 11, pp. 2731 – 2739.
- ROQUES, H., 1980, *Fondements Theoriques du Traitement Biologique des Eaux*. 12ª ed. Paris, Technique et Documentation.
- ROSA, M. F., FURTADO, A. A. L., ALBUQUERQUE, R. T., *et al.*, 1998, "Biofilm Development and Ammonia Removal in the Nitrification of a Saline Wastewater", *Bioresource Technology*, v. 65, pp. 135 – 138.
- ROWAN, A. K., SNAPE, J. R., FEARNside, D., *et al.*, 2003, "Composition and Diversity of Ammonia-Oxidising Bacterial Communities in Wastewater Treatment Reactors of Different Design Treating Identical Wastewater", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 43, pp. 195 – 206.
- ROY, R. e KNOWLES, R., 1995, "Differential Inhibition by Allylsulfide of Nitrification and Methane Oxidation in Freshwater Sediment", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, pp. 4278 – 4283.

- RUIZ, G., JEISON, D. e CHAMY, R., 2003, "Nitrification with High Nitrite Accumulation for the Treatment of Wastewater with High Ammonia Concentration", *Water Research*, v. 37, pp. 1371 – 1377.
- RUIZ, G., JEISON, D., RUBILAR, O., *et al.*, 2006, "Nitrification–Denitrification via Nitrite Accumulation for Nitrogen Removal from Wastewaters", *Bioresource Technology*, v. 97, pp. 330 – 335.
- RUSTEN, B., EIKEBROKK, B., ULGENES, Y., *et al.*, 2006, "Design and Operations of the Kaldnes Moving Bed Biofilm Reactors", *Aquacultural Engineering*, v. 34, n. 3, pp. 322 – 331.
- SALVADO, H., PALOMO, A., MAS, M., *et al.*, 2004, "Dynamics of Nematodes in a High Organic Loading Rotating Biological Contactors", *Water Research*, v. 38, pp. 2571 – 2578.
- SALVETTI, R., AZZELLINO, A., CANZIANI, R., *et al.*, 2006, "Effects of Temperature on Tertiary Nitrification in Moving-Bed Biofilm Reactors", *Water Research*, v. 40, pp. 2981 – 2993.
- SÁNCHEZ, O., ASPÉ, E., MARTÍ, M. C., *et al.*, 2004, "The Effect of Sodium Chloride on the two-step Kinetics on the Nitrifying Process", *Water Environmental Research*, v. 76, n. 1, pp. 73 – 80.
- SANT`ANNA JR., G. L., 2007, , "Reatores e Processos". In: Schmidell, W., Soares, H.M., Etchebehere, C., Menes, R.J., Bertola, N.C., Contreras, E.M. (eds), *Tratamento Biológico de Águas Residuárias*, 1ª ed., capítulo IV.2, Florianópolis, SC, Brasil, Editora Tribo da Ilha.
- SANT`ANNA JR., G. L., no prelo, *Tratamento Biológico de Efluentes: fundamentos e aplicações*. 1ª ed. Rio de Janeiro, Editora Interciência.
- SANZ, J. L. e KOCHLING, T., 2007, "Molecular Biology Techniques used in Wastewater Treatment: an overview", *Process Biochemistry*, v. 42, pp. 119 – 133.

- SARIOGLU, M., INSEL, G., ARTAN, N., *et al.*, 2009, "Model Evaluation of Simultaneous Nitrification and Denitrification in a Membrane Bioreactor Operated without an Anoxic Reactor", *Journal of Membrane Science*, v. 337, pp. 17 – 27.
- SAWAITTAYOTHIN, V. e POLPRASERT, C., 2007, "Nitrogen Mass Balance and Microbial Analysis of Constructed Wetlands Treating Municipal Landfill Leachate", *Bioresource Technology*, v. 98, pp. 565 – 570.
- SCHMIDELL, W. e REGINATTO, V., 2007, "Processos de Eliminação de Nitrogênio". In: Schmidell, W., Soares, H.M., Etchebehere, C., Menes, R.J., Bertola, N.C., Contreras, E.M. (eds), *Tratamento Biológico de Águas Residuárias*, 1ª ed., capítulo VI.2, Florianópolis, SC, Brasil, Editora Tribo da Ilha.
- SCHMIDT, I., SLIEKERS, O., SCHMID, M., *et al.*, 2003, "New Concepts of Microbial Treatment Processes for the Nitrogen Removal in Wastewater", *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, pp. 481 – 492.
- SEMON, J., SADICK, T., PALUMBO, D., *et al.*, 1997, "Biological Upflow Fluidized Bed Denitrification Reactor Demonstration Project–Stamford CT, USA", *Water Science and Technology*, v. 36, n. 1, pp. 139 – 146.
- SHIRIMALI, M. e SINGH, K. P., 2001, "New Methods of Nitrate Removal from Water", *Environmental Pollution*, v. 112, pp. 351 – 359.
- SIN, G., KAELIN, D., KAMPSCHREUR, M. J., *et al.*, 2008, "Modelling Nitrite in Wastewater Treatment Systems: a Discussion of Different Modelling Concepts", *Water Science and Technology*, v. 58, n. 6, pp. 1155 – 1171.
- SINHA, B. e ANNACHHATRE, A. P., 2007, "Assessment of Partial Nitrification Reactor Performance through Microbial Population Shift Using Quinone Profile, FISH and SEM", *Bioresource Technology*, v. 98, pp. 3602 – 3610.

- SLIEKERS, A. O., DERWORT, N., CAMPOS GOMEZ, J. L., *et al.*, 2002, "Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite in one Single Reactor", *Water Research*, v. 36, pp. 2475 – 2482.
- SORIANO, S. e WALKER, N., 1968, "Isolation of Ammonia-oxidizing Autotrophic Bacteria", *Journal of Applied Bacteriology*, v. 31, pp. 493 – 497.
- SORIANO, S. e WALKER, N., 1973, "The Nitrifying Bacteria in Soils from Rothamsted Classical Fields and Elsewhere", *Journal of Applied Bacteriology*, v. 36, pp. 523 – 529.
- SURAMPALLI, R. Y., TYAGI, R. D., SCHEIBLE, O. K., *et al.*, 1997, "Nitrification, Denitrification and Phosphorous Removal in Sequential Batch Reactors", *Bioresource Technology*, v. 61, pp. 151 – 157.
- SURMACZ-GORSKA, J., CICHON, A. e MIKSCH, K., 1997, "Nitrogen Removal from Wastewater with High Ammonia Nitrogen Concentration via Shorter Nitrification and Denitrification", *Water Science and Technology*, v. 36, n. 10, pp. 73 – 78.
- TELGEMANN, U., HORN, H. e MORGENROTH, E., 2004, "Influence of Growth History on Sloughing and Erosion from Biofilms", *Water Research*, v. 38, n. 17, pp. 3671 – 3684.
- TOKUTOMI, T., 2004, "Operation of a Nitrite-type Airlift Reactor as Low DO Concentration", *Water Science and Technology*, v.49, n. 5-6, p. 81 – 88.
- TOKUTOMI, T., KIYOGAWA, C., SHIBAYAMA, H. H. *et al.*, 2006, "Effect of Inorganic Carbon on Nitrite Accumulation in an Aerobic Granule Reactor", *Water Science and Technology*, v. 35, n. 12, pp. 285 – 294.
- TONKOVIC, Z., 1998, "Energetics of Enhanced Biological Phosphorus and Nitrogen Removal Processes", *Water Science and Technology*, v. 38, n.1, pp. 177 – 184.
- TSUNEDA, S., MIKAMI, M., KIMOCHIBI, Y., *et al.*, 2005, "Effect of Salinity on Nitrous Oxide Emission in the Biological Nitrogen Removal Process for Industrial Wastewater", *Journal of Hazardous Materials*, v. B119, pp. 93 – 98.

- UYGUR, A., 2006, "Specific Nutrient Removal Rates in Saline Wastewater Treatment Using Sequencing Batch Reactor", *Process Biochemistry*, v. 41, pp. 61 – 66.
- VADIVELU, V. M., KELLER, J. e YUAN, Z., 2007, "Effect of Free Ammonia on the Respiration and Growth Processes of an Enriched *Nitrobacter* Culture", *Water Research*, v 41, pp. 826 – 834.
- VAZQUEZ-PADIN, J. R., POZO, M. J., JARPAC, M., *et al.*, 2009, "Treatment of Anaerobic Sludge Digester Effluents by the CANON Process in an Air Pulsing SBR", *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, pp. 336 – 341.
- VENDRAMEL, S. M. R., 2004, *Tratamento de Efluente de Refinaria de Petróleo em Bio-Reator Aeróbio de Leito Fixo Submerso*. Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- VILLAVERDE, S., GARCIA-ENCINA, P. A. e FDZ-POLANCO, F., 1997, "Influence of pH over Nitrifying Biofilm Activity in Submerged Biofilters", *Water Research*, v. 31, pp. 1180 – 1186.
- VOLCKE, E. I. P., SANCHEZ, O., STEYER, J-P., *et al.*, 2008, "Microbial Population Dynamics in Nitrifying Reactors: experimental evidence explained by a simple model including interspecies competition", *Process Biochemistry*, v. 43, pp. 1398 – 1406.
- VON SPERLING, M., 1996, *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Princípios Básicos de Tratamento de Esgotos*. 1ª ed. Belo Horizonte, DESA/UFMG.
- WAGNER, M e LOY, A, 2002, "Bacterial Community Composition and Function in Sewage Treatment Systems", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 218 – 227.
- WANG, X. J., XIA, S. Q., CHEN, L., *et al.*, 2006, "Nutrients Removal from Municipal Wastewater by Chemical Precipitation in a Moving Bed Biofilm Reactor", *Process Biochemistry*, v. 41, n. 4, pp. 824 – 828.

- WANG, R., TERADA, A., LACKNER, S., *et al.*, 2009, "Nitritation Performance and Biofilm Development of Co- and Counter-Diffusion Biofilm Reactors: modeling and experimental comparison", *Water Research*, v. 43, pp. 2699 – 2709.
- WASIK, E., BOHDZIEWICZ, J. e BLASZCZYK, M., 2001, "Removal of Nitrate Ions from Natural Water Using a Membrane Bioreactor", *Separation and Purification Technology*, v. 22/23, pp. 383 – 392.
- WHANG, L-M., CHIEN, I-C., YUAN, S-L., *et al.*, 2009, "Nitrifying Community Structures and Nitrification Performance of Full-Scale Municipal and Swine Wastewater Treatment Plants", *Chemosphere*, v. 75, pp. 234 – 242.
- WIESMANN, U., 1994, "Biological Nitrogen Removal from Wastewater", *Advances in Biochemical Engineering*, v. 51, pp. 113 – 154.
- WINDEY, K., De BO, I. e VERSTRAETE, W., 2005, "Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification–Denitrification (OLAND) in a Rotating Biological Contactor Treating High-Salinity Wastewater", *Water Research*, v. 39, pp. 4512 – 4520.
- WITTEBOLLE, L., VERSTRAETE, W. e BOON, N., 2009, "The Inoculum Effect on the Ammonia-Oxidizing Bacterial Communities in Parallel Sequential Batch Reactors", *Water Research*, v. 43, n. 17, pp. 4149 – 4158.
- WYFFELS, S., PYNAERT, K., BOECK, P., *et al.*, 2003, "Identification and Quantification of Nitrogen Removal in a Rotating Biological Contactor by ¹⁵N Tracer Techniques", *Water Research*, v. 37, pp. 1252 – 1259.
- WOOLARD, C. R. e IRVINE, R. L., 1995, "Treatment of Hypersaline Wastewater in the Sequencing Batch Reactor", *Water Research*, v. 29, pp. 1159 – 1168.
- XIA, S., LI, J. e WANG, R., 2008, "Nitrogen Removal Performance and Microbial Community Structure Dynamics Response to Carbon Nitrogen Ratio in a Compact Suspended Carrier Biofilm Reactor", *Ecological Engineering*, v. 32, pp. 256 – 262.

- YAN, J. e HU, Y. Y., 2009, "Partial Nitrification to Nitrite for Treating Ammonium-Rich Organic Wastewater by Immobilized Biomass System", *Bioresource Technology*, v. 100, pp. 2341 – 2347.
- YANG, L. e ALLEMAN, J. E., 1992, "Investigation of Batch Wise Nitrite Build-up by an Enriched Nitrification Culture", *Water Science and Technology*, v. 26, n. 5-6, pp. 997 – 1005.
- YANG, S-F., TAY, J-H. e LIU, Y., 2003, "A Novel Granular Sludge Sequencing Batch Reactor for Removal of Organic and Nitrogen from Wastewater", *Journal of Biotechnology*, v. 106, pp. 77 – 86.
- YANG, S-F., TAY, J-H. e LIU, Y., 2004, "Inhibition of Free Ammonia to the Formation of Aerobic Granules", *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, pp. 41 – 48.
- YE, L., PENG, C-Y., TANG, B., *et al.*, 2009, "Determination Effect of Influent Salinity and Inhibition Time on Partial Nitrification in a Sequencing Batch Reactor Treating Saline Sewage", *Desalination*, v. 246, pp. 556 – 566.
- YOO, H., AHN, K-H., LEE, H-J., *et al.*, 1999, "Nitrogen Removal from Synthetic Wastewater by Simultaneous Nitrification and Denitrification (SND) via Nitrite in an Intermittently-Aerated Reactor", *Water Research*, v. 33, n. 1, pp. 145 – 154.
- YOSHIE, S., NODA, N., TSUNEDA, S., *et al.*, 2004, "Design of 16S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes and Microbial Community Analysis in the Denitrification Process of a Saline Industrial Wastewater Treatment System", *FEMS Microbiology Letters*, v. 235, pp. 183 – 189.
- ZHANG, T. C., FU, Y. C. e BISHOP, P. L., 1995, "Competition for Substrate and Space in Biofilms", *Water Environmental Research*, v. 67, pp. 992–1003.

ZHANG, Y., ZHOU, J., ZHANG, J., *et al.*, 2009a, "An Innovative Membrane Bioreactor and Packed-Bed Biofilm Reactor Combined System for Shortcut Nitrification-Denitrification", *Journal of Environmental Sciences*, v. 21, pp. 568 – 574.

ZHANG, B., SUN, B., JI, M., *et al.*, 2009b, "Population Dynamic Succession and Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in a Membrane Bioreactor Treating Municipal Wastewater", *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, pp. 796 – 803.

ZDRADEK, C. P., 2005, *Seleção de Linhagens Oxidadoras de Amônio e Remoção de Nitrogênio via Nitrito em Reator Descontínuo Alimentado (SBR), sob Condições de limitação de Oxigênio*. Tese de D.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

ANEXO I.1

Composição dos meios sintéticos autotróficos para o enriquecimento e isolamento das AOB e das NOB

Componentes	Teor no meio sintético (g L ⁻¹)	
	AOB (SKINNER e WALKER, 1961 <i>apud</i> SORIANO e WALKER, 1968)	NOB (HENGEL <i>apud</i> SORIANO e WALKER, 1973)
Cloreto de amônio	0,15	-
Sulfato de amônio	0,35	-
Nitrito de sódio	-	2,0
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,11	0,05
Fosfato de potássio monobásico	0,22	-
Fosfato de potássio dibásico	-	0,1
Cloreto de cálcio dihidratado	0,04	-
Carbonato de cálcio	-	0,01
Cloreto de sódio	20	20
Solução de carbonato de sódio 5% para ajuste do pH	4,0 mL L ⁻¹	-
Indicador azul de bromotimol 0,04%	12 mL L ⁻¹	-
Solução de micronutrientes (Campos <i>et al.</i> , 1999)	0,5 mL L ⁻¹	0,5 mL L ⁻¹

ANEXO I.2

Composição da solução de micronutrientes adicionada aos meios sintéticos para o enriquecimento e isolamento das AOB e NOB (CAMPOS *et al.*, 1999)

Componentes	Teor na solução de micronutrientes (g L⁻¹)
EDTA	50
Sulfato de ferro heptahidratado	2,7
Sulfato de zinco	12,5
Cloreto de cálcio	5,5
Cloreto de manganês	3,2
Sulfato de cobre	1,0
Molibdato de amônio	1,0
Cloreto de cobalto	0,9

ANEXO I.3

Composição do meio sintético heterotrófico para o crescimento das bactérias presentes nos frascos de isolamento, adaptado de LIN *et al.* (2005)

Componentes	Teor no meio sintético (g L⁻¹)
Amido solúvel	0,13
Glicose	0,33
Peptona	0,06
Fosfato de potássio monobásico	0,05
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,07
Bicarbonato de sódio	0,67
Cloreto de amônio	0,15
Cloreto de sódio	20
Solução de micronutrientes (CAMPOS <i>et al.</i> , 1999)	0,1 mL L ⁻¹

ANEXO I.4

Protocolo para a aplicação da técnica de FISH

I.4.1 - Procedimento utilizado para obter a biomassa aderida

- 1- Retirou-se aleatoriamente do biorreator três biomédias, sempre em torno de cinco horas de aeração, momento considerado como o de maior atividade celular;
- 2- Colocou-se cada biomédia em um bécher de vidro no qual foi adicionado 5 mL de solução 1xPBS (tampão fosfato salino). Posteriormente, o bécher foi colocado no aparelho de ultra-som MS200 marca Thornton, onde permaneceu por 30 min;
- 3- Terminado o tempo destinado ao ultra-som retirou-se, com o auxílio de uma pinça, a biomédia do meio líquido. No caso de restar algum material aderido à peça o mesmo era retirado com o auxílio de uma agulha;
- 4- O líquido restante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL o qual foi levado à centrífuga (marca Quimis) por 15 min a 1500 rpm;

Terminado o tempo destinado à centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o material centrifugado referente à biomassa presente nos três tubos iniciais, foi misturado em um único tubo Falcon e, então, deu-se prosseguimento à etapa de fixação.

I.4.2 Procedimento e soluções da etapa de fixação

Soluções Estoque:

- tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,2-7,4)
- NaCl $5,0 \text{ mol L}^{-1}$
- tampão 3xPBS (NaCl 390 mmol L^{-1} e tampão fosfato 30 mmol L^{-1} em pH 7,2 – 7,4)
- tampão 1xPBS (NaCl 130 mmol L^{-1} e tampão fosfato 10 mmol L^{-1} em pH 7,2 – 7,4)

*Esterilizar e guardar as soluções estoque na geladeira por no máximo 6 meses.

Agente fixador

Solução 4% paraformaldeído (PFA) em tampão PBS

Preparação:

1. Aquecer 20 mL de água destilada a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
2. Agregar 1,2121g de paraformaldeído (com cuidado para não aspirar) e gotas de NaOH 2 mol L^{-1} até dissolução do 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 µm;
5. Armazenar a 4°C por não mais que duas semanas.

Procedimento utilizado para a fixação das células presentes na biomassa:

- 1- Adicionou-se 4 mL de solução 1xPBS e 12 mL de solução PFA-PBS 4% fria à biomassa presente no tubo Falcon, esta foi ressuspensa e homogeneizada no agitador de tubos da marca Phoenix por 30 s, e então incubada a 4°C por três horas;
- 2- Passado o tempo destinado à incubação, o tubo Falcon foi levado à centrifuga nas mesmas condições aplicadas para a obtenção da biomassa e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado;
- 3- Sobre a biomassa centrifugada foi adicionado 5 mL de solução 1xPBS, sendo a mesma ressuspensa no agitador de tubos e centrifugada nas mesmas condições anteriores, descartando-se o sobrenadante;
- 4- Adicionou-se, então, quantidade equivalente de solução 1xPBS e etanol 96% PA e promoveu-se a ressuspensão da biomassa;
- 5- As amostras fixadas foram armazenadas no freezer até serem hibridizadas.

A quantidade de solução 1xPBS e etanol adicionada foi determinada empiricamente tendo variado entre 2,5 e 5,0 mL para cada reagente, dependendo da menor ou maior quantidade de sólidos a serem fixados.

I.4.3 Procedimento e soluções da etapa de hibridização

Soluções Estoque:

- Tris-HCl 1,0 mol L⁻¹ em pH 7,4
- Na₂EDTA 0,5 mol L⁻¹
- NaCl 5,0 mol L⁻¹
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 10%)
- Meio de montagem (glicerol:PBS, 5:1)

Preparo da solução de hibridização e do tampão de lavagem

A solução de hibridização e o tampão de lavagem devem ser preparados no mesmo dia da hibridização. Os dois possuem os mesmos reagentes a não ser pela adição de formamida na solução de hibridização.

O teor de alguns reagentes nestas soluções pode ser alterado conforme a necessidade de cada amostra (conforme previamente comentado) sendo que estas condições terão que ser obtidas empiricamente.

As Tabelas I.4.3.1 e I.4.3.2 apresentam, respectivamente, as condições para a preparação do tampão de hibridização e do tampão de lavagem, sendo que o SDS 10% deve ser o último componente a ser adicionado para evitar a precipitação na solução.

Tabela I.4.3.1 - Tampão de hibridização.

Componentes	Volume na solução estoque	Concentração final
NaCl 5,0 mol L ⁻¹	3,6 mL	0,9 mol L ⁻¹
Na ₂ EDTA 0,5 mol L ⁻¹	200 µL	5,0 mmol L ⁻¹
Tris-HCl 1,0 mol L ⁻¹	400µL	20 mmol L ⁻¹
SDS 10%	20µL	0,01%
Formamida	% condizente com a sonda utilizada	
Água ultrapura	completar para o volume final de 20 mL	

Tabela I.4.3.2 - Tampão de lavagem.

Componentes	Volume na solução estoque	Concentração final
NaCl 5,0 mol L ⁻¹	Dependente do teor de formamida no tampão de hibridização	ver Tabela I.4.3.3
Na ₂ EDTA 0,5 mol L ⁻¹	500µL	5,0 mmol L ⁻¹
Tris-HCl 1,0 mol L ⁻¹	1000µL	20 mmol L ⁻¹
SDS 10%	50µL	0,01%
Água ultrapura	completar para o volume final de 50 mL	

A Tabela I.4.3.3 apresenta a relação entre o teor de formamida no tampão de hibridização e a concentração de NaCl no tampão de lavagem, que são parâmetros que variam conforme as sondas e as amostras utilizadas.

Tabela I.4.3.3 – Relação do teor de formamida no tampão de hibridização com a concentração de NaCl no tampão de lavagem.

Teor (%) de formamida no tampão de hibridização	Volume (em μL) de NaCl $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ para um volume final de 50 mL no tampão de lavagem	Concentração final de NaCl no tampão de lavagem em mol L^{-1}
0	8900	900
5	6260	636
10	4400	450
15	3080	318
20	2150	225
25	1490	159
30	1020	112
35	700	80
40	460	56
45	300	40
50	180	28
55	100	20
60	40	14
65	0	-

Antes da hibridização propriamente dita, deve-se fazer o recobrimento das lâminas com gel. Segue o procedimento:

- 1- Preparar 100 mL de gel;
- 2- Aquecer água ultrapura até 55 - 60°C. Adicionar 0,1 g de gelatina em pó sob intensa agitação e, na sequência, adicionar 0,01 g de sulfato de cromo e potássio. Deixar reservada certa quantidade da água para o caso da temperatura passar de 60°C;

- 3- Aguardar a dissolução total dos reagentes, sob a temperatura indicada, durante no máximo 10 min;
- 4- Transferir a solução gel para um porta lâminas e mergulhá-las no mesmo por 1 min;
- 5- Retirar as lâminas evitando a formação de bolhas e colocá-las em outro porta lâminas seco para que as mesmas sequem em temperatura ambiente.

Protocolo para a etapa de Hibridização

1. *Adição das amostras*

Adicionar as células pré-fixadas às lâminas secas em quantidade dependente da turbidez da amostra. Pode variar de 1 a 5 μL . Espalhar a gota de amostra cuidadosamente em cada poço tomando o cuidado de não raspar o gel. Deixar secar a temperatura ambiente; o tempo é indeterminado.

2. *Desidratação*

Preparar 3 tubos Falcon de 50 mL com soluções de álcool etílico PA (50, 70, e 100%). Mergulhar as lâminas, previamente secas, por 3 min em cada solução iniciando pela de menor concentração.

3. *Tubos de hidridização*

Utilizar tubos Falcon de 50 mL preparados com papel toalha umedecido na solução de hibridização como câmara de hibridização. Pré-aquecer os mesmos na estufa (46°C) durante o tempo de preparo das lâminas.

4. *Adição da sonda e da solução de hibridização às lâminas*

Cada poço da lâmina comporta até 10 μL . Adiciona-se 9 μL da solução de hibridização e 1 μL da sonda. Nos poços controle se adiciona apenas a solução de hibridização (10 μL). Colocar as lâminas dentro dos tubos Falcon pré-aquecidos e deixar na estufa pelo tempo e temperatura determinados.

5. *Preparo da solução de lavagem*

Aquecer a solução de lavagem em banho-maria por 5 min mantendo a temperatura constante em 48°C, antes de receber as lâminas. Retirar rapidamente as lâminas do tubo de hibridização e passar para o tubo de lavagem, virar o tubo, delicadamente, de um lado para o outro para homogeneizar e levar ao banho-maria (48°C) por 20 min. Ao retirar a lâmina do banho de lavagem lavá-la com um pissete de água (no mínimo destilada) dos dois lados. Colocar as lâminas para secar ao abrigo da luz em temperatura ambiente. O tempo é indeterminado, deve-se esperar a lâmina secar completamente.

6. *Adição de DAPI*

Depois das lâminas secas adicionar 10µL de DAPI em cada poço e deixar por 5 min ao abrigo da luz. Após os 5 min lavar com álcool 70%, retornar ao abrigo da luz e deixar secar.

7. *Adição do meio de montagem*

Adicionar uma gota do meio de montagem no centro de cada poço e colocar uma lamínula sobre a lâmina. Pressionar a lamínula para retirar possíveis bolhas. Antes de adicionar as lamínulas imergi-las no álcool e limpá-las suavemente com papel. Guardar as lâminas no congelador ao abrigo da luz ou observar ao microscópio.

ANEXO II

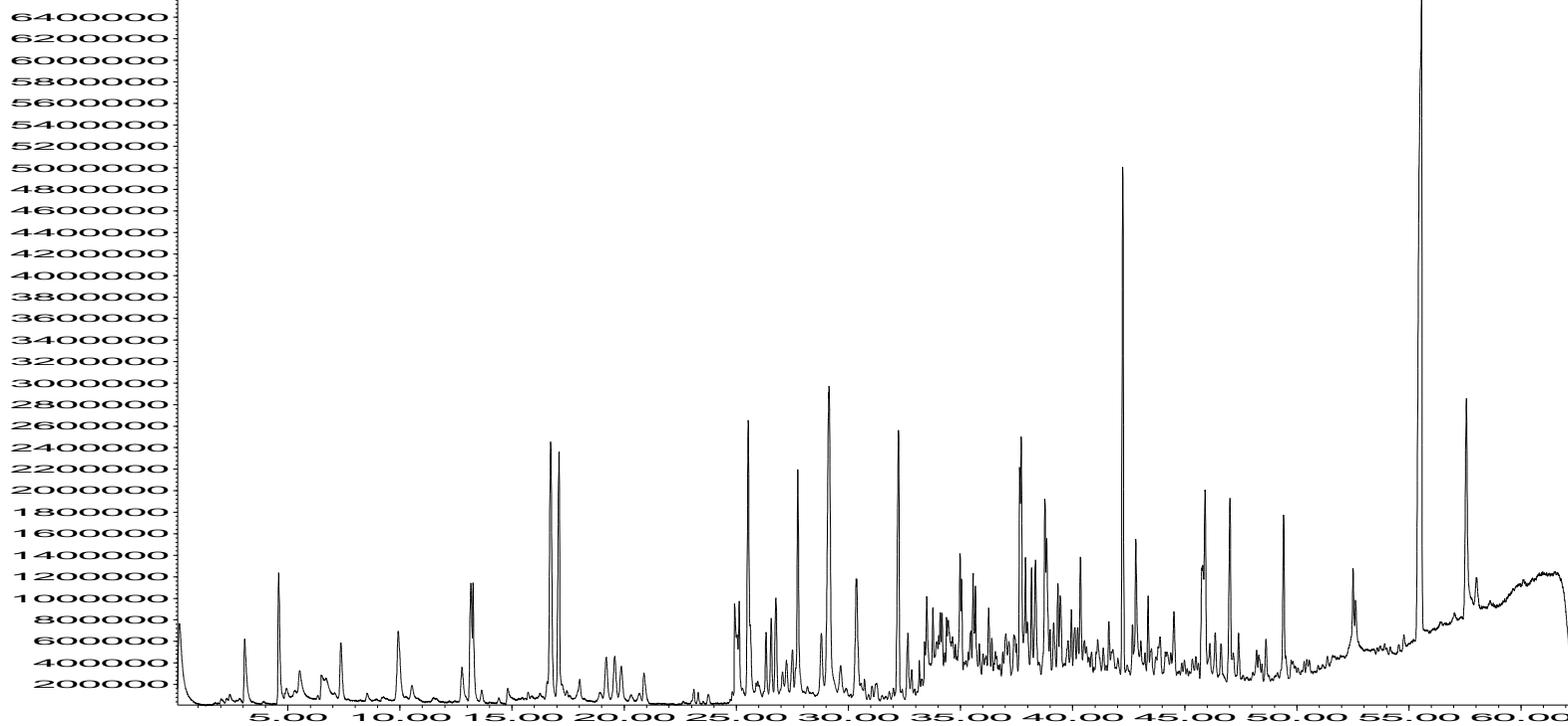
Cromatograma CG-MASSAS

Para obter os cromatogramas apresentados foi utilizado um cromatógrafo a gás (CG) modelo 6890 (marca Agilent) acoplado ao detector seletivo de massas (DSM) modelo 5973 (marca Agilent), com ionização por impacto eletrônico.

As condições de análise por CGAR utilizadas foram: injeção de 1 μL da amostra sem divisão de fluxo, com abertura da válvula de divisão de fluxo por 0,8 min; temperatura do injetor: 250°C; coluna capilar: DB-WAX (Carbowax) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de fase (J&W Scientifics); programação de temperatura do forno: 40°C por 5 min, 4°C min^{-1} até 230°C. O solvente utilizado na extração dos compostos orgânicos foi o diclorometano (Sigma-Aldrich).

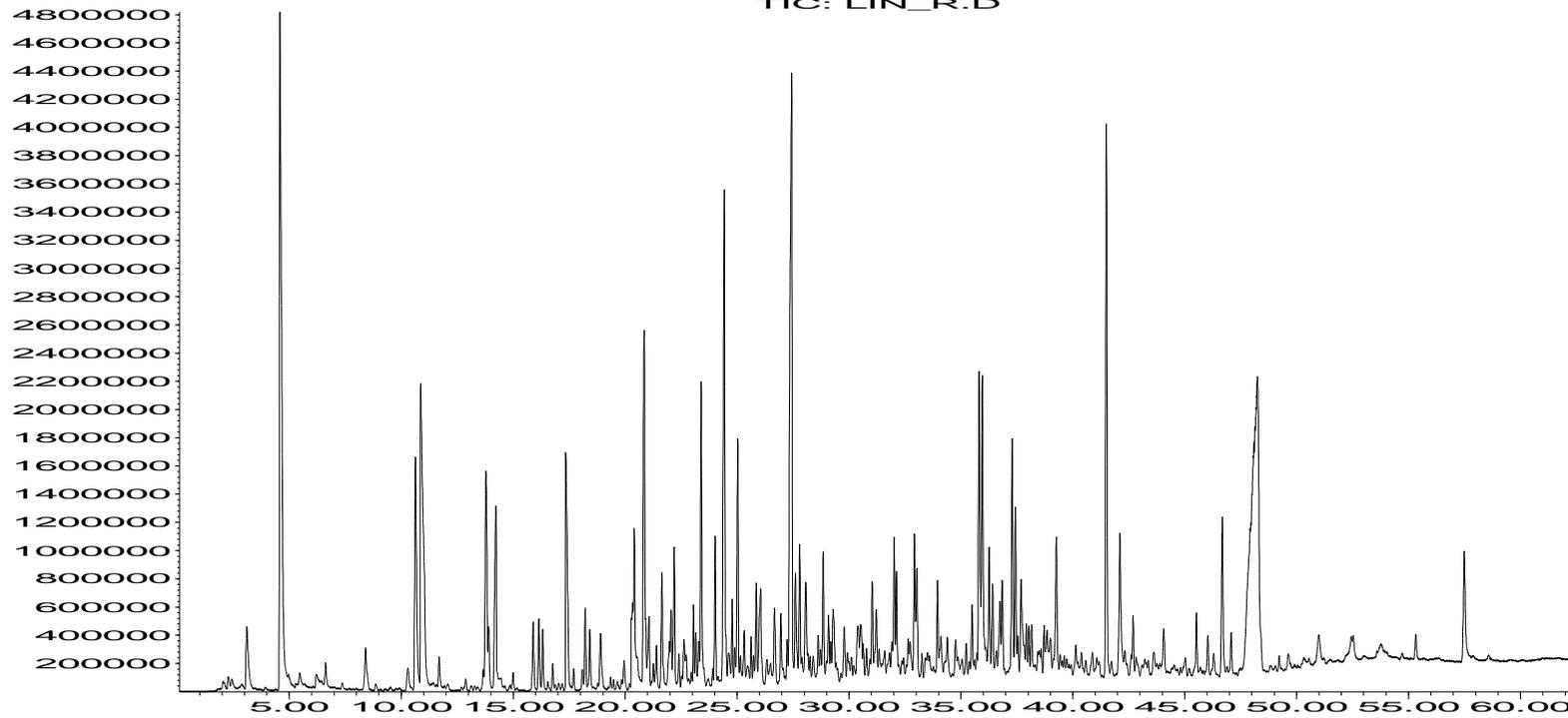
Abundance

TIC: LIN.D



Abundance

TIC: LIN_R.D



Time-->

