

NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO EM SITUAÇÕES CRÍTICAS DE
SUBSTRATO

Sandra Maria de Souza Cao

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): João Paulo Bassin

Márcia Walquíria de Carvalho

Dezotti

Rio de Janeiro

Maio de 2018

NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO EM SITUAÇÕES CRÍTICAS DE
SUBSTRATO

Sandra Maria de Souza Cao

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. João Paulo Bassin, D.Sc.

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

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

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

Prof. Hugo Moreira Soares, PhD.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MAIO DE 2018

Cao, Sandra Maria de Souza

Nitrificação e desnitrificação em situações críticas de substrato/ Sandra Maria de Souza Cao. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XVIII, 150 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: João Paulo Bassin

Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2018.

Referências Bibliográficas: p.143-150.

1. Nitrificação. 2. Desnitrificação. 3. MBBR. 4. Relação DQO/N. 5. Amônio 6. Nitrato. I Bassin, João Paulo *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*“Conhece-Te,
Aceita-Te
E Supera-Te!”
Santo Agostinho*

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me sustentado até aqui. Seus planos para mim são muito melhores do que eu poderia imaginar. Obrigada pelo Seu infinito amor.

Agradeço aos meus pais, Santo e Lea, que são meus alicerces, meus exemplos de vida e humildade. Mesmo com todas as dificuldades, me incentivaram na busca pelo conhecimento e acreditaram na minha capacidade. A minha irmã Claudia, pelo carinho, conselhos, pensamentos positivos e pelos cuidados aos nossos pais na minha ausência. Ao Irwin, meu companheiro de todos os momentos, pelo incentivo e apoio irrestrito ao longo desses quatro anos de doutorado. Essas pessoas são essenciais na minha vida, todos ligados pelo mesmo sentimento: o Amor.

Serei eternamente grata aos meus orientadores João Paulo Bassin e Marcia Dezotti.

Professor João Paulo, obrigada pela sua dedicação, paciência e competência. Agradeço por suas críticas construtivas, discussões e reflexões acerca da pesquisa desenvolvida, fundamentais para conclusão do trabalho. Também te agradeço por sua nobre contribuição no meu crescimento como pesquisadora, sempre me incentivando a questionar e melhorar a cada dia, desde o mestrado.

Professora Márcia Dezotti, obrigada por toda competência, dedicação e conhecimentos transmitidos a mim. Obrigada pelas oportunidades oferecidas e por sempre se preocupar com o bem estar emocional dos seus orientandos, inspirando seus alunos a sempre buscar o melhor.

Agradeço aos meus queridos primos André e Isis, por terem dividido o lar nesses dois últimos anos, me proporcionando prazerosa companhia e momentos de muitas alegrias. Peço a Deus que ilumine o caminho de vocês.

Agradeço a toda minha Família, tios, tias, primos e minhas avós (*in memoriam*). Também agradeço minha família aqui do Rio de Janeiro, Janete, Álvaro e Desirée que sempre me acolheram com carinho e amor.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LABPOL: Natália, Gustavo, Maurício, Paula, Ana Paula, Diego, Francine, Dora, Morgana, Bianca, André, Barbara, Isabelle, pelo companheirismo ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos meus amigos e colegas do INPI: Elisete, Cleiton, Flavia, Alex, Grazi, Gerlaine, Ricardo, Nichele, Jack e aos companheiros da DINOR pelo apoio na reta final do trabalho.

Agradeço aos meus queridos amigos Ligia, João Vitor, Aiany, Elber, Alana, Gustavo, Paola e Ana Paola por todos os momentos compartilhados. Tenho muita admiração e carinho por vocês.

Agradeço as minhas amigas de João Neiva, Bruna e Eugênia, por todo carinho e amor, e também por terem me concedido a honra de ter lindos afilhados César e Maria Clara. Que Deus sempre os abençoe.

Agradeço a toda equipe de funcionários do PEQ/COPPE/UFRJ pelo suporte concedido.

À CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram e me apoiaram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

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

NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO EM SITUAÇÕES CRÍTICAS DE SUBSTRATO

Sandra Maria de Souza Cao

Maio/2018

Orientadores: João Paulo Bassin

Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Programa: Engenharia Química

Esse trabalho avaliou o efeito de longos períodos com disponibilidade limitada de substrato (amônio) e oxigênio no processo nitrificante e o desempenho de um sistema desnitrificante submetido a altas cargas de nitrato, em reatores de leito móvel com biofilme (MBBR). Dois reatores nitrificantes foram operados em paralelo e submetidos a diferentes condições experimentais de limitação de amônio e oxigênio. Rápida recuperação da eficiência de remoção amônio foi observada após os sucessivos períodos de perturbação. No entanto, a ausência de oxigênio ocasionou efeito mais drástico na nitrificação quando comparada à limitação de amônio. A atividade nitrificante decaiu gradualmente após os períodos contínuos de limitação de amônio e de oxigênio até atingir um valor mínimo constante, revelando a capacidade do consórcio microbiano imobilizado em manter uma atividade mínima. O estudo envolvendo o processo de desnitrificação demonstrou que o sistema MBBR submetido a elevadas cargas de nitrato ($2,6 \text{ kgNO}_3\text{-N}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$) foi capaz de atingir completa desnitrificação, particularmente em relações DQO/N superior a 6. No entanto, para menores relações DQO/N, ocorreu acúmulo de nitrito e possível inibição, principalmente em condições de maior carga nitrogenada afluente. A taxa específica desnitrificante foi proporcional à carga de nitrato afluente, chegando a $60 \text{ mgNO}_3\text{-N}/(\text{gSAV}\cdot\text{h})$.

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

NITRIFICATION AND DENITRIFICATION IN CRITICAL SITUATIONS
SUBSTRATE

Sandra Maria de Souza Cao

May/2018

Advisors: João Paulo Bassin

Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Department: Chemical Engineering

This work evaluated the effect of long periods with limited availability of substrate (ammonium) and oxygen in the nitrification process and the performance of a denitrifying system subjected to high nitrate loading in moving bed biofilm reactors (MBBR). Two nitrification reactors were operated in parallel and have undergone different ammonium and oxygen limiting conditions. Fast recovery of ammonium removal efficiency was observed after the successive disturbing periods. However, the absence of oxygen caused a more drastic effect in the nitrification process as compared to the ammonium limitation. Nitrifying activity gradually decreased after the continuous ammonium and oxygen limitation periods until reaching a constant minimum value, revealing the capacity of the biofilm microbial consortium in sustaining a minimum nitrifying activity. The study involving the denitrification process demonstrated that the MBBR system subjected to elevated nitrate loads ($2.6 \text{ kgNO}_3\text{-N}/(\text{m}^3/\text{d})$) was capable of reaching complete denitrification, particularly under COD/N ratios above 6. Conversely, for lower COD/N ratio, nitrite accumulation and possible inhibition took place, especially at higher influent nitrogen loading rates. The specific denitrifying activity was proportional to the influent nitrate load, reaching up to $60 \text{ mgNO}_3\text{-N}/(\text{gSAV}\cdot\text{h})$.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância da remoção de nitrogênio	1
1.2 Efeito de longos períodos com disponibilidade limitada de substrato e oxigênio no processo nitrificante.....	3
1.3 Avaliação do desempenho de um reator desnitrificante submetido a altas cargas de nitrato.....	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo Geral	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1 Nitrogênio.....	9
3.2 Presença de nitrogênio em águas residuárias	12
3.3 Processo de remoção biológica de nitrogênio	13
3.3.1 Nitrificação	14
3.3.1.1 pH.....	17
3.3.1.2 Temperatura.....	18
3.3.1.3 Oxigênio Dissolvido.....	19
3.3.1.4 Concentração de Substrato	20
3.3.1.5 Competição entre bactérias nitrificantes e bactérias heterotróficas.....	23
3.3.2 Desnitrificação.....	23
3.3.2.1 Relação DQO/N.....	26
3.3.2.2 Fonte de Carbono	28
3.3.2.3 pH e temperatura	28
3.3.2.4 Oxigênio Dissolvido.....	29
3.3.2.5 Inibição pelo substrato.....	30
3.4 Cinética de Crescimento Celular	30
3.4.1 Cinética de nitrificação.....	32
3.4.2 Cinética de desnitrificação	34
3.5 Crescimento suspenso e aderido de bactérias.....	36
3.5.1 Biofilme.....	36
3.6 Biorreatores contendo biomassa imobilizada em meio suporte	38

4. EFEITO DE LONGOS PERÍODOS COM DISPONIBILIDADE LIMITADA DE SUBSTRATO E OXIGÊNIO NO PROCESSO NITRIFICANTE	43
4.1 Introdução.....	43
4.2 Material e Métodos.....	47
4.2.1 Sistema operacional: configuração e condições operacionais.....	47
4.2.2 Ensaios de longos períodos com limitação de amônio e oxigênio e avaliação da atividade nitrificante	50
4.2.3 Determinação do coeficiente de decaimento das nitrificantes.....	54
4.2.4 Sólidos Aderidos Voláteis e Totais	55
4.2.5 Métodos analíticos.....	56
4.3 Resultados.....	57
4.3.1 Operação contínua dos sistemas MBBR: remoção de matéria orgânica e perfil de sólidos suspensos e imobilizados	57
4.3.2 Remoção de amônio	61
4.3.3 Taxa específica nitrificante e coeficiente de decaimento em condições de limitação de amônio	68
4.3.4 Taxa específica nitrificante e o coeficiente de decaimento sob limitação de oxigênio	73
4.4 Discussão.....	78
4.4.1 Potencial de nitrificação em reatores MBBR após períodos de limitação de amônio e oxigênio	78
4.5 Conclusões parciais	86
5. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM REATOR DE LEITO MÓVEL COM BIOFILME (MBBR) DESNITRIFICANTE SUBMETIDO ÀS ALTAS CARGAS DE NITRATO.....	87
5.1 Introdução.....	87
5.2 Materiais e Métodos	92
5.2.1 Configuração do reator biológico desnitrificante	92
5.2.2 Avaliação das condições experimentais	94
5.2.3 Testes em batelada para determinação da cinética da desnitrificação.....	97
5.2.4 Testes em batelada adicionais.....	99
5.2.5 Determinação da mínima relação DQO/N para desnitrificação	100
5.2.6 Avaliação dos gases intermediários gerados na desnitrificação.....	101

5.2.7 Métodos analíticos.....	102
5.3 Resultados.....	103
5.3.1 Operação do reator desnitrificante: perfis de DQO, nitrato/nitrito e ácido nitroso	103
5.3.2 Avaliação da remoção simultânea de DQO e nitrato	110
5.3.3 Dinâmica dos sólidos ao longo dos regimes operação	113
5.3.4 Avaliação da taxa específica desnitrificante.....	117
5.4 Discussão.....	122
5.4.1 Efeito da relação DQO/N na desnitrificação e no crescimento bacteriano	122
5.4.2 Efeito da carga orgânica na dinâmica dos sólidos suspensos e aderidos	128
5.4.3 Efeito da carga nitrogenada aplicada na desnitrificação e na taxa desnitrificante	130
5.4.4 Taxa desnitrificante das frações de biomassa suspensa e aderida e sua importância para a desnitrificação.....	133
5.4.5 Efeito da desnitrificação no pH	134
5.5 Conclusões parciais	136
6. CONCLUSÕES	137
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	142
8. REFERÊNCIAS	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.: Representação esquemática das principais conversões biológicas envolvidas no ciclo do nitrogênio.....	11
Figura 3.2.: Processos de nitrificação e desnitrificação. As características de cada um deles e os requerimentos de oxigênio, alcalinidade e carbono orgânico de cada etapa estão igualmente representados (Adaptado de METCALF & EDDY, 2016).	14
Figura 3.3.: Relação de inibição dos organismos nitrificadores com a amônia livre e o ácido nitroso. Zona 1 – Inibição de <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i> por NH_3 . Zona 2 – Inibição de <i>Nitrobacter</i> por NH_3 . Zona 3 – Nitrificação completa. Zona 4 – Inibição de <i>Nitrobacter</i> por HNO_2 (adaptado de ANTHONISEN <i>et al.</i> , 1976).	22
Figura 3.4.: Taxa específica de crescimento em função da concentração de substrato, conforme representado pela Equação de Monod. Os seguintes parâmetros estão representados: $\mu_{\text{máx}}$ e K_s	32
Figura 3.5.: Funcionamento do MBBR (adaptado RUSTEN <i>et al.</i> , 2006).....	40
Figura 4.1.: Representação esquemática dos reatores MBBR_1 e MBBR_2 operados em paralelo. As condições de alimentação, descritas doravante no item 3.3.2, estão ilustradas no lado esquerdo do esquema, conforme segue: (a) Alimentação contínua de amônio e matéria orgânica (expressa na forma de DQO); (b) Alimentação contínua de amônio sem o aporte de DQO afluente; (c) limitação de amônio com aporte de DQO afluente; (d) limitação de amônio sem o aporte de DQO afluente. Ar comprimido ou nitrogênio gasoso foram insuflados de acordo com o regime operacional (item 4.2.2). 48	
Figura 4.2.: Ensaio do teste de taxa específica de bactérias nitrificantes realizados durante os períodos de limitação de amônio ou oxigênio.....	53
Figura 4.3.: DQO afluente (\diamond), DQO efluente (\blacklozenge) e eficiência de remoção de DQO (\bullet) no MBBR_1 . Os intervalos destacados em cinza indicam os períodos nos quais o reator foi submetido à disponibilidade limitada de amônio (1, 2, 3 e 4) ou oxigênio (5 e 6). Nos testes 4 e 5 não houve adição de DQO ao meio de alimentação.....	58
Figura 4.4.: DQO afluente (\diamond), DQO efluente (\blacklozenge) e eficiência de remoção de DQO (\bullet) no MBBR_2 . Os intervalos destacados em cinza indicam os períodos nos quais o reator foi submetido à disponibilidade limitada de amônio (1, 2, 3 e 4) ou oxigênio (5 e 6). Não houve adição de fonte de carbono orgânico ao afluente durante os testes 4 e 5.....	58

Figura 4.5.: Concentração média de sólidos aderidos voláteis (SAV) e sólidos suspensos voláteis (SSV) nos reatores MBBR ₁ e MBBR ₂ . Os valores apresentam uma média dos resultados obtidos nos períodos operacionais com presença e ausência de matéria orgânica.	60
Figura 4.6.: NH ₄ ⁺ -N afluente (◇), NH ₄ ⁺ -N efluente (◆) e eficiência de remoção de NH ₄ ⁺ -N (●) no MBBR ₁ . Os intervalos destacados em cinza indicam os períodos durante os quais o reator foi submetido à disponibilidade limitada de amônio (1, 2, 3 e 4) e oxigênio (5 e 6).....	62
Figura 4.7.: NH ₄ ⁺ -N afluente (◇), NH ₄ ⁺ -N efluente (◆) e eficiência de remoção de NH ₄ ⁺ -N (●) no MBBR ₂ . Os intervalos destacados em cinza indicam os períodos durante os quais o reator foi submetido à disponibilidade limitada de amônio (1, 2, 3 e 4) e oxigênio (5 e 6).....	62
Figura 4.8.: Compostos nitrogenados na corrente de saída ao longo da operação dos reatores em condições normais de operação (C.N.) e nos testes 1 – 6 (a) MBBR ₁ e (b) MBBR ₂	68
Figura 4.9.: Taxa específica nitrificante monitorada ao longo dos testes de 25 dias com limitação contínua (MBBR ₁) e intermitente de amônio (MBBR ₂). (a) MBBR ₁ – Teste 3 (com DQO); (b) MBBR ₂ – Teste 3 (com DQO); (c) MBBR ₁ – Teste 4 (sem DQO) e (d) MBBR ₂ – Teste 4 (sem DQO).....	69
Figura 4.10.: Redução da atividade nitrificante ao longo de 25 dias contínuos de limitação de substrato (amônio) no MBBR ₁ com (◆) e sem (●) a presença de DQO no afluente.	71
Figura 4.11.: Taxa específica nitrificante monitorada ao longo dos testes de 25 dias com limitação contínua e intermitente de oxigênio dissolvido (a) MBBR ₁ – teste 5 – limitação contínua sem DQO afluente; (b) MBBR ₂ – Teste 5 – limitação intermitente sem DQO afluente; (c) MBBR ₁ – Teste 6 – limitação contínua com DQO afluente e (d) MBBR ₂ – Teste 6 – limitação intermitente com DQO afluente.....	74
Figura 4.12.: Redução da atividade nitrificante ao longo de 25 dias contínuos de limitação de substrato (oxigênio) no reator MBBR ₁ com (◆) e sem a presença de DQO externa (●).	77
Figura 5.1.: Representação esquemática do sistema MBBR de escala laboratorial operado em condições anóxicas.	92

Figura 5.2.: Representação esquemática das condições experimentais empregadas ao longo dos regimes de operação. Os valores atribuídos às concentrações de nitrato e DQO foram arredondados para efeitos de apresentação. As cargas orgânica e nitrogenada em cada regime estão descritas na Tabela 5.4.	96
Figura 5.3.: Valores experimentais da relação DQO/N-NO ₃ durante operação do sistema MBBR desnitrificante.	104
Figura 5.4.: (a) DQO afluyente (◇) e efluente (◆) ao longo dos 11 regimes de operacionais e (b) valores médios de DQO na entrada e saída do sistema e a eficiência de remoção de DQO em cada condição de operação.	106
Figura 5.5.: Concentração das espécies nitrogenadas ao longo dos 11 regimes operacionais: nitrato afluyente (◇), nitrato (◆) e nitrito (●) efluente, (b) média das espécies nitrogenadas na entrada (NO ₃) e saída (NO ₃ e NO ₂).	107
Figura 5.6.: Perfil do pH de saída durante os regimes operacionais.	109
Figura 5.7.: Carga de DQO removida versus carga nitrogenada removida (a) nos regimes 1 – 3 e 5 – 9. Foram desconsiderados os dados do regime 4 (inibição por nitrito) e 10 e 11 (DQO/N superior a 20).	111
Figura 5.8.: Percentual de matéria orgânica removida pela reação de desnitrificação e por vias alternativas. A relação DQO/N está mostrada acima dos pontos experimentais.	113
Figura 5.9.: Sólidos aderidos voláteis (SAV) e sólidos suspensos voláteis (SSV) ao longo da operação do reator. A carga orgânica aplicada e a percentagem de SSV em relação ao total de sólidos voláteis (razão SSV/SAV+SSV) em cada condição operacional também estão indicadas no eixo secundário.	114
Figura 5.10.: Relação entre a concentração de sólidos aderidos voláteis (SAV) e sólidos suspensos voláteis (SSV) e a carga orgânica aplicada.	115
Figura 5.11.: Taxa específica desnitrificante ao longo dos regimes operacionais de 1-9 (barras). A carga nitrogenada aplicada (◆) também está ilustrada no gráfico.	118
Figura 5.12.: Contribuição dos sólidos suspensos e aderidos na desnitrificação em diferentes regimes de operação. Os números dentro das barras indicam o percentual de contribuição de cada fração de biomassa. A carga orgânica aplicada está mostrada acima dos pontos experimentais, assim como a fração de SSV em cada regime operacional.	120

Figura 5.13.: Taxa específica desnitrificante das diferentes frações de biomassa do reator ao longo dos regimes operacionais 2 a 9.....	122
Figura 5.14.: Regimes operacionais nos quais se observou remoção completa de nitrogênio. O regime 6 está destacado por ser aquele no qual a relação DQO/N esteve próxima da mínima necessária para completa conversão de nitrato.	124
Figura 5.15.: Regimes operacionais com remoção parcial de nitrogênio.....	125
Figura 5.16.: (a) Relação da concentração de sólidos voláteis totais (SVT) e (b) a fração dos sólidos suspensos totais (SSV) em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao sistema desnitrificante.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.: Compostos intermediários do ciclo do nitrogênio (STEIN&KLOTZ, 2016).	10
Tabela 3.2.: Constantes usadas na taxas de reação do processo nitrificante. Os valores dos parâmetros são válidos para a temperatura de 20°C (HENZE <i>et al.</i> , 1997).....	16
Tabela 3.3.: Trabalhos que avaliaram o desempenho de reatores MBBRs em diversas condições operacionais.....	42
Tabela 4.1.: Composição do efluente sintético utilizado para a alimentação dos sistemas MBBR.....	49
Tabela 4.2.: Composição da solução de micronutrientes suplementada ao efluente sintético.....	50
Tabela 4.3.: Testes realizados em diversas condições quanto à disponibilidade de amônio e oxigênio.	52
Tabela 4.4.: Taxa específica nitrificante ao longo dos testes de 25 dias com limitação contínua (MBBR ₁) e intermitente de amônio (MBBR ₂)	70
Tabela 4.5.: Taxa específica nitrificante ao longo dos testes de 25 dias com limitação contínua (MBBR ₁) e intermitente (MBBR ₂) de oxigênio.	75
Tabela 4.6.: Coeficiente de decaimento celular em diversas condições experimentais .	84
Tabela 5.1.: Trabalhos que avaliaram a desnitrificação em reatores submetidos à alta carga de nitrato.	90
Tabela 5.2.: Composição do efluente sintético.....	94
Tabela 5.3.: Composição da solução de micronutrientes suplementada ao efluente sintético.....	94
Tabela 5.4.: Condições experimentais ao longo da operação do reator desnitrificante..	96
Tabela 5.5.: Cargas volumétricas de desnitrificação obtidas com as diferentes frações de biomassa (suspensa e aderida) para os regimes 2 a 9.	119
Tabela 5.6.: Taxa específica desnitrificante para as frações de biomassas suspensa e aderida ao longo dos regimes operacionais de 1 a 9.....	121
Tabela 5.7.: Taxa específica desnitrificante e sua relação com a concentração inicial de nitrato, carga de nitrato, relação DQO/N, fonte de carbono utilizada e tipo de reator empregado.	132

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μ	Taxa específica de crescimento celular (g células/g células. d)
ba	Coefficiente de decaimento celular (d^{-1})
C.N	Condições Normais de Alimentação
C.O.	Com oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
DQO/N	Razão demanda química de oxigênio/nitrogênio
HNO ₂	Ácido Nitroso
K _s	Coefficiente de meia-saturação ou meia-velocidade
L.A.	Limitação de Amônio
MBBR	Reator de leito móvel com biofilme
NH ₃	Amônia Livre
NH ₄ ⁺ -N	Nitrogênio amoniacal
NO ₂ -N	Nitrogênio-nitrito
NO ₃ -N	Nitrogênio-nitrato
N _{org} -N	Nitrogênio orgânico
NO _x -N	NO ₂ -N + NO ₃ -N
OD	Oxigênio dissolvido
Q	Vazão
R _s	Taxa de utilização de substrato no reator (g/L.d)
S	Concentração de substrato (g/L)
S.O.	Sem oxigênio
SAT	Sólidos aderidos totais
SAV	Sólidos aderidos voláteis
SF	Sólidos fixos

SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
X	Concentração de bactérias (gSSV/L)
Y	Coefficiente de rendimento celular

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância da remoção de nitrogênio

Durante muitos anos, o foco principal do tratamento de águas residuárias de procedência doméstica ou industrial foi a remoção de matéria orgânica. De fato, compostos orgânicos são grandes poluidores dos corpos d'água, uma vez que acarretam o consumo de oxigênio dissolvido, diminuindo a qualidade do corpo receptor. No entanto, outros poluentes, tais como os nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, podem acentuar ainda mais a poluição, causando, por exemplo, o fenômeno de eutrofização das águas.

A eutrofização, principal impacto da disponibilidade excessiva de nutrientes em ecossistemas aquáticos, é caracterizada pelo crescimento acelerado de vegetação aquática e do fito plâncton. Este fenômeno causa a deterioração da qualidade da água do corpo receptor, tornando-o turvo e modificando sua cor para verde, amarelo, marrom ou vermelho, dependendo da espécie fito planctônica prevalecente. Isso leva à perda de valor de muitos ambientes aquáticos, os quais poderiam ser usados para recreação, pesca, entre outros fins. Adicionalmente, o tratamento dessa água para fins de potabilidade se torna mais extenso e oneroso.

O impacto indireto da elevada disponibilidade de nutrientes se refere à competição por oxigênio dissolvido, limitado nesses ambientes, podendo levar à morte de muitos organismos aquáticos. Além disso, a necessidade de oxigênio é aumentada em virtude da degradação da matéria orgânica em decomposição. A baixa disponibilidade de oxigênio ocasiona a morte de grande parte da vida aquática presente

no corpo receptor. Desta forma, a remoção dos nutrientes de efluentes previamente ao seu descarte torna-se muito importante, tema esse que vem ganhando cada vez mais destaque nos últimos anos.

No Brasil, a Resolução CONAMA Nº. 430 estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, e fixa um limite máximo de emissão de nitrogênio amoniacal de 20 mgNH₄-N/L. Porém, essa resolução não se preocupa em limitar a emissão de outras formas de nitrogênio, como por exemplo, nitrito e nitrato, que também apresentam grande potencial poluidor no ambiente. Desse modo, a maioria dos sistemas de tratamento empregados no país foi projetada unicamente para contemplar a remoção de amônio.

Diante da necessidade de remoção completa de nitrogênio e não apenas a conversão de uma em outra forma nitrogenada, várias tecnologias para remoção deste nutriente foram desenvolvidas, tanto por vias biológicas quanto por vias físico-químicas. Em virtude das vantagens operacionais e dos menores custos envolvidos no tratamento biológico, o mesmo ganhou maior visibilidade em comparação aos processos de outra natureza.

A remoção biológica de nitrogênio de efluentes municipais e industriais pela rota tradicional, ou seja, pela nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica, tornou-se a principal forma de tratamento durante as últimas décadas. A remoção por estas vias consiste na conversão aeróbia do amônio a nitrato (nitrificação autotrófica), seguida da conversão anóxica de nitrato em nitrogênio gasoso na presença de matéria orgânica (desnitrificação heterotrófica).

Apesar da sua simplicidade de aplicação e menores custos operacionais quando comparado a processos de outra natureza, a remoção biológica convencional de nitrogênio ainda apresenta problemas que impedem seu pleno desempenho, incentivando a realização de estudos no intuito de investigar algumas condições específicas. Um dos temas pouco discutido na literatura e objeto de estudo dessa pesquisa é como o processo de nitrificação se comporta quando submetido a longos períodos com disponibilidade limitada de substrato e oxigênio, particularmente em sistema com biofilme. Além disso, este trabalho procura responder como um sistema desnitrificante com biomassa imobilizada responde a altas cargas de nitrato e diversas relações DQO/N, de modo a contemplar diferentes condições de carga orgânica e nitrogenada. Essa pesquisa apresenta grande relevância, pois as informações a respeito da desnitrificação ainda são escassas quando comparadas com as da nitrificação, sobretudo em condições de alta carga de nitrato e sistemas com lodo imobilizado. Esses tópicos estão apresentados a seguir.

1.2 Efeito de longos períodos com disponibilidade limitada de substrato e oxigênio no processo nitrificante

A nitrificação é um processo bastante sensível às condições ambientais. Muitos estudos foram realizados no intuito de observar o efeito de alguns parâmetros, tais como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, concentração de substratos (amônio e nitrito), carga orgânica, tempo de retenção celular e presença de compostos inibidores (SHARMA & AHLERT, 1977; HANAKI *et al.*, 1990; HENZE *et al.*, 1997; MAYER *et al.*, 2009). No entanto, informações acerca de como o processo de nitrificação se

comporta em condições de limitação de substrato (amônio) e oxigênio são escassas, sobretudo em sistemas com biomassa imobilizada. Tais situações são comumente encontradas em estações de tratamento de esgoto que sofrem influência das águas pluviais, responsáveis pela diluição da carga nitrogenada afluyente. Adicionalmente, variação nas condições de aeração devido a problemas operacionais e/ou paradas programadas podem ser comuns em estações de tratamento de águas residuárias. As condições supramencionadas fazem com que o consórcio microbiano nitrificante seja submetido a cargas de substrato nitrogenado e oxigênio bastante distintas, que podem variar de elevadas a nulas. Tal oscilação pode afetar a sua atividade, e, conseqüentemente, o potencial de nitrificação da estação de tratamento de efluentes domésticos ou industriais.

Assim, compreender como o consórcio nitrificante responde a condições de escassez de substrato e oxigênio é de grande relevância para o processo de remoção de amônio. A literatura apresenta alguns trabalhos que investigaram esse tema. Porém, a maioria dos estudos foi realizada em sistemas com biomassa em suspensão. Convém, portanto, averiguar como reatores com biomassa aderida respondem a essas condições particulares. Em vista disso, o Capítulo 4 descreve o comportamento da nitrificação diante de variações da disponibilidade de amônio e oxigênio durante curtos e longos intervalos de tempo. Para tanto, dois sistemas de leito móvel com biofilme (MBBR) foram operados em paralelo de modo a estabelecer diferentes condições operacionais e compreender seus efeitos na biota nitrificante.

1.3 Avaliação do desempenho de um reator desnitrificante submetido a altas cargas de nitrato

Dentre os processos de remoção biológica de nitrogênio, a nitrificação sempre foi a etapa mais estudada em virtude das consequências causadas pelo aporte de nitrogênio amoniacal nos corpos d'água. Além disso, esse processo é altamente sensível a perturbações externas, o que motivou uma série de estudos que investigaram o efeito de diversas condições ambientais no desempenho do mesmo.

Apesar da importância da nitrificação, a etapa complementar da remoção biológica de nitrogênio convencional, isto é, a desnitrificação, também é de suma importância para mitigar os efeitos da disponibilidade excessiva de nitrogênio nos ecossistemas. O nitrato favorece o crescimento de algas para níveis prejudiciais ao corpo receptor e é também nocivo à saúde humana, causando diversas doenças.

Geralmente, a desnitrificação biológica é usada para remover nitrato de efluentes com concentrações relativamente baixas desse substrato nitrogenado (10 – 200 mgNO₃-N/L) provenientes principalmente de esgoto doméstico e/ou efluentes indústrias (GLASS & SILVERSTEIN, 1998). No entanto, algumas indústrias são responsáveis pela produção de efluentes com altas concentrações de nitrato, a qual pode chegar a concentrações de 10.000 mgNO₃-N/L (NAIR & SOUZA, 2012), dependendo do processo produtivo. Essas altas concentrações podem causar inibição das bactérias desnitrificantes heterotróficas, diminuindo a eficiência global de remoção de nitrogênio (GLASS & SILVERSTEIN, 1998). A literatura contempla algumas soluções para essa problemática, sugerindo, por exemplo, a adaptação do consórcio microbiano a condições extremas de aporte de substrato. Porém, os estudos foram feitos

majoritariamente em reatores com lodo em suspensão, sendo a quantidade de estudos acerca de reatores com biomassa aderida escassa. Dessa maneira, o capítulo 5 aborda essa temática, descrevendo o estudo realizado utilizando o reator de leito móvel com biofilme (MBBR) para o tratamento de efluente contendo elevadas concentrações de nitrato e submetido a diferentes relações DQO/N.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Esta tese teve como principal objetivo investigar algumas questões ainda não totalmente elucidadas no que diz respeito aos processos tradicionais que integram a remoção biológica de nitrogênio. O primeiro estudo teve como principal objetivo avaliar como a atividade nitrificante é afetada diante de variações da disponibilidade de amônio e oxigênio (com e sem limitação dos mesmos). Para melhor compreender o efeito das variáveis analisadas, dois sistemas de leito móvel com biofilme (MBBR) foram operados em paralelo de modo a estabelecer diferentes condições operacionais.

O segundo tópico investigado está relacionado à avaliação do desempenho de um reator desnitrificante, com biomassa aderida, submetido a altas cargas de nitrato. Além disso, a atividade das diversas frações de biomassa ativa que compõem o sistema (aderida e suspensa) é outro ponto investigado nessa pesquisa.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a remoção do nitrogênio amoniacal durante sucessivos testes de limitação de amônio ou oxigênio com biomassa aclimatada na presença ou na ausência de matéria orgânica externa em sistema MBBR;
- Avaliar o comportamento da atividade bacteriana nitrificante durante os testes de limitação de amônio e oxigênio;
- Determinar o coeficiente de decaimento microbiano durante os testes de limitação de amônio e oxigênio;

- Avaliar o desempenho de um sistema MBBR desnitrificante frente ao aumento ou diminuição da carga orgânica e nitrogenada em condições DQO/N pré-estabelecidas;
- Determinar a atividade das frações de biomassa suspensa e aderida em diversas cargas orgânicas e nitrogenadas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento fundamental presente nos seres vivos, sendo um componente essencial das proteínas, DNA e RNA. Sua grande importância no contexto biológico tem sugerido que esse elemento pode ser a melhor evidência da presença de vida em outros planetas (CAPONE *et al.*, 2006).

O nitrogênio existe na natureza sob diversas formas, podendo ser orgânico ou inorgânico, e apresentar diferentes estados de oxidação. Este elemento pertence ao grupo 5B da tabela periódica e apresenta variação do número de oxidação de -3 a +5. Em seus diversos estados de oxidação, o átomo de nitrogênio pode combinar com átomos de hidrogênio, oxigênio ou outros átomos de nitrogênio. Embora algumas moléculas sejam termodinamicamente mais estáveis que outras, todas podem existir em fase aquosa (JETTEN *et al.*, 2009).

O intercâmbio do nitrogênio entre a atmosfera, a biosfera e a geosfera, em suas diferentes formas, é chamado de ciclo do nitrogênio. Neste ciclo, ocorrem cinco processos principais: fixação, amonificação, assimilação, nitrificação e desnitrificação. Micro-organismos, particularmente bactérias, tem um importante papel na transformação das formas nitrogenadas, modificando os diversos estados de oxidação do nitrogênio (HARRISON, 2003). Os compostos intermediários do ciclo do nitrogênio, representados por nove estados de oxidação, estão demonstrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1.: Compostos intermediários do ciclo do nitrogênio (STEIN&KLOTZ, 2016).

Composto	Fórmula	Estado de Oxidação
Nitrogênio Orgânico	R~NH ₂	
Amônio/ Amônia	NH ₄ ⁺ /NH ₃	-3
Hidrazina	N ₂ H _{4(aq)}	-2
Hidroxilamina	NH ₂ OH _(aq)	-1
Gás Nitrogênio	N _{2(g)}	0
Óxido Nitroso	N ₂ O _(g)	+1
Óxido Nítrico	NO _(g)	+2
Nitrito/ Ácido Nitroso	NO ₂ ⁻ / HNO ₂	+3
Dióxido de Nitrogênio	NO _{2(g)}	+4
Nitrato/ Ácido Nítrico	NO ₃ ⁻ / HNO ₃	+5

A Figura 3.1 apresenta as principais conversões biológicas do nitrogênio que fazem parte do ciclo desse elemento na natureza. No ciclo, o nitrogênio gasoso (N₂) é fixado por ação bacteriana ou algas e, posteriormente, será convertido em amônio (NH₄⁺). O amônio formado pela fixação ou produzido pela decomposição de compostos orgânicos nitrogenados pode ser oxidado a nitrito (NO₂⁻) e, subsequentemente, a nitrato (NO₃⁻) por bactérias nitrificantes ou então pode ser assimilado na síntese celular. O nitrato formado na nitrificação pode ser assimilado ou então pode ser reduzido a nitrito. O nitrito, por intermédio de bactérias desnitrificantes heterotróficas pode ser reduzido a nitrogênio gasoso, ou então pode ser usado como acceptor de elétrons na reação de oxidação anaeróbia do amônio (Anammox). A redução assimilatória de nitrato consiste na sua redução a amônio, no sentido inverso à nitrificação. Nesse caso, o amônio formado pode ser utilizado na síntese celular quando o mesmo não está disponível no meio, uma vez que alguns micro-organismos possuem preferência em usar amônio em detrimento ao nitrato como fonte de nitrogênio (METCALF & EDDY, 2016).

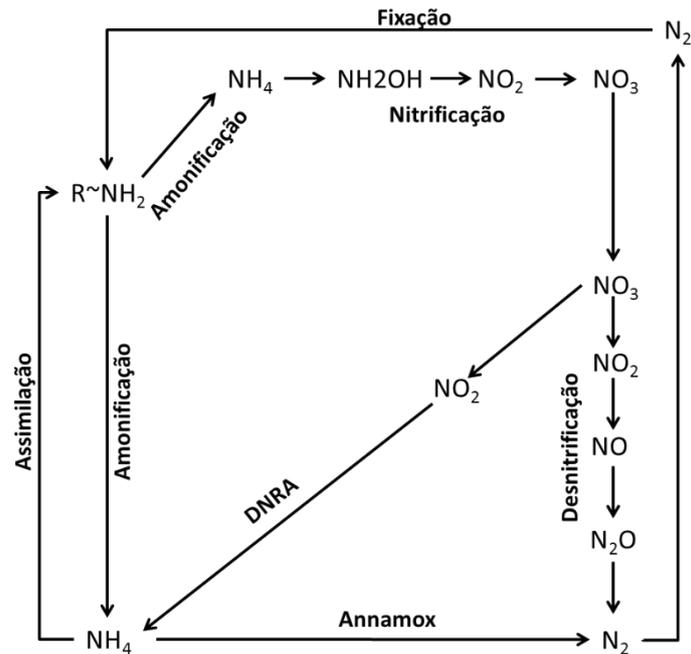


Figura 3.1.: Representação esquemática das principais conversões biológicas envolvidas no ciclo do nitrogênio.

A compreensão do ciclo do nitrogênio foi primeiramente utilizada para melhorar a eficiência de fertilizantes na agricultura. Nos anos 60, o processo de nitrificação e desnitrificação para a remoção de nutrientes de águas residuárias se tornou conhecido e largamente estudado. A partir da década de 80, foi constatada a contribuição dos óxidos de nitrogênio na atmosfera, causando a destruição da camada de ozônio e o aquecimento global. Assim, o papel da nitrificação e desnitrificação tornou-se novamente um foco impulsionado pela preocupação ambiental (JETTEN *et al.*, 2009).

Os últimos anos mostraram que o conhecimento acerca do ciclo do nitrogênio microbiano ainda é limitado. Descobertas como a oxidação anaeróbia do amônio (Anammox) (STROUS *et al.*, 1999), a oxidação de amônio por arqueas (Crenarchaea) (FRANCIS *et al.*, 2007), a interação entre esses dois grupos (LAM *et al.*, 2007) e a redução do nitrato a gás nitrogênio por organismos do filo Foraminifera (RISGAARD-

PETERSEN *et al.*, 2006) mostram a grande diversidade e capacidade metabólica da conversão de nitrogênio, que ainda são pouco conhecidas no mundo microbiológico.

3.2 Presença de nitrogênio em águas residuárias

Existem diversas fontes de nitrogênio nas águas naturais. Normalmente, o esgoto sanitário é a principal fonte desse elemento devido à considerável quantidade de proteínas e nitrogênio amoniacal fornecida pela hidrólise da ureia na água. Além disso, produtos usados para limpeza doméstica, tais como detergentes e amaciantes de roupas, constituem fontes importantes de nitrogênio (VON SPERLING, 1996). Alguns efluentes industriais também conferem considerável aporte de nitrogênio orgânico e amoniacal às águas, muitas vezes em maior intensidade do que a do esgoto doméstico. Algumas indústrias químicas que produzem efluentes com altas concentrações de nitrogênio são: petroquímicas, farmacêuticas, matadouros, siderúrgicas e indústrias de alimentos (METCALF & EDDY, 2016).

O nitrogênio se encontra nas águas residuárias principalmente na forma de nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal, nitrogênio nitrito e nitrogênio nitrato. As duas primeiras formas são as reduzidas e as demais correspondem às formas oxidadas. Nos rios, por exemplo, as etapas de degradação da poluição orgânica podem ser associadas à relação entre as formas de nitrogênio predominantes. Na zona de degradação, há presença de nitrogênio orgânico; na zona de decomposição ativa há nitrogênio amoniacal; na zona de recuperação nitrito é predominante e na zona de águas limpas o nitrato prevalece. Dessa forma, se for coletada uma amostra de água de um rio poluído e as análises indicarem a predominância das formas reduzidas, a fonte de

poluição se encontra próxima. Por outro lado, se prevalecerem o nitrito e o nitrato, as descargas de esgotos doméstico se encontram distantes (VON SPERLING, 1996).

O nitrogênio juntamente com o fósforo são macronutrientes para as células vivas do ambiente aquático. Quando despejados nas águas em grande quantidade, ocasionam o enriquecimento do meio, tornando-o eutrofizado. Este fenômeno possibilita o crescimento acelerado de algas, trazendo sérios prejuízos ao corpo receptor. Além de o nitrogênio servir como nutriente, os nitratos são compostos tóxicos e podem causar uma doença conhecida por metahemoglobinemia infantil, que é letal para as crianças. Neste caso, o nitrato é reduzido a nitrito na corrente sanguínea, competindo com o oxigênio livre, impedindo o transporte de oxigênio para os alvéolos pulmonares do bebê. Essa doença também é conhecida como Síndrome do Bebê Azul (EPA, 2007).

Diante dos problemas causados pelo aporte de nitrogênio nos corpos receptores, tornou-se essencial a sua eficiente remoção dos diversos efluentes, o que repercute na necessidade de estudos acerca desse tema. É sabido que nitrogênio pode ser removido de várias maneiras, como por exemplo, por processos físico-químicos ou processos biológicos. No entanto, os processos biológicos ganharam notoriedade no cenário mundial devido a sua efetividade e reduzidos custos operacionais (AHN, 2006).

3.3 Processo de remoção biológica de nitrogênio

O processo convencional de remoção biológica de nitrogênio consiste na principal forma de remover esse nutriente das águas residuárias. Em comparação com outras alternativas de remoção de nitrogênio, como por exemplo *stripping* de amônia ou

resinas de troca iônica, a remoção biológica de nitrogênio geralmente é mais econômica, e, portanto, é usada com mais frequência (METCALF & EDDY, 2016). O processo ocorre em duas etapas principais: nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica, que estão representadas na Figura 3.2 e descritas a seguir.

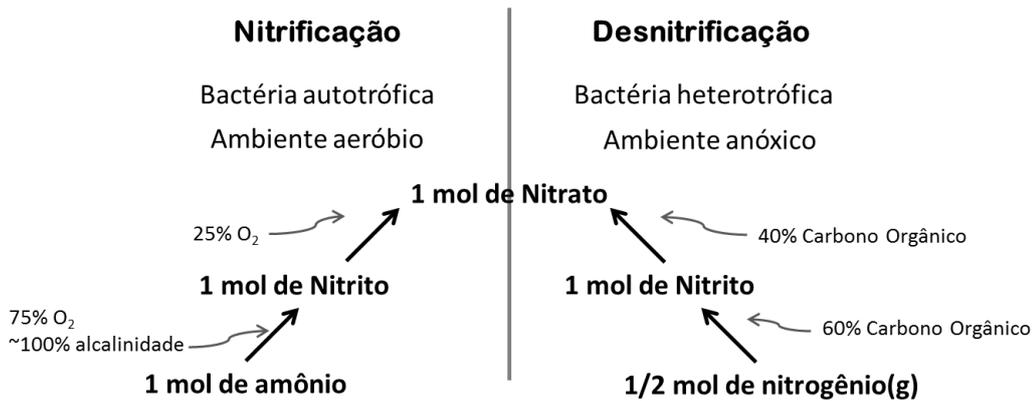
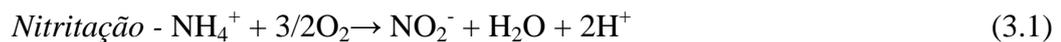


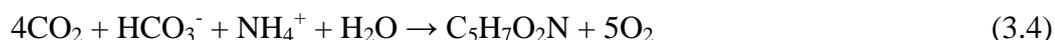
Figura 3.2.: Processos de nitrificação e desnitrificação. As características de cada um deles e os requerimentos de oxigênio, alcalinidade e carbono orgânico de cada etapa estão igualmente representados (Adaptado de METCALF & EDDY, 2016).

3.3.1 Nitrificação

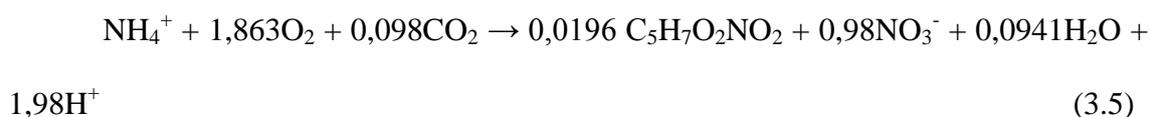
A nitrificação é mediada por bactérias autotróficas oxidadoras de amônio (NH₄⁺) e oxidadoras de nitrito (NO₂⁻) e ocorre em dois estágios sequenciais. No primeiro estágio, o nitrogênio amoniacal é oxidado a nitrito (Equação 3.1) e, na segunda etapa, o nitrito é oxidado a nitrato (Equação 3.2). A reação global é mostrada na Equação (3.3).



A reação de síntese de biomassa na nitrificação pode ser representada, conforme a Equação (3.4).



A reação global da síntese de biomassa (anabolismo) e a oxidação do amônio (catabolismo) pode ser descrita pela Equação (3.5).



Sendo $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{NO}_2$ a fórmula química que caracteriza a composição elementar das células bacterianas sintetizadas.

De acordo com a Equação (3.5) e a Figura 3.2, para cada grama de amônio oxidado (em termos de N), 4,57 g de oxigênio são utilizados (75% na etapa de nitrificação e 25% na etapa de nitratação), 0,16 g de novas células são formadas, 7,14 g de alcalinidade (como CaCO_3) são consumidas (100% na etapa de nitrificação) e 0,08 g de carbono inorgânico são requeridos para formação de novas células (METCALF & EDDY, 2016).

As bactérias autotróficas responsáveis pelo processo de nitrificação utilizam compostos inorgânicos, notadamente amônio e nitrito, para obtenção de energia, bem como assimilam carbono inorgânico como fonte de carbono na síntese celular. Essas bactérias são denominadas de bactérias oxidadoras de amônio (BOA) e bactérias oxidadoras de nitrito (BON). As BOA incluem bactérias do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, enquanto as BON incluem bactérias do gênero *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* e *Nitrospira*. A predominância desses organismos varia de acordo com as

condições operacionais (METCALF & EDDY, 2016). Os gêneros mais comuns para oxidação de amônio e nitrito são as bactérias do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente. A Tabela 3.2 apresenta algumas características relacionadas a essas bactérias que são usadas na determinação das taxas de reação da nitrificação (HENZE *et al.*, 1997).

Tabela 3.2.: Constantes usadas na taxas de reação do processo nitrificante. Os valores dos parâmetros são válidos para a temperatura de 20°C (HENZE *et al.*, 1997)

Constantes de taxa de reação	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrobacter</i>	Unidade
Taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$)	0,6-0,8	0,6-1,0	d ⁻¹
Constante de saturação (K_{S,NH_4})	0,3-0,7	0,8-1,2	g NH ₄ -N/m ³
Constante de saturação (K_{S,O_2})	0,5-1,0	0,5-1,5	g O ₂ /m ³
Coefficiente rendimento celular ($Y_{\text{máx}}$)	0,10-0,12	0,05-0,07	g SSV/g NH ₄ -N
Constante decaimento celular (b)	0,03-0,06	0,03-0,06	d ⁻¹

Os baixos valores referentes às taxas de reação e coeficiente de rendimento das bactérias nitrificantes é função da espécie de nitrogênio a ser oxidada, da concentração de oxigênio dissolvido e da coeficiente de decaimento endógeno. Na prática, a etapa limitante do processo geral de nitrificação é a oxidação do amônio. Isso significa que só ocorrerá acúmulo de nitrito caso o processo nitrificante não estiver no estado estacionário, por exemplo, em condições de cargas variáveis, durante a partida da planta ou na ocorrência de problemas operacionais (HENZE *et al.*, 1997).

Existem muitos fatores físicos, químicos e biológicos que podem afetar o crescimento ou o fornecimento de substrato, influenciando o desempenho das bactérias

nitrificantes. Os fatores mais significativos podem ser classificados em três categorias principais, conforme resumido por Chen *et al.* (2006). Vale mencionar que esses fatores se referem a sistemas com biomassa fixa.

1. A primeira categoria inclui aqueles fatores que afetam o processo bioquímico, como por exemplo, pH, temperatura e salinidade.

2. A segunda categoria inclui aqueles que afetam o fornecimento de nutrientes ao biofilme, como concentração de substrato, oxigênio dissolvido (DO) e regime de mistura.

3. A terceira categoria inclui aqueles que apresentam impacto sobre o crescimento e o fornecimento de nutrientes, como a competição por nutrientes essenciais ou espaço, representados pela quantidade de matéria orgânica.

Devido à relevância desses fatores para a nitrificação, especialmente para processos de biomassa aderida, será realizado um breve detalhamento dos principais parâmetros que afetam esse processo.

3.3.1.1 pH

Cada enzima no metabolismo microbiano funciona de forma otimizada em determinado pH, com atividade decrescente em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto ótimo. No caso das bactérias nitrificantes, foram conduzidos muitos estudos a fim de se determinar o valor mais apropriado de pH, que varia amplamente, dependendo do método de nitrificação, do tipo reator e do inóculo usado na partida do reator. Dessa forma, o pH ideal para nitrificação pode variar de 7,2 a 8,8 para as bactérias do gênero

Nitrosomonas e de 7,2 a 9,0 para as bactérias do gênero *Nitrobacter* (CHEN *et al.*, 2006).

Como pode ocorrer queda severa de pH durante o processo de nitrificação devido à liberação de H^+ para o meio (Equação 3.1), a adição de produtos químicos é comumente empregada de modo a aumentar o pH e manter a capacidade tampão do sistema. A quantidade necessária para tamponar o meio nitrificante é de 7,14 g- $CaCO_3/gN-NH_4^+$, conforme relação estequiométrica da Equação (3.5) (AHN, 2006).

3.3.1.2 Temperatura

Em geral, temperaturas mais elevadas são mais favoráveis aos processos bioquímicos, incluindo o processo nitrificante. O efeito de aumento ou diminuição das taxas de reações biológicas decorrentes da variação de temperatura pode ser quantificado a partir da equação de Arrhenius, conforme Equação (3.6), limitando-se a faixa estreita de temperatura. Com base nessa Equação, a taxa de reação praticamente duplica com variação positiva de temperatura em 10°C. Particularmente, a cinética de nitrificação diminui muito em baixas e elevadas temperaturas. Dessa forma, estima-se que a temperatura ótima de nitrificação esteja entre 25 a 36°C, enquanto a 40°C a taxa de crescimento nitrificante diminui drasticamente (SHARMA & AHLERT, 1977; HENZE *et al.*, 1997).

$$k = A * e^{-E/RT} \quad (3.6)$$

k = Coeficiente de taxa de reação, d^{-1}

A = Constante pré-exponencial, d^{-1}

E= Coeficiente de temperatura, J/mol

R = Constante dos gases ideais (J/mol.K)

T = Temperatura absoluta (K)

As bactérias oxidadoras de amônio (BOA) e as bactérias oxidadoras de nitrito (BON) se comportam de forma diferente às mudanças de temperatura. O aumento da temperatura pode ocasionar um aumento maior na taxa de oxidação de amônia do que na taxa de oxidação de nitrito. Alguns estudos atestam que após o aumento de temperatura do sistema, foi registrado um acúmulo de nitrito e, conseqüentemente, de amônio em efluente de reatores operados continuamente (KIM *et al.*, 2008).

Em sistemas com biofilme, o efeito da temperatura na cinética de nitrificação é ainda mais complicado de ser descrito quando comparado com o das culturas em suspensão, devido ao efeito de outros fatores, como por exemplo, limitação à difusão de substrato no biofilme (FDZ-POLANCO *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2006).

3.3.1.3 Oxigênio Dissolvido

Na reação de nitrificação, o requerimento teórico de oxigênio dissolvido, de acordo com as Equações (3.1) e (3.2), é de 3,43 mg para oxidação de 1 mg de NH_4^+ em nitrito e de 1,14 mg para oxidação de 1 mg de NO_2^- em nitrato. Sendo assim, o oxigênio dissolvido é essencial para atividade de bactérias nitrificantes. Vários estudos investigaram o efeito do oxigênio dissolvido nas taxas de nitrificação. No entanto, a maioria dos estudos é baseada em sistemas com crescimento bacteriano em suspensão, que apontam a necessidade de manter concentrações acima de 0,5 mgO_2/L para alcançar altas taxas de nitrificação. Por outro lado, concentrações inferiores a 0,5 mgO_2/L podem

interromper a nitrificação (SHARMA & AHLERT, 1977; HAKANI *et al.* 1990; HENZE *et al.*, 1997; SURAMPALLI *et al.*, 1997).

Já a disponibilidade de oxigênio em processos com biomassa aderida pode ser significativamente diferente quando comparada aos processos de crescimento suspenso em função da limitação à difusão dos substratos em biofilmes (ZHU & CHEN, 2002). Dessa forma, uma maior concentração de OD muitas vezes é requerida nesses processos.

3.3.1.4 Concentração de Substrato

Juntamente com o oxigênio dissolvido, a concentração de amônio como substrato da nitrificação é um dos fatores mais importantes para o crescimento das bactérias nitrificantes. Dois fatores essenciais estão relacionados ao processo de nitrificação: a concentração mínima de substrato para promover a reação nitrificante e a concentração máxima de substrato que não cause efeitos tóxicos sobre as bactérias nitrificantes.

O substrato (amônio) tem fundamental importância na seleção das bactérias nitrificantes no sistema. Há evidências de que a variação na concentração inicial de amônio pode selecionar diferentes tipos de bactérias, possivelmente por meio da diferença de afinidade pelo substrato (WEBSTER *et al.*, 2005). De fato, a absorção rápida e efetiva de amônio, descrita em termos de $\mu_{\text{máx}}$ (taxa máxima de crescimento específico) e K_s (afinidade do substrato), é um fator importante que influencia diretamente a competição entre diversas bactérias pelo substrato. Por exemplo, um estudo realizado por BOLLMANN & LAANBROEK (2001) revelou que as bactérias

Nitrosomonas oligotropha se adaptaram melhor ao meio contendo baixas concentrações de amônio do que as bactérias *Nitrosomonas europaea*.

Existem vários fatores que podem limitar o contato das bactérias nitrificantes com o substrato, como por exemplo, o pH do meio, a variação afluente, os problemas operacionais decorrentes de paradas da planta, ou ainda a competição de nitrificantes com as bactérias heterotróficas. Supõe-se que as bactérias oxidadoras de amônio tenham menor afinidade por substrato e pelo oxigênio quando comparado às bactérias heterotróficas, sendo consideradas concorrentes mais fracas por esses substratos. Em função dessas características, estudos sugerem que as BOA tenham adquirido mecanismos fisiológicos, enzimáticos e moleculares que permitam a sua sobrevivência durante períodos com baixas concentrações de substrato (GEETS *et al.*, 2006).

As espécies não ionizadas, isto é, amônia livre e ácido nitroso, são consideradas agentes inibidores do processo nitrificante (ANTHONISEN *et al.*, 1976). O pH do meio afeta o equilíbrio de dissociação dessas formas nitrogenadas, como por exemplo: $\text{NH}_3 \leftrightarrow \text{NH}_4^+$ (pKa = 9,3) e $\text{HNO}_2 \leftrightarrow \text{NO}_2^-$ (pKa = 3,4), tornando o processo de nitrificação fortemente dependente desse parâmetro. A Figura 3.3 mostra as relações postuladas de amônia livre e inibição por ácido nitroso livre para organismos nitrificantes.

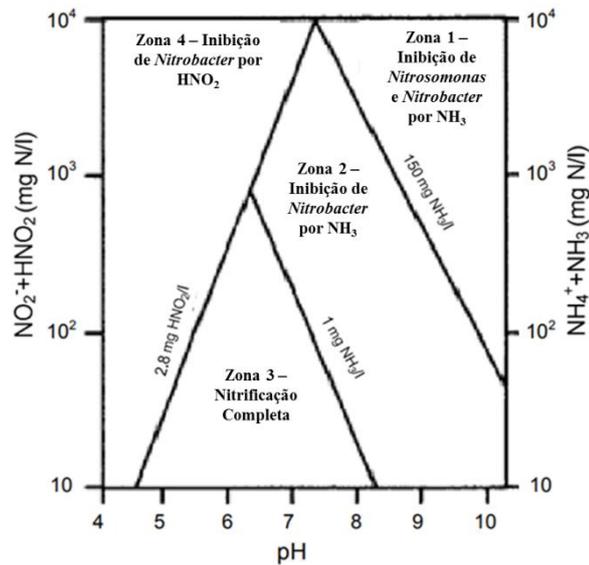


Figura 3.3.: Relação de inibição dos organismos nitrificadores com a amônia livre e o ácido nitroso. **Zona 1** – Inibição de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* por NH₃. **Zona 2** – Inibição de *Nitrobacter* por NH₃. **Zona 3** – Nitrificação completa. **Zona 4** – Inibição de *Nitrobacter* por HNO₂ (adaptado de ANTHONISEN *et al.*, 1976).

Amônia livre pode ser estimada pela Equação (3.7), proposta por ANTHONISEN *et al.* (1976). Além disso, a presença de ácido nitroso pode ser calculada pela Equação (3.8). Como pode ser observado, a concentração de amônia livre e ácido nitroso no meio são dependentes do pH e da temperatura do meio.

$$NH_3(mg/L) = \frac{[NH_4^+ - N] * 10^{pH}}{e^{\frac{2300}{(-273+T(^{\circ}C))}} + 10^{pH}} \quad (3.7)$$

$$HNO_2(mg/L) = \frac{[NO_2^- - N](mg/L)}{e^{\frac{2300}{(-273+T(^{\circ}C))}} * 10^{pH}} \quad (3.8)$$

3.3.1.5 Competição entre bactérias nitrificantes e bactérias heterotróficas

Os compostos orgânicos presentes nos efluentes domésticos e industriais podem influenciar diretamente o processo de nitrificação. O impacto mais relevante dos compostos orgânicos na nitrificação deve-se ao fato de que esses são utilizados como substrato pelas bactérias heterotróficas de crescimento rápido. Conseqüentemente, as bactérias heterotróficas podem consumir todo oxigênio dissolvido na oxidação da matéria orgânica, sendo necessário aporte adicional de oxigênio. Além disso, as bactérias heterotróficas competem com bactérias nitrificantes por espaço em sistemas com biofilme (OHASHI *et al.*, 1995).

Vários fatores podem afetar a competição entre bactérias heterotróficas e nitrificantes no biofilme. No entanto, um dos fatores mais relevantes para essa competição é determinado pela relação entre o carbono orgânico e o nitrogênio amoniacal (C/N), visto que uma elevada razão C/N estimula o crescimento de bactérias heterotróficas (ZHU & CHEN, 2001; SHARMA & AHLERT, 1977). Esse crescimento acelerado de heterotróficas pode ocasionar a diminuição de oxigênio dissolvido, além de estimular a redução da população de bactérias nitrificantes em longo prazo no biofilme (OHASHI *et al.*, 1995; SATOH *et al.*, 2000; ZHU & CHEN, 2001). Razões C/N superiores a 10 podem reprimir a atividade nitrificante (HAKANI *et al.*, 1990).

3.3.2 Desnitrificação

A segunda etapa da remoção biológica de nitrogênio é conhecida como desnitrificação, a qual promove a redução do nitrato e/ou nitrito a gás nitrogênio, que é inerte.

A desnitrificação também é designada por redução dissimilatória de nitrato. Nesse processo, as formas oxidadas do nitrogênio (nitrito e nitrato), formadas na reação de nitrificação, são reduzidas a nitrogênio molecular (Equação 3.9). Nesse processo, bactérias heterotróficas facultativas utilizam o nitrato como acceptor final de elétrons, requerendo matéria orgânica como fonte de energia (doador de elétrons).



N_2O é um gás intermediário formado na desnitrificação e está diretamente relacionado ao efeito estufa, causando grande preocupação ambiental (METCALF & EDDY, 2016).

Nitrato redutase, nitrito redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, são enzimas que estão envolvidas no processo de desnitrificação. As reações catalisadas por essas quatro enzimas estão exemplificadas, respectivamente, nas Equações de (3.10) a (3.13), conforme segue:

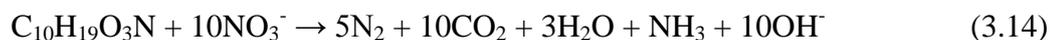


As bactérias atuantes no processo de desnitrificação podem ser de diversos gêneros, sendo difícil a sua especificação. De qualquer modo, alguns gêneros identificados são: *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Spirillum*

(METCALF & EDDY, 2016). Grande parte das bactérias desnitrificantes é heterotrófica, requerendo compostos orgânicos como fonte de energia.

A estequiometria da reação de desnitrificação depende diretamente da fonte de carbono utilizada, sendo que a fórmula $C_{10}H_{19}O_3N$ é frequentemente utilizada para representar a matéria biodegradável do esgoto doméstico (METCALF & EDDY, 2003). As Equações (3.14), (3.15) e (3.16) apresentam as reações de desnitrificação utilizando três doadores de elétrons diferentes para redução de nitrato.

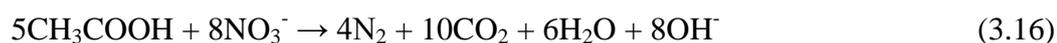
Esgoto:



Metanol:



Ácido acético:



Em todas essas reações de desnitrificação heterotrófica, um equivalente de alcalinidade é produzido por um equivalente de nitrato reduzido, correspondendo a geração de 3,57 g de alcalinidade (em termos de $CaCO_3$) por grama de nitrogênio reduzido. A mesma quantidade de alcalinidade é produzida na redução de nitrito (METCALF & EDDY, 2016).

Apesar de ser um processo menos suscetível a perturbações externas, a desnitrificação pode ser afetada por alguns fatores, como, por exemplo, a quantidade de

matéria orgânica e de nitrogênio (relação DQO/N), concentração de oxigênio dissolvido, fonte de carbono, temperatura, pH e substâncias inibidoras.

3.3.1.1 Relação DQO/N

Para utilização de uma fonte de carbono exógena na desnitrificação, é importante estimar a carga do substrato em função da carga de NO_x (NO₂ + NO₃) a ser removida. Essa quantidade de substrato pode ser calculada em termos de massa de DQO adicionada por massa de NO_x removida, sendo comumente expressa como relação DQO/N. Essa relação é determinada por meio do balanço de DQO, de forma semelhante ao utilizado para estimar a quantidade de oxigênio requerida por unidade de DQO removida. O oxigênio equivalente de nitrato e nitrito (OEN) deve ser identificado para estimar a relação DQO/N na desnitrificação (METCALF & EDDY, 2016). Logo, a remoção de nitrato e nitrito pode ser expressa em termos do OEN, definido como a massa de oxigênio equivalente envolvida na reação de desnitrificação com mesmo número de elétrons quando nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso, nitrito, ou ambos (YANG *et al.* 1995). O OEN pode ser usado para estimar o crescimento celular líquido e é calculado pela Equação (3.17).

$$OEN_{consumido} = 2,86 * Q * (N_e - N_{S1}) + 1,71 * Q * N_{S2} \quad (3.17)$$

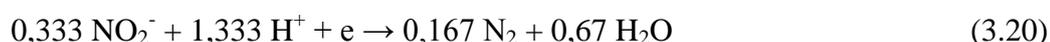
Q – vazão de entrada (L/d)

N_e – concentração de nitrato de entrada (mgNO₃-N/L)

N_{S1} – concentração de nitrato de saída (mgNO₃-N/L)

N_{S2} – concentração de nitrito de saída (mgNO₂-N/L)

Os coeficientes 2,86 e 1,71 são os equivalentes de massa O₂ por massa de NO₃-N e massa de O₂ por massa de NO₂-N, respectivamente, que podem ser obtidos a partir das reações (3.18) a (3.20) (METCALF & EDDY, 2016):



Conforme pode ser observado nas Equações (3.18) a (3.20), 0,25 mol de oxigênio é equivalente a 0,2 mol de nitrato para a transferência de um elétron na reação de oxidação-redução. Sendo assim, a massa de oxigênio equivalente de nitrato (0,25mol*32gO₂/mol) dividido pela massa de nitrato equivalente (0,20mol*14gN/mol) é igual a 2,86 gO₂/gNO₃-N. Do mesmo modo, para o caso do nitrito como acceptor de elétrons, a massa de oxigênio equivalente é de 1,71 gO₂/gNO₂-N. Essas relações levam em conta apenas o catabolismo microbiano, isto é, não consideram a DQO necessária para o anabolismo.

Segundo a literatura, uma relação variando de 4 a 15 gDQO/gN é requerida para assegurar altas taxas de desnitrificação (ZHEN *et al.*, 2007). Nos casos em que essa relação mínima requerida não é atendida pelo afluente do processo, uma fonte de carbono externa deve ser adicionada.

3.3.1.2 Fonte de Carbono

Como já apresentado, a presença de uma fonte de carbono orgânico é necessária na desnitrificação heterotrófica. Quando não há matéria orgânica suficiente, como por exemplo, em efluentes com baixa relação DQO/N, ou devido ao alto consumo de DQO em etapas anteriores sob aeração para promoção da nitrificação, é necessário adicionar DQO externa ao sistema (CHRISTENSSON, *et al.*, 1994; FERNANDEZ-NAVA *et al.*, 2010). As características da fonte de carbono adicional apresentam efeitos importantes no processo de desnitrificação, afetando a taxa de desnitrificação, o requerimento de DQO, o crescimento e a composição da biomassa (OSAKA *et al.*, 2008).

Diversos fatores devem ser considerados na escolha de uma fonte de carbono, como por exemplo, custos do substrato, produção de lodo, taxa de desnitrificação, grau de utilização, segurança no manuseio e armazenamento. No que diz respeito aos custos, a fonte de carbono e os encargos de gestão de resíduos são, conjuntamente, responsáveis por mais de 50% dos custos totais das águas residuárias tratadas. Portanto, é muito importante encontrar uma fonte extra de carbono econômica. Dentre as fontes de carbono comumente utilizadas, está o acetato, metanol, etanol, glicerina, entre outros. O ácido acético também constitui uma fonte comumente empregada devido a ser facilmente assimilada pelas bactérias desnitrificantes e apresentar baixo custo (CONSTANTIN & FICK, 1994).

3.3.1.3 pH e temperatura

Conforme demonstrado nas Equações (3.14) a (3.16), 3,57 equivalentes de alcalinidade são produzidos para cada equivalente de nitrato reduzido, de modo que o

pH em sistemas desnitrificantes tende a aumentar, favorecendo meios pouco tamponados. O pH ótimo para a maioria das bactérias desnitrificantes relatada na literatura é em torno de 7 a 8 (WANG *et al.*, 1995; GLASS & SILVERSTEIN, 1998). Contudo, o aumento de pH não modifica a taxa de desnitrificação, sendo que alguns autores relataram que a taxa de desnitrificação permanece constante tanto com o pH a 7,5 quanto a 9,5 (GLASS & SILVERSTEIN, 1998). No entanto, em sistemas com pH reduzido (2,5 - 5,8) e altamente carregados de nitrato, a desnitrificação pode ser severamente inibida (SILVERSTEIN *et al.*, 1993). Além disso, alguns autores também reportam que valores de pH inferiores a 7 diminuíram significativamente a taxa de desnitrificação (GLASS *et al.*, 1997).

A temperatura afeta a taxa de crescimento microbiano, e, conseqüentemente, a taxa de redução nitrato. Uma ampla faixa de temperatura (0 a 50°C) pode ser usada no processo de desnitrificação, porém a temperatura ótima fica em torno de 35°C.

3.3.1.4 Oxigênio Dissolvido

O processo de desnitrificação é realizado em condições anóxicas, utilizando o nitrato como agente oxidante. Isto é, o nitrato é usado como acceptor de elétrons na oxidação da matéria orgânica a dióxido de carbono e água (METCALF & EDDY, 2016). No entanto, os micro-organismos desnitrificantes são formados por bactérias facultativas heterotróficas, ou seja, bactérias que utilizam tanto oxigênio quanto nitrato como acceptor final de elétrons, dependendo da disponibilidade desses compostos (HENZE *et al.*, 1997). A escolha do acceptor final de elétrons pela bactéria favorece o oxigênio, de modo que, em uma situação em que tanto o oxigênio quanto o nitrato

estejam presentes, as bactérias utilizam o oxigênio na respiração celular (HENZE *et al.*, 1997). Dessa forma, a desnitrificação pode ser influenciada negativamente pelo oxigênio dissolvido, mesmo em baixas concentrações. Valores inferiores a 0,5 mgO₂/L são muitas vezes indicados para evitar quedas no rendimento do processo desnitrificante (VAN HAANDEL & VAN DER LUBBE, 2007).

3.3.1.5 Inibição pelo substrato

O nitrato é um dos principais substratos para a desnitrificação, porém, a literatura relata que altas concentrações desse substrato podem inibir esse processo. Alguns pesquisadores apontam que a inibição por nitrato ocorre, na verdade, pela toxicidade do acúmulo nitrito, especificamente pela sua espécie não ionizada, isto é, ácido nitroso (CHEN *et al.*, 1991 ; GLASS *et al.*, 1997). Glass *et al.* (1997) observaram que, em valores de pH próximos à neutralidade (6 e 7), concentrações de nitrito de 30 e 250 mgNO₂-N/L podem inibir a desnitrificação. Como a inibição ocorreu em pH neutro e diminuiu apenas com o aumento do pH para pelo menos 8, concluiu-se que o HNO₂ foi a provável causa da inibição (GLASS *et al.*, 1997).

3.4 Cinética de Crescimento Celular

Os processos biológicos utilizados no tratamento de efluentes domésticos e industriais dependem diretamente da utilização do substrato para o crescimento microbiano. A taxa de utilização de substrato e produção de biomassa é regulada pela cinética de crescimento microbiano, que é influenciada pelas condições operacionais.

Nesses termos, as condições básicas exigidas pelas reações biológicas devem ser obedecidas para o projeto e operação de sistemas de tratamento de efluentes.

A Equação de Monod (Equação 3.22) é usualmente empregada para descrever a taxa de crescimento de bactérias em função da concentração de substrato (GRADY *et al.*, 1999):

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} * S}{K_s + S} \quad (3.22)$$

μ = taxa específica de crescimento celular (g células/g células.d)

$\mu_{m\acute{a}x}$ = máxima taxa específica de crescimento celular (g células/g células.d)

S = concentração de substrato (g/L)

K_s = Coeficiente de meia-saturação ou meia-velocidade, que é a concentração de substrato para a qual a taxa de crescimento é igual à metade da taxa máxima ($\mu_{m\acute{a}x}/2$).

A Equação (3.22) é semelhante a utilizada para estimar a cinética enzimática de Michaelis-Menten, porém foi reescrita por Monod para descrever a taxa de crescimento específico das bactérias, quando o substrato limitante está disponível aos micro-organismos na forma dissolvida em um curto intervalo de tempo. A Figura 3.4 ilustra o crescimento microbiano de acordo com a Equação de Monod, indicando que a taxa máxima de utilização do substrato ocorre em altas concentrações do mesmo. Nessa condição, as bactérias também estão crescendo à taxa máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$).

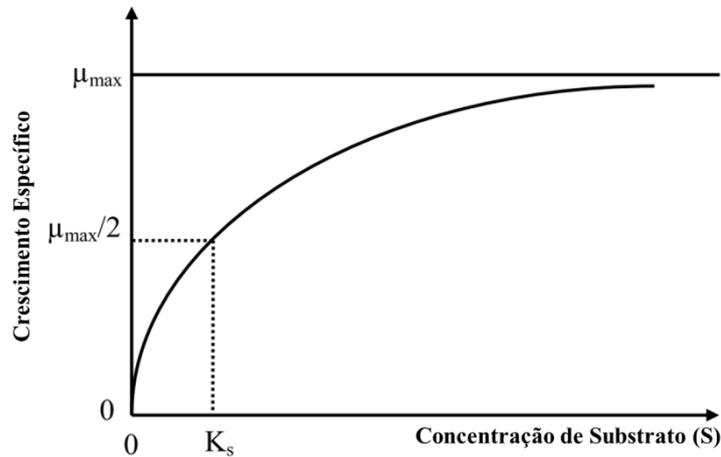


Figura 3.4.: Taxa específica de crescimento em função da concentração de substrato, conforme representado pela Equação de Monod. Os seguintes parâmetros estão representados: μ_{\max} e K_s .

À medida que as bactérias consomem o substrato, energia é obtida e utilizada na produção de novas células. Logo, o crescimento de novas bactérias está diretamente relacionado à utilização de substrato, designado como síntese celular (fator de rendimento celular Y , do inglês *Yield*), conforme descrito pela Equação (3.23).

$$\text{Síntese de Biomassa (yield), } Y = \frac{\text{g biomassa produzida}}{\text{g de substrato consumido}} \quad (3.23)$$

3.4.1 Cinética de nitrificação

O modelo cinético de Monod, dado pela Equação (3.24), também é utilizado para descrever a taxa de oxidação de $\text{NH}_4\text{-N}$ e $\text{NO}_2\text{-N}$ pela nitrificação. O modelo considera os efeitos da limitação de substrato em condições de estado estacionário considerando a taxa de crescimento específico das BOA e BON em cultura pura (RITTMANN & MCCARTY, 1980).

$$R = \mu_{m\acute{a}x} \frac{X}{Y_S} \frac{S}{K_S + S} \quad (3.24)$$

R = taxa de remoção de substrato (g/L.d)

$\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa máxima de crescimento específico (1/d)

X = concentração de bactérias (gSSV/L)

Y_S = rendimento celular por unidade de substrato utilizado (gSSV/g Substrato)

S = concentração de substrato limitante (g/L)

K_S = coeficiente de meia velocidade de substrato (g/L)

Essa equação também pode ser usada para descrever a cinética de nitrificação quando o amônio é o substrato limitante do crescimento de BOA e quando o nitrito é o substrato limitante de BON. A taxa de crescimento das BON é maior do que a das BOA, sendo assim, a oxidação de amônio se torna a etapa limitante da conversão da amônia em nitrato, em temperaturas inferiores a 25°C (GABARRÓ *et al.*, 2012). A análise da Equação (3.24) pode revelar duas características principais da nitrificação. Primeiro, em concentração suficientemente elevada de substrato, a Equação (3.24) torna-se uma expressão de ordem zero, o que significa que a taxa de reação não aumenta em relação à concentração do substrato. Neste caso, outros fatores se tornam o fator limitante do processo nitrificante. Segundo, em concentração suficientemente baixa de substrato, a relação da taxa de remoção de substrato torna-se linear, podendo-se assumir uma reação de primeira ordem.

A cinética de nitrificação no biofilme é bastante complexa, uma vez que o suprimento de substrato na camada inferior do biofilme é controlado pelo fenômeno de difusão, apresentando assim gradientes de concentração em todo o biofilme. Portanto, a cinética das reações do biofilme é influenciada diretamente pelo transporte de massa (RASMUSSEN & LEWANDOWSKI, 1998). Fatores que determinam a taxa de

difusão, como as condições ambientais e o fluxo de substrato, influenciam a taxa de suprimento de substrato e também a extensão do crescimento do biofilme.

As bactérias nitrificantes no interior do biofilme podem ser mantidas sob condições limitadas de oxigênio e de amônio. Portanto, a concentração de substrato é distinta nas diferentes profundidades do biofilme. Como consequência, a Equação (3.24) se aplica a determinado ponto do biofilme. Uma análise rigorosa da cinética de nitrificação em sistemas com biomassa aderida deveria considerar a variação da concentração de substrato no biofilme. No entanto, por simplicidade, convencionou-se que a taxa de nitrificação está diretamente relacionada com a concentração de amônio no meio reacional (ZHU & CHEN, 1999). Logo, a taxa de nitrificação pode ser expressa simplificada pela Equação (3.25).

$$R = R_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_S + S} \quad (3.25)$$

R = taxa de oxidação de substrato (g/L.d)

$R_{m\acute{a}x}$ = taxa máxima de oxidação do substrato (g/L.d)

S = concentração do substrato limitante (g/L)

K_S = coeficiente de meia velocidade de substrato (g/L)

3.4.2 Cinética de desnitrificação

A cinética da desnitrificação pode ser expressa em termos de uma taxa específica de desnitrificação, dada em $\text{gNO}_3\text{-N}/(\text{gSSV}\cdot\text{dia})$, variando em função do tipo e quantidade de carbono orgânico biodegradável e da temperatura do meio anóxico. A taxa de utilização de substrato solúvel pode ser descrita pela Equação (3.26), considerando a concentração de OD como sendo nula (METCALF & EDDY, 2016).

$$r_s = \left[\frac{\mu_{H,m\acute{a}x} S_s}{Y_H(K_s + S_s)} \right] \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) (n) X_H \quad (3.26)$$

r_s = taxa de utilização de substrato no reator (g/L.d)

Y_H = síntese de bactérias heterotróficas (gSSV/gDQO utilizado)

$\mu_{H,m\acute{a}x}$ = taxa específica máxima de crescimento de heterotróficas desnitrificantes (gSSV/gSSV.d)

K_s = coeficiente de meia velocidade de utilização de substrato (gDQO/L)

S_s = concentração de substrato orgânico biodegradável solúvel no reator (gDQO/L)

S_{NO} = concentração de nitrato no reator (gNO₃-N/L)

K_{NO} = coeficiente de meia velocidade de nitrato (gNO₃-N/L)

n = fração da taxa de utilização de substrato com nitrato como receptor de elétrons versus oxigênio

X_H = concentração de bactérias heterotróficas (g/L)

A taxa de consumo de nitrato pode ser estimada como função da taxa de utilização de substrato, aplicando a Equação (3.27).

$$\frac{gDQO}{gNO_3-N} = \frac{r_s}{r_{NO}} = \frac{2,86}{(1-1,42Y_d)} \quad (3.27)$$

Substituindo r_s da Equação (3.27) pela definição de r_s da Equação (3.26), obtm-se a taxa de consumo de nitrato (Equação 3.28).

$$r_{NO} = \left[\frac{1-1,42Y_H}{2,86} \right] \left[\frac{\mu_{H,m\acute{a}x} S_s}{Y_H(K_s + S_s)} \right] \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) (n) X_H \quad (3.28)$$

r_{NO} = taxa de utilização de substrato no reator (g/L.d)

Y_d = síntese de bactérias desnitrificantes (gSSV/gDQO utilizado)

3.5 Crescimento suspenso e aderido de bactérias

Os principais processos biológicos utilizados para o tratamento de águas residuárias podem ser divididos em duas categorias principais: crescimento suspenso e crescimento aderido. Nos processos de crescimento em suspensão, os micro-organismos responsáveis pelo tratamento das águas residuárias são mantidos livres na fase líquida. O processo de lodos ativados, concebido para remoção de matéria orgânica e nitrogênio amoniacal (caso permita a nitrificação) é um exemplo. Variações e/ou modificações desse processo podem proporcionar também a remoção combinada de nitrogênio e fósforo.

Nos processos de crescimento aderido, os micro-organismos responsáveis pela conversão dos substratos (matéria orgânica, nutrientes e outros) estão imobilizados em um material suporte inerte, crescendo na forma de biofilmes.

3.5.1 Biofilme

Nos ecossistemas aquáticos naturais, os micro-organismos que colonizam as superfícies superam, em número, os micro-organismos suspensos. As bactérias que crescem nas superfícies possuem vantagens, pois estabelecem locais específicos e relações simbióticas em seu ambiente. A tendência da adesão bacteriana às superfícies sugere um forte instinto de sobrevivência e vantagens em relação às bactérias suspensas (DUNNE, 2002).

O biofilme é uma estrutura fixa a uma superfície constituída por micro-organismos e substâncias poliméricas extracelulares (EPS), e processos baseados nessa

forma de crescimento microbiano têm sido largamente utilizado para o tratamento de águas residuárias (FLEMMING *et al.*, 2016). O biofilme consiste em várias camadas de diferentes espécies e a sua estrutura é altamente heterogênea, formando relações simbióticas entre si, sendo que os subprodutos produzidos por um organismo podem atuar como substrato para outro organismo. Os biofilmes não são imutáveis, tanto a sua estrutura como a sua função podem mudar com mudanças nas condições ambientais (FLEMMING *et al.*, 2016). Por exemplo, o aumento do acesso a nutrientes, como nitrogênio e carbono, contribui para aumentar a espessura do biofilme, mudando assim a estrutura da comunidade microbiana (HU *et al.*, 2009).

O biofilme possui muitas vantagens para os micro-organismos que o compõem por diversos motivos. Como por exemplo, o biofilme proporciona melhor proteção aos micro-organismos em comparação com aqueles que vivem em suspensão, evitando que sejam arrastados do sistema (FLEMMING *et al.*, 2016). No entanto, uma das desvantagens da estrutura do biofilme para as bactérias é o acesso limitado aos substratos nas suas camadas mais profundas, uma vez que os organismos localizados nas regiões mais externas consomem os substratos mais rapidamente do que a taxa de difusão que os transporta para as camadas inferiores (FLEMMING *et al.*, 2016).

A difusão limitada nas camadas mais profundas reduz a taxa de crescimento dos micro-organismos. Consequentemente, o oxigênio torna-se, muitas vezes, um substrato limitante nas camadas mais profundas do biofilme (FLEMMING *et al.*, 2016). Portanto, as bactérias desnitrificantes são encontradas em maior frequência nessas camadas, enquanto que as bactérias nitrificantes e outros tipos de bactérias heterotróficas aeróbias situam-se nas camadas mais superficiais. Logo, zonas aeróbias, anaeróbias e anóxicas

são frequentemente encontradas dentro de um único sistema, o que pode promover diferentes processos de conversão (DUTTA *et al.*, 2007).

3.6 Biorreatores contendo biomassa imobilizada em meio suporte

Os biorreatores com biofilme são aqueles nos quais a biomassa está imobilizada em suportes inertes. A formação do biofilme ocorre na superfície do suporte, havendo predomínio desses em relação às culturas livres em suspensão. A interação criada pela colônia de micro-organismos aderida ao suporte favorece o conjunto como todo, garantindo a estabilidade da comunidade microbiana.

As principais vantagens que podem ser citadas na utilização dos reatores de biomassa fixa são: aumento da concentração de biomassa no reator, favorecendo a obtenção de elevadas eficiências de conversão do substrato; o tempo de retenção celular é independente do tempo de retenção hidráulico; volumes reduzidos; diminuição da sensibilidade a choques de carga; e a possível eliminação da etapa posterior de sedimentação e/ou clarificação em virtude da baixa concentração de sólidos em suspensão (CORTEZ *et al.*, 2008).

No entanto, os sistemas com biomassa imobilizada podem apresentar algumas desvantagens. Entre elas, pode-se mencionar a falta de um mecanismo adequado para controle da espessura do biofilme, limitando a transferência de massa para o seu interior e algumas vezes causando obstrução do leito. A operação do sistema deve ser escolhida de maneira que as limitações desses sistemas sejam superadas.

Vários tipos de biorreatores com biofilme são empregados no tratamento de efluentes, a saber: filtros biológicos, contactores biológicos rotativos, reatores de leito fixo submerso aerados, reatores de leito móvel com biofilme (MBBR), entre outros. No entanto, os MBBR tem ganhado destaque no cenário mundial devido às vantagens em relação aos demais sistemas de biomassa aderida.

O MBBR é uma tecnologia que congrega em um único sistema as vantagens do sistema de lodo ativado com as vantagens dos sistema com biofilmes, deixando de lado as características indesejáveis de cada processo (RUSTEN *et al.* 2006). Na comparação entre o MBBR e os outros sistemas com biomassa imobilizada, o fato de a biomassa estar aderida a um suporte móvel apresenta a vantagem de não haver problemas de entupimento do leito, além de proporcionar menor perda de carga (RUSTEN *et al.* 2006). O sistema MBBR também apresenta dimensões menores em comparação com outros sistemas com biomassa em suspensão, já que a etapa de separação do lodo e do efluente tratado pode ser feita em unidades compactas, além de não haver a necessidade de reciclo de lodo. Ademais, o sistema MBBR pode ser aplicado a estações de tratamento já existentes, sendo necessária apenas uma adaptação (SALVETTI *et al.*, 2006).

Apesar das vantagens do sistema, este reator apresenta algumas desvantagens, como o alto custo operacional, principalmente em termos energéticos, pois nesse sistema a aeração serve não somente para suprir oxigênio aos organismos, mas também é a responsável pela movimentação dos suportes. Além disso, há risco de problemas de natureza hidrodinâmica como, por exemplo, áreas estagnadas (BASSIN & DEZOTTI, 2011).

O MBBR faz uso de meios suportes plásticos em suspensão (ØDEGAARD, 2006), os quais se movimentam em todo volume útil do reator. A biomassa permanece aderida majoritariamente aos suportes, sendo a quantidade de biomassa em suspensão bastante reduzida, sobretudo em condições de baixa carga orgânica. No entanto, em condições com elevada carga orgânica, a biomassa em suspensão é considerável, e o reator funciona mais como um sistema híbrido no qual o lodo aderido e o suspenso atuam conjuntamente no tratamento biológico (BASSIN *et al.* 2016). Uma representação do sistema MBBR encontra-se na Figura 3.5.

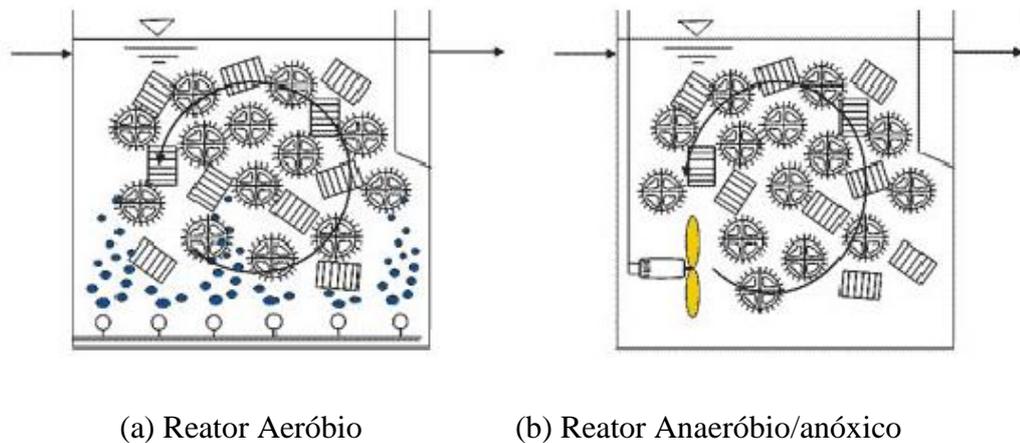


Figura 3.5.: Funcionamento do MBBR (adaptado RUSTEN *et al.*, 2006)

Conforme pode ser observado, a agitação dos suportes móveis no interior do MBBR pode ser alcançada por meio de duas formas principais: pela aeração (Figura 3.5a) ou agitação mecânica (Figura 3.5b). Na primeira forma, a aeração proporciona simultaneamente a agitação e a oxigenação do meio reacional. Por outro lado, a segunda forma de agitação lança mão de agitadores mecânicos e é utilizada quando se deseja um meio isento de oxigênio (anaeróbio/anóxico) (BASSIN&DEZOTTI, 2011).

Os suportes móveis utilizados para adesão microbiana são comumente denominados de *biomedias*. A maioria dos suportes são fabricados a partir de materiais poliméricos com densidade menor que a da água, preferencialmente entre 0,92 a 0,95 g/cm³, de modo a fazer com que os mesmos permaneçam em suspensão (NBR 12.209/2011). Além disso, a norma da ABNT (2011) também requer uma área específica interna mínima para crescimento microbiano de 250 m²/m³. Os suportes mais conhecidos do mercado são produzidos pela AnoxKaldnes®, ganhando maior notoriedade os da série K, como por exemplo, os K1, K2 e K3 (RUSTEN *et al.*, 2006). No entanto, outras empresas tem se especializado na produção de suportes para MBBR, buscando maior área superficial efetiva e menor custo de produção.

Um fator importante no reator MBBR é a razão entre o volume ocupado pelo suporte e o volume total do reator (V_s/V_R), conhecido também como fração de enchimento (%). Esse fator também se mostra crucial para o aumento de área disponível para crescimento celular. Em termos operacionais, a literatura recomenda que não seja ultrapassado um limite de 70%, de modo a possibilitar melhor mobilidade dos suportes, evitando assim, a possibilidade de áreas estagnadas (SALVETTI *et al.*, 2006). A NBR 12.209/2011 regulamenta que a fração de enchimento deve estar entre 30% e 70%.

Em função de suas vantagens operacionais, o MBBR tem sido largamente utilizado em plantas de tratamento de efluentes, incluindo aquelas que incorporam os processos de nitrificação e desnitrificação. Dessa forma, os estudos científicos acerca do emprego dessa tecnologia na remoção de matéria orgânica e nitrogenada tem ganhado grande destaque, sendo que alguns dos trabalhos recentes estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3.: Trabalhos que avaliaram o desempenho de reatores MBBRs em diversas condições operacionais

Efluente/ Escala	Objetivo	Condições Operacionais			Eficiência de Remoção	Referências
		TRH (h)	Tipo de suporte	V _s /V _R		
Industrial/ Bancada	Nitrificação de efluente salino	48	K3	40%	NH ₄ ⁺ – 90%	BASSIN <i>et al.</i> (2011)
Industrial/B ancada	Remoção de DQO, Fenol e NH ₄	9	K1	60%	DQO – 89% Fenol – 99% NH ₄ – 84%	ALMADA (2012)
Sintético/ Bancada	Remoção de NH ₄ e DQO	3-12	K1 <i>Mutag</i>	50% 8,3%	NH ₄ – 90% DQO – 90%	BASSIN <i>et al.</i> (2016)
Sintético/ Bancada	Remoção de Nitrogênio (NT) e DQO	3-12	K1	40%- 30%	NT – 85% DQO – 90%	LIMA <i>et al.</i> (2016)
Sintético/ Bancada	Remoção de NH ₄ , DQO e cor (LR16*)	6	K1	40%	NH ₄ – 97% DQO – 93% RO16– 97%	CASTRO <i>et al.</i> (2017)
Industrial/ Bancada	Remoção de Nitrogênio (NT) e DQO	12- 24	K1	50%	NT – 80% DQO – 90%	CAO <i>et al.</i> (2016)
Doméstico/ Piloto	Remoção de NH ₄ e DQO	0,9- 5	MOD940	30%- 70%	NH ₄ – 80% DQO – 90%	FONSECA (2016)
Doméstico/ Piloto	Remoção de Nitrogênio (NT) e DQO	18	K1	35%	NT – 60% DQO – 82%	LEYVA- DÍAZ <i>et al.</i> (2016)
Sintético/ Bancada	Remoção de Nitrogênio (NT) e Carbono Orgânico Total (COT)	12	Esponja	20%	NT – 93,6% COT – 95%	ZHANG <i>et al.</i> (2017)

* Corante azo laranja reativo 16

Nessa seção, foi apresentada a fundamentação teórica dos assuntos investigados no âmbito dessa pesquisa. A seguir, serão apresentados os estudos realizados, cada qual com sua contextualização, materiais e métodos utilizados, e resultados e discussão. Tal divisão foi realizada de modo a permitir melhor compreensão dos tópicos abordados.

4. EFEITO DE LONGOS PERÍODOS COM DISPONIBILIDADE LIMITADA DE SUBSTRATO E OXIGÊNIO NO PROCESSO NITRIFICANTE

4.1 Introdução

O rápido aumento da população e a expansão das cidades têm levado ao aumento da geração de águas residuárias domésticas e industriais. Esses efluentes, além de conterem material orgânico, possuem quantidade significativa de nutrientes, que, quando lançados no meio ambiente, causam a eutrofização, reduzindo assim a qualidade do corpo d'água.

Atualmente há uma grande preocupação em remover os nutrientes dos efluentes líquidos, entre os quais o nitrogênio. Desta forma, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de melhor entender os processos de remoção desse nutriente.

O método mais comum empregado para a remoção de nitrogênio ocorre por meio dos processos de nitrificação e desnitrificação, ambos mediados por bactérias. Na nitrificação, o nitrogênio amoniacal é convertido biologicamente em nitrito (NO_2^-) e posteriormente em nitrato (NO_3^-) por bactérias autotróficas. Subsequentemente, ocorre a desnitrificação, na qual o nitrato é reduzido a nitrogênio molecular por bactérias heterotróficas anaeróbias facultativas (METCALF & EDDY, 2016).

A nitrificação é a etapa mais sensível do processo global de remoção de nitrogênio, tendo em vista que seu desempenho é bastante suscetível a variações nas condições ambientais e operacionais, dentre as quais se incluem: pH, temperatura, oxigênio dissolvido (OD), concentração de substratos (amônio e nitrito), concentração de matéria orgânica, tempo de retenção celular e presença de compostos inibidores

(SHARMA & AHLERT, 1977; HANAKI *et al.*, 1990; HENZE *et al.*, 1997; MAYER *et al.*, 2009). Nesse contexto, são diversas as pesquisas que focaram no estudo do efeito desses parâmetros no desempenho do processo nitrificante.

Um assunto pouco discutido na literatura é o comportamento do processo de nitrificação frente a longos períodos sem disponibilidade ou com disponibilidade limitada de substrato (amônio). Essa condição pode ocorrer com frequência em estações de tratamento de esgoto que sofrem influência das águas pluviais, responsáveis pela diluição da carga nitrogenada afluyente. Além disso, em algumas indústrias, a composição do efluente gerado varia sazonalmente em função dos produtos gerados em determinado momento. Nesse último caso, em particular, a variação da carga de amônio afluyente pode ser significativa, sobretudo em função do desligamento temporário de alguma unidade produtiva, ou até mesmo devido à parada completa da produção para manutenção, que pode durar semanas ou até meses. Durante esse período, o consórcio microbiano nitrificante pode ser submetido a cargas de substrato nitrogenado bastante distintas, que podem variar de elevadas a nulas. Tal oscilação pode afetar a sua atividade, e, conseqüentemente, o potencial de nitrificação da planta (TORÀ *et al.*, 2011; ELAWWAD *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2015).

Outro parâmetro importante e que pode limitar o processo de nitrificação é o oxigênio dissolvido (OD). Situações com falta de OD são factíveis de ocorrer devido a falhas mecânicas e/ou manutenção de aeradores, o que pode prejudicar o processo nitrificante. Adicionalmente, em condições de alta carga orgânica, o crescimento intenso do consórcio heterotrófico pode limitar a quantidade disponível de oxigênio para as bactérias nitrificantes, impactando adversamente o desempenho do processo de nitrificação. Desse modo, é importante avaliar como a limitação e/ou ausência completa

de oxigênio influencia na atividade nitrificante e, conseqüentemente, na eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal.

Alguns trabalhos avaliaram o efeito de longos períodos, sem disponibilidade de substrato (amônio), na atividade dos micro-organismos nitrificantes e no coeficiente de decaimento das bactérias nitrificantes em diferentes tipos de sistemas biológicos: reator em batelada sequencial (RBS) com biomassa dispersa visando a nitrificação (CABEZAS *et al.*, 2009), RBS com remoção simultânea de nitrogênio e fósforo (YILMAZ *et al.*, 2007) e ainda sistema convencional de lodos ativados com nitrificação parcial (TORÀ *et al.*, 2011).

O principal parâmetro utilizado para avaliar a magnitude do efeito de longos períodos de escassez de amônio ou oxigênio é o coeficiente de decaimento da biomassa nitrificante (SALEM *et al.*, 2006; TORA *et al.*, 2011). Um exemplo foi o trabalho desenvolvido por Salem *et al.* (2006), no qual os autores investigaram o coeficiente de decaimento em culturas enriquecidas de nitrificantes e em culturas mistas de bactérias (lodos ativados). Numa comparação entre esses dois sistemas, o coeficiente de decaimento da cultura enriquecida de nitrificantes foi muito menor que a do sistema de lodos ativados. Sendo assim, a determinação dessa taxa pode ser interessante tanto para a comparação entre diversos sistemas de nitrificação como para auxiliar na escolha de sistemas ou estratégias operacionais que resultem em menores taxas de perda de nitrificantes sob determinadas condições.

Estudos com falta (ausência) ou ainda limitação de OD relatam que as bactérias nitrificantes podem sobreviver sob condições de anóxicas, por exemplo, em lagoas de sedimentação (DIAB *et al.*, 1992). Este estudo, em particular, sugeriu que as bactérias nitrificantes sobrevivem em condições anóxicas por meio da alteração do metabolismo

microbiano, o qual pode se tornar mais lento, resultando em um estado de repouso das células.

A grande maioria dos trabalhos voltados ao estudo da influência de condições de escassez de amônio e oxigênio foi realizada em sistemas com biomassa em suspensão. No entanto, o efeito dessas condições em sistemas com biofilme ainda é pouco discutido na literatura. Uma das tecnologias que faz uso de biomassa imobilizada que vem sendo bastante empregada é o reator de leito móvel com biofilme (MBBR), a qual faz uso de suportes móveis para o crescimento bacteriano. Essencialmente, os sistemas MBBR podem ser concebidos na sua forma original ou combinada ao lodo ativado, configuração conhecida como IFAS (*Integrated fixed film activated sludge*). Essa tecnologia é particularmente atraente para remoção de nitrogênio, pois permite maior tempo de retenção de sólidos no tanque de aeração, possibilitando que bactérias de crescimento lento, tais como as nitrificantes, permaneçam no sistema mesmo em idades do lodo reduzidas. O aumento do tempo de retenção de sólidos é obtido pelo crescimento do biofilme nos suportes móveis, que ainda propicia ao sistema maior área de crescimento microbiano quando comparado ao sistema de lodos ativados (ØDEGAARD, 2000).

A perda de desempenho da nitrificação é frequentemente atribuída a oscilações da carga nitrogenada afluenta (CABEZAS *et al.*, 2009; TORÀ *et al.*, 2011) ou problemas de aporte de oxigênio (SIEGRIST *et al.*, 1999). No entanto, a influência dessas variáveis na atividade nitrificante não está completamente elucidada, sobretudo em sistemas com biomassa imobilizada, tidos como mais robustos em comparação com reatores com biomassa suspensa (LAZAROVA & MANEM, 1999; RUSTEN *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar como longos períodos com disponibilidade limitada de substrato (amônio) e oxigênio afetam a nitrificação em sistemas MBBR. Para tanto, dois reatores foram operados em paralelo de modo a avaliar como o desempenho nitrificante é afetado quando as concentrações de substrato são variadas. Além disso, a atividade e o coeficiente de decaimento nitrificante foram monitoradas com o objetivo de avaliar o comportamento da nitrificação ao longo das diferentes condições de aporte de substrato e oxigênio.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Sistema operacional: configuração e condições operacionais

Dois reatores de leito móvel com biofilme (MBBR₁ e MBBR₂) de formato cilíndrico foram operados em paralelo de forma similar, conforme apresentado na Figura 4.1. Confeccionados em vidro, cada reator apresentou o volume total de 750 mL e volume reacional de 500 mL.

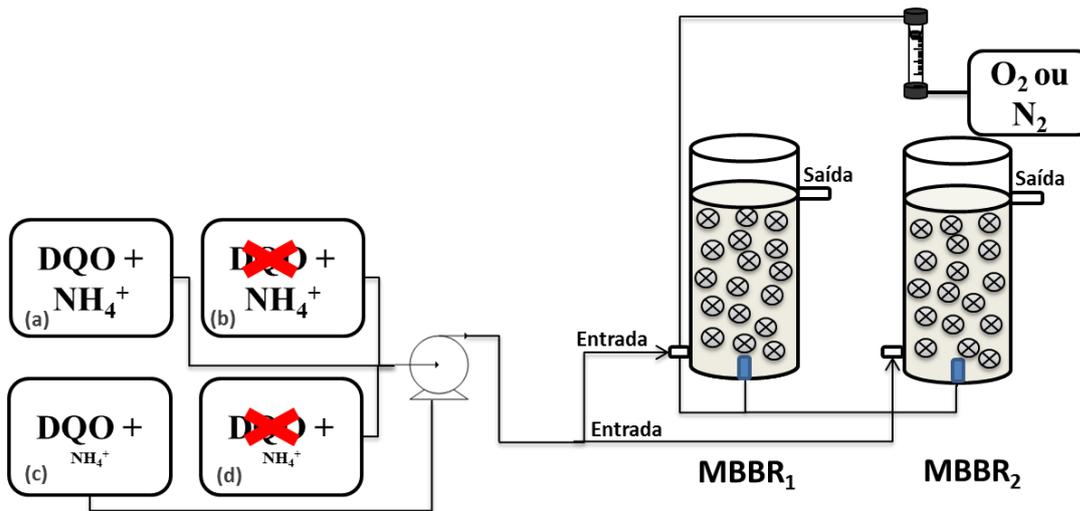


Figura 4.1.: - Representação esquemática dos reatores MBBR₁ e MBBR₂ operados em paralelo. As condições de alimentação, descritas doravante no item 3.3.2, estão ilustradas no lado esquerdo do esquema, conforme segue: (a) Alimentação contínua de amônio e matéria orgânica (expressa na forma de DQO); (b) Alimentação contínua de amônio sem o aporte de DQO afluente; (c) limitação de amônio com aporte de DQO afluente; (d) limitação de amônio sem o aporte de DQO afluente. Ar comprimido ou nitrogênio gasoso foram insuflados de acordo com o regime operacional (item 4.2.2).

O suporte utilizado em ambos os reatores foi o Kaldnes K1, com área superficial específica para adesão do biofilme de $500 \text{ m}^2/\text{m}^3$. A fração de enchimento utilizada nesse estudo foi de 40% em relação ao volume reacional de cada reator. Logo, a área total para adesão microbiana foi de $0,100 \text{ m}^2$.

Os reatores foram inoculados com biomassa oriunda de outros sistemas MBBR de escala de bancada em operação no laboratório e foram alimentados continuamente com efluente sintético, por meio de uma bomba peristáltica da marca LongerPump[®], modelo BT100-2J. O tempo de retenção hidráulica (TRH) utilizado foi de 6 horas.

A aeração e homogeneização dos reatores foram supridas por meio de borbulhamento de ar comprimido ou nitrogênio gasoso, realizado com o auxílio de um difusor tubular poroso que permitiu boa transferência de gás ao meio líquido e adequada movimentação dos suportes móveis. A vazão de ar ou nitrogênio gasoso foi controlada

por um rotâmetro, com vazão média de 4 L/min, de modo a manter concentração de oxigênio dissolvido próxima à saturação (6,5 - 7,0 mg/L) (borbulhamento de ar) ou nula (borbulhamento de N₂). A temperatura foi mantida em torno de 25±2°C e o pH mantido na faixa da neutralidade (7,0 - 7,5) por meio da adição de soluções de NaOH 1 mol/L e HCl 1 mol/L, quando necessário.

O sistema de tratamento foi alimentado com um efluente sintético similar ao descrito por Bassin *et al.* (2012). A composição do referido meio de alimentação está descrita na Tabela 4.1. O acetato foi adicionado somente nas condições experimentais com a presença de matéria orgânica. Nesses casos, a DQO afluente foi fixada em aproximadamente de 200 mg/L. A concentração de amônio correspondeu a 40 mgNH₄⁺-N/L, valor dentro da faixa comumente encontrada em esgoto doméstico (Von Sperling 1996). Ao efluente sintético foi adicionado uma quantidade de 0,5 mL de solução contendo elementos traços para cada litro de efluente sintético preparado, conforme descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.1.: Composição do efluente sintético utilizado para a alimentação dos sistemas MBBR.

Componentes	Concentração (mg/L)
Acetato	514
NH ₄ Cl	147
KH ₂ PO ₄	60
NaCl	220
NaHCO ₃	900

Tabela 4.2.: Composição da solução de micronutrientes suplementada ao efluente sintético.

Componentes	Concentração (mg/L)
EDTA	50000
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1036
ZnSO ₄	3220
CaCl ₂	12354
CoCl ₂	5540
CuSO ₄	1004
FeSO ₄	2728

4.2.2 Ensaio de longos períodos com limitação de amônio e oxigênio e avaliação da atividade nitrificante

Para avaliar o efeito da disponibilidade de amônio e oxigênio no desempenho da nitrificação e na atividade nitrificante, os dois reatores de leito móvel com biofilme (MBBR₁ e MBBR₂) foram submetidos a períodos com suprimento normal de amônio (40 mgNH₄⁺-N/L) e OD (condição de saturação) e a outros períodos com limitação de amônio ou ausência de oxigênio. Todos os testes realizados estão sumarizados na Tabela 4.3. As condições de alimentação, ilustradas na Figura 4.1, foram: DQO presente e alimentação normal de NH₄⁺ (a), DQO ausente e alimentação normal de NH₄⁺ (b), DQO presente e disponibilidade limitada de NH₄⁺ (c) DQO ausente e disponibilidade limitada de NH₄⁺ (d). A condição de presença ou ausência de DQO afluente foi imposta de modo a observar a influência da fonte de carbono e, por conseguinte, da comunidade heterotrófica, no coeficiente de decaimento das bactérias nitrificantes.

Nos testes com limitação de amônio, esse substrato foi adicionado apenas para satisfazer as necessidades nutricionais das bactérias. Desse modo, nos experimentos com presença de DQO externa afluente, a quantidade de amônio adicionada ao meio sintético de alimentação foi calculada de modo a obedecer a proporção DQO:N:P de

100:5:1 necessária ao anabolismo microbiano (HENZE *et al.*, 1997, FORSTER, 2003). Esta estratégia foi adotada de modo a investigar o efeito das condições de limitação de substrato somente na atividade (catabolismo) das bactérias autotróficas nitrificantes. Foram realizados quatro testes com limitação de amônio, em condições distintas. O primeiro teste com disponibilidade limitada de substrato teve duração de 8 dias, enquanto os outros três tiveram 25 dias de duração. Esse período com limitação de substrato foi estabelecido de maneira diferente em cada reator. O MBBR₁ foi mantido nessas condições de forma contínua em todos os testes. Em contrapartida, o MBBR₂ foi submetido a períodos intermitentes de disponibilidade limitada de substrato. Desse modo, para o teste de 8 dias, o reator foi submetido à disponibilidade limitada de substrato por 2 dias e alimentação normal por igual período, e assim sucessivamente até o término do experimento, totalizando 16 dias de teste no MBBR₂. Já para os testes de 25 dias, o reator foi exposto a condições alternadas de limitação de substrato e alimentação normal, com períodos ininterruptos de 5 dias em cada condição, até completar os 25 dias de experimento. Logo, foram 3 períodos de 5 dias com disponibilidade limitada de amônio e 2 períodos de alimentação normal.

Os testes com limitação de oxigênio também foram realizados com e sem a presença de matéria orgânica afluyente, a fim de avaliar o efeito do consórcio heterotrófico na atividade das bactérias nitrificantes. Nesses experimentos, não houve limitação de amônio. Ambos os testes tiveram duração total de 25 dias. Da mesma forma como realizado para os testes com disponibilidade limitada de amônio, o MBBR₁ foi submetido a períodos contínuos de ausência de oxigênio ao longo de todo o teste, enquanto que no MBBR₂ as condições de ausência e presença de oxigênio foram estabelecidas de forma intercalada, de 5 em 5 dias. A manutenção de condições

anaeróbias (ausência de oxigênio dissolvido) foi atingida por meio da substituição do ar comprimido por nitrogênio gasoso (sem contaminação com oxigênio), o qual foi suprido por meio dos difusores porosos. A vazão de nitrogênio foi semelhante à vazão de ar comprimido, de modo a manter constante as condições hidrodinâmicas nos reatores ao longo dos períodos aeróbios – anaeróbios intercalados.

Vale mencionar que, antes dos testes de limitação de amônio ou ausência de oxigênio sem a presença de DQO afluente, ambos os reatores já estavam sendo operados em condições autotróficas em estado estacionário (massa de biofilme estável).

Tabela 4.3.: Testes realizados em diversas condições quanto à disponibilidade de amônio e oxigênio.

Condições Experimentais	Períodos com limitação de amônio ou O ₂ (dias)		
	MBBR ₁	MBBR ₂	
Condições normais (C.N.)	Alimentação contínua de amônio (Com DQO)	-	-
Teste 1	Limitação de amônio – (Com DQO) ^a	8	8 ^c
Teste 2	Limitação de amônio – (Com DQO) ^a	25	15 ^d
Teste 3	Limitação de amônio – (Com DQO) ^a	25	15 ^d
Teste 4	Limitação de amônio – (Sem DQO) ^a	25	15 ^d
Teste 5	Limitação de oxigênio – (Sem DQO) ^b	25	15 ^d
Teste 6	Limitação de oxigênio – (Com DQO) ^b	25	15 ^d

^a Oxigênio foi alimentado normalmente (condição de saturação).

^b Amônio foi alimentado normalmente.

^c Foram intercalados 2 dias com alimentação normal e 2 dias de limitação de amônio durante 16 dias, totalizando um período de limitação de amônio de 8 dias.

^d Foram intercalados 5 dias com alimentação normal e 5 dias de limitação de amônio/oxigênio durante 25 dias, totalizando um período de limitação de amônio/oxigênio de 15 dias.

Ensaio cinéticos para determinar a taxa específica nitrificante foram realizados ao longo dos testes 3, 4, 5 e 6 com limitação de amônio ou oxigênio, com objetivo de avaliar as possíveis alterações no potencial de nitrificação e coeficiente de decaimento nitrificante ao longo dos testes. Esses testes cinéticos foram realizados separadamente

em frascos Erlenmeyer (Figura 4.2), em paralelo à operação dos reatores MBBR₁ e MBBR₂, pelo menos 3 vezes por semana. Tal procedimento foi adotado de modo que as condições necessárias para determinação da atividade nitrificante (uso pulsos de amônio e borbulhamento de ar comprimido) não interferissem nos testes de longa duração que estavam ocorrendo no interior do reator.



Figura 4.2.: Ensaio do teste de taxa específica de bactérias nitrificantes realizados durante os períodos de limitação de amônio ou oxigênio.

Dois frascos Erlenmeyer com volume total de 125 mL foram adaptados para o ensaio, aos quais foram inseridos 30 suportes retirados dos reatores MBBR₁ e MBBR₂. Esses suportes foram previamente lavados com água destilada com objetivo de retirar quaisquer resquícios de substrato orgânico e nitrogenado. A quantidade de suportes adicionada ao meio reacional de cada frasco levou a uma concentração de sólidos aderidos voláteis (SAV) equivalente à aproximadamente 64,7% do total de SAV presentes no MBBR₁ e MBBR₂. O meio utilizado para o teste apresentou os mesmos componentes do meio de alimentação dos reatores, com exceção de fonte de carbono (DQO), a qual não foi adicionada, e de amônio, que foi dosado posteriormente. Esse último, em particular, foi adicionado para determinar a atividade nitrificante do

consórcio microbiano. A temperatura e pH dos testes foram mantidos em $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e 7,5, respectivamente. Este último parâmetro foi controlado pela adição de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L.

No início do teste, foi efetuado um pulso de solução concentrada de cloreto de amônio de modo a obter uma concentração inicial $50 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/L}$. O decaimento da concentração de amônio ao longo do tempo foi acompanhado regularmente a cada 15 min na primeira hora de teste, e depois em intervalos de 30 min até o final do teste, cuja duração foi de 2 h. A taxa específica de conversão de amônio foi estimada a partir da regressão linear da concentração de amônio ao longo do tempo, levando em consideração a concentração de SAV em cada frasco. A concentração de sólidos suspensos foi muito baixa em todas as condições operacionais e, portanto, negligenciada nos cálculos.

4.2.3 Determinação do coeficiente de decaimento das nitrificantes

Com objetivo de avaliar o efeito da limitação de amônio e oxigênio no decaimento autotrófico, foi calculado o coeficiente de decaimento celular nitrificante para os testes 3, 4, 5 e 6, conforme descrito por Salem *et al.* (2006). A taxa de referência (R_0) utilizada para os cálculos foi a taxa específica nitrificante ($\text{mgNH}_4^+-\text{N}/(\text{gSAV}\cdot\text{h})$), obtida no início dos testes de longos períodos de limitação de substrato de oxigênio, isto é, antes dos períodos de perturbação. O tempo final dos testes foi designado pelo termo Td. Para os testes contínuos de limitação de substrato e oxigênio, Td foi fixado em 25 dias. Por sua vez, no caso dos testes com alimentação intermitente, o Td foi considerado como o intervalo de tempo durante o qual ocorreu limitação de um dos dois componentes (NH_4 ou OD) (5 dias). A taxa específica de nitrificação (R_t) foi obtida ao

final de cada período de limitação de substrato e oxigênio. Desta forma, foi possível calcular o coeficiente de decaimento das bactérias nitrificantes (b_a), por meio do arranjo das Equações (4.1), (4.2) e (4.3), convertendo-se na Equação final (4.4), conforme segue:

$$R_0 = \mu_a * X_0 / Y_a \quad (4.1)$$

$$R_t = \mu_a * X_t / Y_a \quad (4.2)$$

Y_a é o coeficiente de rendimento autotrófico, μ_a é a taxa específica de crescimento autotrófico, X_0 é a concentração inicial de nitrificantes (gSAV/L) e X_t é a concentração de nitrificantes após um tempo (t).

A X_t pode ser descrita pela Equação (4.3):

$$X_t = X_0 * e^{(-b_a * t_d)} \quad (4.3)$$

Logo, o coeficiente de decaimento pode ser obtida a partir da combinação das Equações (4.1), (4.2) e (4.3), conforme segue:

$$b_a = \frac{-\ln(R_t/R_0)}{t_d} \quad (4.4)$$

4.2.4 Sólidos Aderidos Voláteis e Totais

Os sólidos aderidos totais (SAT) e voláteis (SAV) foram determinados a partir da extração do biofilme dos suportes com auxílio de ultrassom. O método consistiu em adicionar três suportes em um tubo Falcon de 15 mL, preenchidos com água destilada de modo que os suportes ficassem totalmente submersos. Em seguida, os suportes foram

submetidos à sonicação em água aquecida (50°C) por aproximadamente 15 min ou mais, dependendo da quantidade de sólidos presentes no suporte. O líquido contendo todos os sólidos desprendidos do suporte foi vertido em cadinhos de porcelana previamente preparados para o teste, os quais foram, em seguida, secos em estufa a 105°C por aproximadamente 24 h. Após a secagem, os cadinhos foram resfriados até que a temperatura ambiente fosse atingida e, em seguida, pesados para fornecer o teor de SAT (P1). Logo após a pesagem, os cadinhos foram calcinados em mufla a 550°C por 1 h e pesados novamente (P2). Assim, pela diferença entre P1 e P2 foi possível calcular a concentração de SAV. É importante salientar que todos os ensaios de determinação de sólidos imobilizados foram realizados em duplicata.

4.2.5 Métodos analíticos

Diversos parâmetros foram monitorados ao longo da operação dos sistemas MBBR₁ e MBBR₂, a saber: nitrogênio amoniacal (amônio), nitrito, nitrato, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV), pH, temperatura e oxigênio dissolvido. A concentração de amônio foi determinada por meio do reagente de Nessler – método 4500-NH₃ (APHA, 1992). Já as outras frações nitrogenadas (nitrito e nitrato) foram analisadas utilizando-se kits colorimétricos *NitriVer* e *NitraVer* da Hach, respectivamente. A DQO foi analisada segundo o método colorimétrico 5220 (APHA, 2005). Os sólidos suspensos voláteis e totais foram determinados conforme método gravimétrico 2540 (APHA, 2005). pH e temperatura foram monitorados por meio de um eletrodo da marca Digimed DM-23 e o oxigênio dissolvido (OD) foi mensurado com o auxílio de um oxímetro WTW InoLabOxi 7310.

Todos os parâmetros relacionados foram monitorados pelo menos 2 vezes por semana durante o período de operação dos reatores.

4.3 Resultados

4.3.1 Operação contínua dos sistemas MBBR: remoção de matéria orgânica e perfil de sólidos suspensos e imobilizados

Os reatores MBBR₁ e MBBR₂ foram alimentados em paralelo com efluente sintético sob as mesmas condições operacionais. Conforme exposto no item 4.2 (Materiais e Métodos), durante os testes, o MBBR₁ foi submetido a diferentes períodos ininterruptos de limitação de amônio, sendo que esse último substrato foi adicionado somente para satisfazer o requerimento anabólico do consórcio microbiano presente no reator. No teste 1, esse período foi de 8 dias e nos outros testes foi de 25 dias. Já o segundo reator (MBBR₂) foi operado sob regime intermitente de limitação de amônio. No teste 1, o reator foi submetido aos mesmos 8 dias com disponibilidade limitada de substrato, embora de forma intercalada (2 dias com limitação de amônio seguidos de 2 dias com alimentação normal), totalizando 16 dias de teste. Em contrapartida, nos demais testes cuja duração foi de 25 dias, alternou-se condições de limitação de amônio e alimentação normal de 5 em 5 dias.

A remoção de matéria orgânica não foi afetada nos dois reatores durante os testes com disponibilidade limitada de amônio (testes 1 – 3), conforme ilustrado nas Figuras 4.3 e 4.4. Este comportamento já era esperado, uma vez que foi mantida uma quantidade mínima de amônio suficiente para não privar as bactérias heterotróficas de fonte de nitrogênio para o seu crescimento (HENZE *et al.*, 1997, FORSTER, 2003).

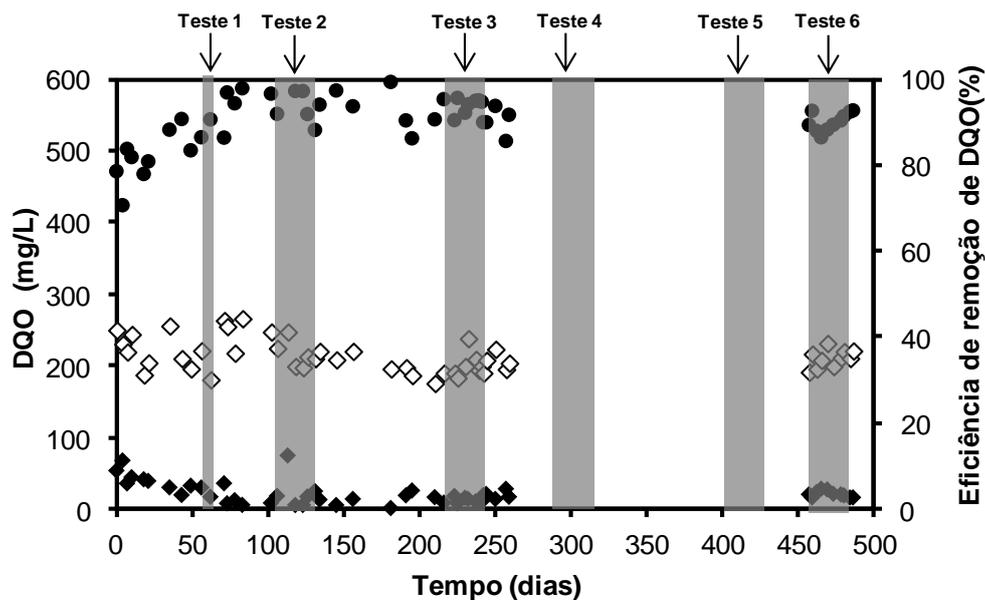


Figura 4.3.: DQO afluente (\diamond), DQO efluente (\blacklozenge) e eficiência de remoção de DQO (\bullet) no MBBR₁. Os intervalos destacados em cinza indicam os períodos nos quais o reator foi submetido à disponibilidade limitada de amônio (1, 2, 3 e 4) ou oxigênio (5 e 6). Nos testes 4 e 5 não houve adição de DQO ao meio de alimentação.

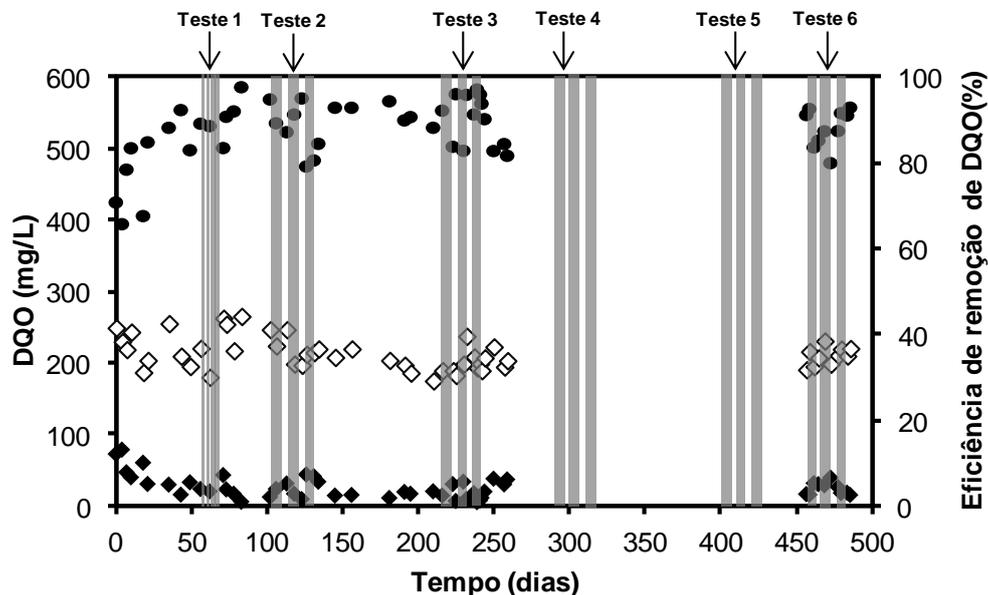


Figura 4.4.: DQO afluente (\diamond), DQO efluente (\blacklozenge) e eficiência de remoção de DQO (\bullet) no MBBR₂. Os intervalos destacados em cinza indicam os períodos nos quais o reator foi submetido à disponibilidade limitada de amônio (1, 2, 3 e 4) ou oxigênio (5 e 6). Não houve adição de fonte de carbono orgânico ao afluente durante os testes 4 e 5.

Já nos testes com limitação de oxigênio e presença de DQO afluyente (teste 6), a remoção de matéria orgânica também não foi afetada. A remoção praticamente completa de matéria orgânica foi, possivelmente, obtida devido à ação de bactérias anaeróbias facultativas, possivelmente estabelecidas na parte interna do biofilme (BEYENAL & LEWANDOWSKI, 2014). Elawwad *et al.* (2013) também observaram remoção completa de DQO durante os longos períodos de limitação de amônio e oxigênio em reatores com biofilme. Esses resultados demonstram que a ação dessas bactérias é importante do ponto de vista operacional, uma vez que condições de anaerobiose podem ser comuns em plantas de tratamento de efluentes, não afetando, portanto a remoção de DQO.

O acompanhamento da dinâmica dos sólidos aderidos voláteis (SAV) e dos sólidos suspensos voláteis (SSV) foi realizado ao longo da operação dos reatores, tanto nos regimes com a presença como na ausência de matéria orgânica afluyente. A Figura 4.5 sumariza a concentração média de sólidos nos reatores em cada condição. Conforme pode ser observado, as concentrações de sólidos imobilizados nos períodos com presença ou ausência de DQO, seja nos testes com limitação amônio ou oxigênio, são similares em ambos os reatores. Os valores médios da concentração de SAV no MBBR₁ e MBBR₂ foram de, respectivamente, 1,46 gSAV/L e 1,49 gSAV/L nos regimes com aporte orgânico e de 0,38 gSAV/L e 0,37 gSAV/L nas condições operacionais sem aporte de matéria orgânica. Os valores de SAV na ausência de DQO afluyente foram aproximadamente 75% menores quando comparados com aqueles obtidos na presença de DQO. De fato, a retirada da matéria orgânica afluyente fez com que o crescimento heterotrófico fosse diminuído, o que resultou no decréscimo abrupto da biomassa imobilizada nos suportes. Com base nos perfis de matéria orgânica e sólidos ao longo da

operação dos reatores, é possível inferir que ambos apresentaram comportamento semelhante.

Ademais, essa redução de 75% de biomassa ativa concorda perfeitamente com os resultados obtidos para remoção de DQO, quando o reator foi operado sem oxigênio. Depreende-se, portanto, que a redução da biomassa heterotrófica não afetou a remoção de DQO, indicando a ação de bactérias anaeróbias facultativas na remoção da DQO.

A quantidade de biomassa imobilizada nos suportes de sistemas MBBR é fortemente influenciada pelo aporte de matéria orgânica. Alguns trabalhos relatam que essa concentração pode variar de 2 a 8 gSAV/L (RUSTEN *et al.*, 1998), dependendo da concentração de matéria orgânica afluyente.

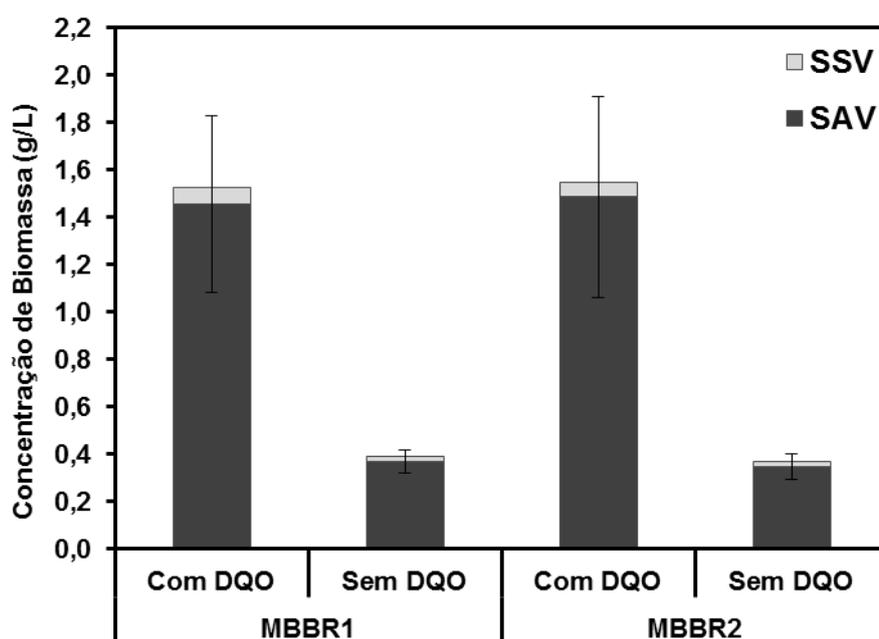


Figura 4.5.: Concentração média de sólidos aderidos voláteis (SAV) e sólidos suspensos voláteis (SSV) nos reatores MBBR₁ e MBBR₂. Os valores apresentam uma média dos resultados obtidos nos períodos operacionais com presença e ausência de matéria orgânica.

A relação entre a concentração de sólidos aderidos voláteis e sólidos aderidos totais (SAV/SAT) nos reatores MBBR₁ e MBBR₂ foi constante durante todo o período de operação, inclusive nos períodos sem alimentação de matéria orgânica, variando de 0,83 a 0,99. Esses valores denotam uma biomassa com grande percentual de orgânicos, condizentes com os reportados na literatura para sistemas MBBR (CAO *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2016).

4.3.2 Remoção de amônio

As Figuras 4.6 e 4.7 apresentam os resultados relativos à remoção de amônio nos reatores MBBR₁ e MBBR₂. Em condições normais de operação, ou seja, sem limitação de substrato ou oxigênio, a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal alcançou valores superiores a 97%. Nesse período, nenhum problema operacional foi observado, de modo a que a realização dos testes não foi prejudicada.

Um dos fatores que pode influenciar as taxas de crescimento ou decaimento microbiano é o pH, que incide diretamente na acidez ou alcalinidade do meio aquoso, tornando o mesmo um dos fatores mais importantes em processos biológicos, especialmente em sistemas nitrificantes (METCALF & EDDY, 2016). Nos reatores MBBR₁ e MBBR₂, o pH permaneceu constante durante todo período operacional, com valores variando de 7,0 a 7,5, inclusive nos períodos com alimentação normal, durante os quais a taxa de nitrificação foi máxima. A manutenção do pH em valores próximos à neutralidade foi essencial para que não houvesse interferência desse parâmetro nos resultados obtidos nos testes com disponibilidade limitada de substrato.

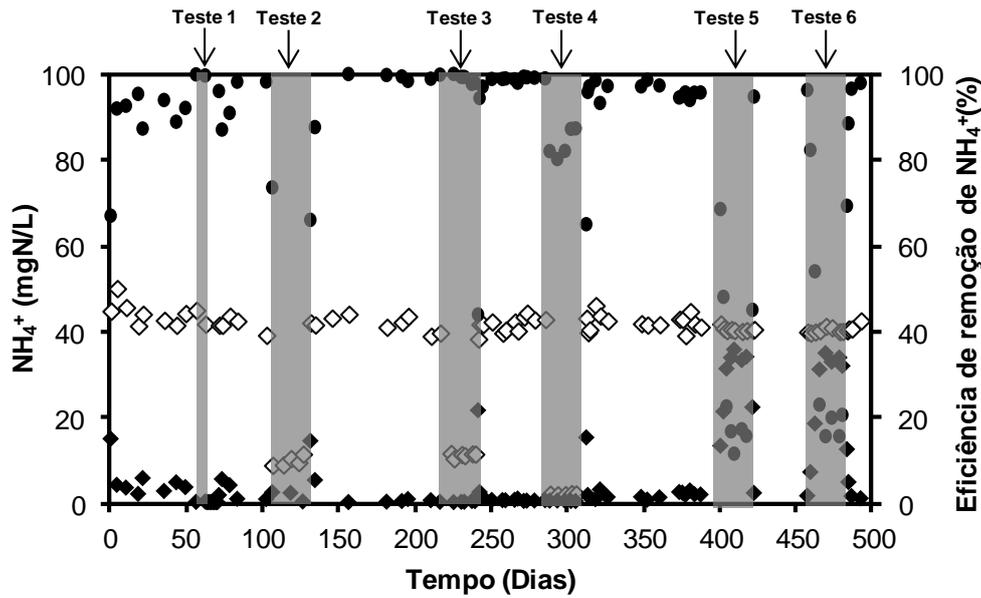


Figura 4.6.: $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ afluente (\diamond), $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ efluente (\blacklozenge) e eficiência de remoção de $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ (\bullet) no MBBR_1 . Os intervalos destacados em cinza indicam os períodos durante os quais o reator foi submetido à disponibilidade limitada de amônio (1, 2, 3 e 4) e oxigênio (5 e 6).

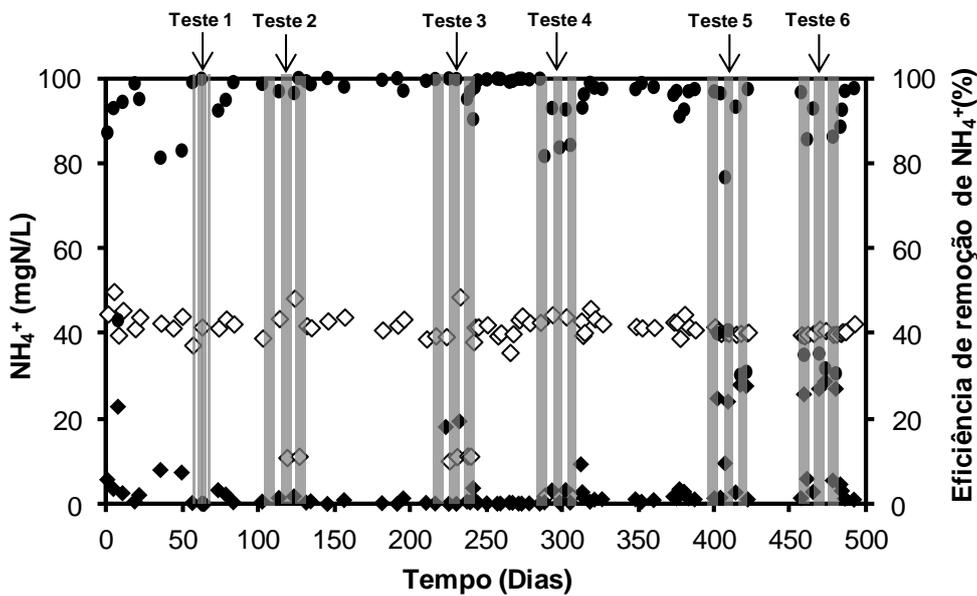


Figura 4.7.: $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ afluente (\diamond), $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ efluente (\blacklozenge) e eficiência de remoção de $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ (\bullet) no MBBR_2 . Os intervalos destacados em cinza indicam os períodos durante os quais o reator foi submetido à disponibilidade limitada de amônio (1, 2, 3 e 4) e oxigênio (5 e 6).

Como pode ser observado, o desempenho da nitrificação no MBBR₁ após o período de 8 dias ininterruptos com disponibilidade limitada de substrato (teste 1) não foi alterado. O mesmo é válido para o MBBR₂, o qual foi submetido a períodos intercalados (de 2 em 2 dias) com e sem disponibilidade limitada de amônio. Esse primeiro ensaio sugere que um sistema de tratamento empregando biomassa imobilizada não terá seu desempenho de remoção de amônio afetado caso seja submetido a períodos relativamente curtos com limitação de substrato (amônio).

Nos experimentos subsequentes (testes 2 – 4), a duração do período de limitação de amônio foi ainda maior, aproximadamente três vezes superior em relação ao teste 1. No teste 2, durante o qual o MBBR₁ foi submetido a um período contínuo de 25 dias com disponibilidade limitada de amônio, a eficiência de nitrificação diminuiu de 99% (antes do teste) para 66% (imediatamente após os 25 dias de teste). O tempo requerido para recuperação dos níveis de remoção de amônio obtidos antes do teste foi de 15 dias. Esse tempo pode ser considerado longo quando comparado ao obtido no trabalho de Yilmaz e colaboradores (2007). No entanto, esses autores lançaram mão de uma estratégia na qual procedeu-se ao aumento gradual da concentração de amônio após 5 semanas sem receber efluente proveniente de matadouro e realizou-se a adição semanal de pulsos de amônio e nitrito, alternando-se somente condições aeróbias, anaeróbias/anóxicas, visando à manutenção da atividade das bactérias nitrificantes.

Essa elevação gradual dos níveis de amônio permitiu a recuperação total de um reator de batelada sequencial com biomassa em suspensão em apenas 4 dias. Já o estudo conduzido por Pijuan *et al.* (2009), revelou a necessidade de 3 semanas para a recuperação da remoção de nutrientes (amônio, nitrato e fósforo), em um sistema de

lodo granular que foi submetido a um regime de inanição contínuo de 4 - 5 semanas, tempo similar ao empregado nesse trabalho.

No entanto, nos experimentos seguintes, apesar da eficiência de remoção de amônio ter caído acentuadamente para 44% (teste 3) e 65% (teste 4) após os 25 dias de limitação de amônio, o tempo necessário para recuperação total de nitrificação não ultrapassou 2 dias, de modo que 98% de remoção de amônio foi obtido após esse período em ambos os testes. Esse curto tempo de recuperação deve-se, muito provavelmente, ao fato das bactérias nitrificantes adaptarem-se à variação na concentração de amônio a que foram submetidas. Dessa forma, sistemas com biomassa imobilizada em escala real que venham a sofrer oscilações da alimentação em termos de substrato, especialmente amônio, podem ter rápida recuperação da nitrificação, causando impacto reduzido na eficiência do tratamento. No entanto, fazem-se necessários testes em escala piloto e real de modo a comprovar tais observações, uma vez que as condições reais nos sistemas de tratamento de efluente costumam variar dos sistemas em escala de bancada.

No MBBR₂, no entanto, o percentual de remoção de amônio não foi afetado negativamente ao longo dos 25 dias dos testes 2, 3 e 4, durante os quais intercalou-se 5 dias com disponibilidade limitada de amônio e 5 dias com alimentação normal. De fato, o mesmo manteve-se constante e próximo a 100% imediatamente após o término dos referidos experimentos (Figura 4.7). Preliminarmente, esse resultado indica que a adição de amônio ao reator em intervalos regulares pode ajudar na recuperação do consórcio nitrificante quando submetido à limitação de substrato por longos períodos. Apesar do bom resultado de recuperação quase instantânea da nitrificação, deverá ser avaliado se há realmente necessidade de adição de substrato externo (amônio) em função das

exigências do tratamento, visto que essa estratégia pode significar custos extra ao tratamento de efluente.

De qualquer modo, o retorno a elevados índices de remoção de amônio após um período contínuo relativamente longo sem esse substrato nitrogenado foi relativamente rápido, o que denota a capacidade de recuperação do consórcio nitrificante, mesmo quando submetido a esse tipo de perturbação. É possível que a estrutura do biofilme possa ter contribuído para minimizar o efeito da oscilação da carga de amônio, evitando, por exemplo, o desprendimento excessivo de biomassa nitrificante (FURUMAI & RITTMANN, 1994). De fato, a determinação dos sólidos aderidos voláteis no início, durante e após os testes de limitação de substrato revelou que o desprendimento observado foi muito baixo, chegando a uma queda percentual de SAV de aproximadamente $10 \pm 5\%$. Essa baixa perda de biomassa imobilizada no decorrer dos testes com limitação de amônio enfatiza a robustez dos sistemas com biomassa aderida frente a perturbações operacionais.

Após o término dos testes 5 e 6, durante os quais os reatores foram privados de oxigênio, o sistema recuperou-se rapidamente tanto no MBBR₁ (limitação contínua de oxigênio) quanto no MBBR₂ (limitação intermitente de oxigênio). No MBBR₁, a eficiência de remoção de amônio caiu para 11% no teste 5 (sem DQO) e para 15% no teste 6 (com DQO) (Figura 4.6). Parte desses percentuais de remoção pode ser atribuída ao uso do amônio para crescimento celular, especialmente no teste 6, que havia presença de matéria orgânica. Ademais, pontos de difusão de oxigênio podem ter ocorrido na interface líquido-gás do reator, propiciando a ocorrência de baixos níveis de nitrificação. A recuperação, em contrapartida, foi considerada rápida, uma vez que o percentual de remoção de amônio atingiu 100% em aproximadamente 4 dias, em ambos

os testes de limitação contínua de oxigênio. Esse resultado denota que as bactérias nitrificantes se mantiveram no biofilme, mesmo em condições adversas de ausência de oxigênio.

Em relação ao reator com suprimento intermitente de oxigênio (MBBR₂), menor perda de eficiência de remoção de amônio foi observada. O percentual de remoção de amônio diminuiu para 30% em ambos os testes 5 e 6, e o desempenho do reator anterior ao teste foi restabelecido após 2 dias em condições normais de operação. Os resultados demonstram que a ausência de oxigênio causou uma redução mais acentuada na eficiência de remoção de amônio em comparação com os testes com limitação de amônio. Apesar disso, não se observou grandes perdas de biofilme, da mesma forma como observado nos testes com limitação de amônio.

Além do acompanhamento das concentrações de amônio, também foram realizadas análises de outros compostos nitrogenados, como nitrito e nitrato, com o objetivo de entender melhor o processo de nitrificação em condições de limitação de amônio e ausência de oxigênio dissolvido. A Figura 4.8 apresenta o balanço de nitrogênio nos reatores durante os períodos em que os mesmos foram submetidos a condições normais de operação e nos testes 1 - 6.

Nos períodos em condições normais de operação, a concentração de nitrogênio total no efluente de ambos os reatores (levando em conta o amônio não removido e o nitrito e nitrato formados na nitrificação) foi de aproximadamente 26,5 mgN/L. A diferença entre esse valor e a concentração de nitrogênio total afluente deve-se ao uso de nitrogênio para crescimento celular (HENZE *et al.*, 1997; FORSTER, 2003), desprezando perdas de nitrogênio solúvel por desnitrificação. Já para os períodos de limitação de amônio (testes 1, 2 e 3), nos quais a concentração afluente desse substrato

foi de apenas 10 mgNH₄⁺-N/L para obedecer a relação DQO:N:P (100:5:1) necessária ao anabolismo bacteriano, apenas uma pequena fração (em torno de 15%) do amônio foi nitrificada a nitrato/nitrito, de modo que a fração majoritária restante do substrato nitrogenado foi utilizada pelas bactérias para crescimento celular. O mesmo foi observado para o teste 4, no qual a quantidade dosada de amônio foi ainda menor (2 mgNH₄⁺-N/L) em função da ausência de DQO afluyente, sendo o nitrogênio utilizado para o crescimento das bactérias autotróficas (METCALF & EDDY, 2016).

Nos experimentos com limitação de oxigênio (testes 5 e 6), a maior parte do nitrogênio total permaneceu na forma amoniacal não nitrificada, conforme já esperado. No entanto, a manutenção de condição completamente anaeróbia nos reatores de pequena escala foi dificultosa, mesmo com o borbulhamento de N₂, em função da pequena altura da coluna de líquido. Desse modo, condições microaerofílicas foram observadas no *bulk*, particularmente na interface líquido-gás do reator. Por conseguinte, uma pequena fração do nitrogênio amoniacal foi oxidada a nitrato e nitrito. Além disso, nesses dois últimos testes, a parcela de perda de nitrogênio solúvel no meio devido ao seu uso para crescimento celular foi menor em relação às condições normais de operação em função do reduzido crescimento celular em condições anaeróbias.

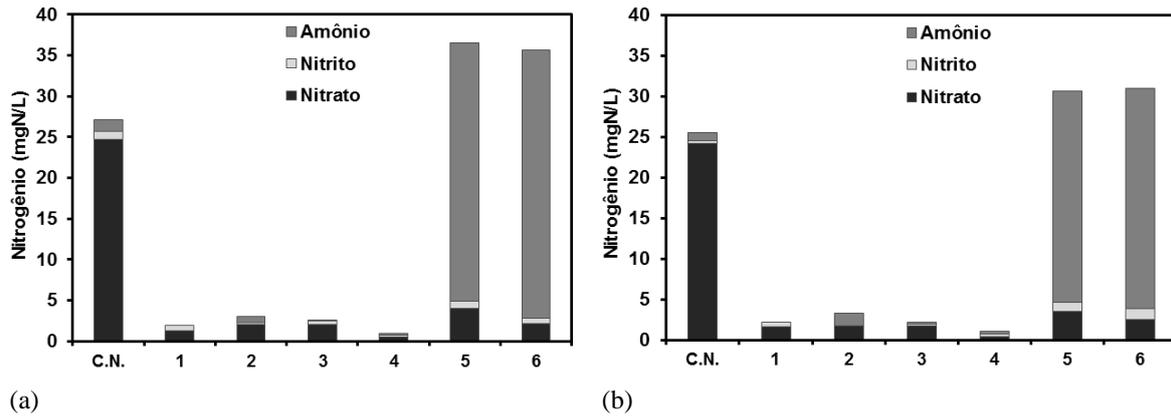


Figura 4.8.: Compostos nitrogenados na corrente de saída ao longo da operação dos reatores em condições normais de operação (C.N.) e nos testes 1 – 6 (a) MBBR₁ e (b) MBBR₂.

4.3.3 Taxa específica nitrificante e coeficiente de decaimento em condições de limitação de amônio

Com o objetivo de avaliar as possíveis alterações na atividade da biomassa nitrificante durante os longos períodos de limitação de amônio, procedeu-se aos testes de nitrificação realizados em batelada, conforme descrito no item 4.2.2. A Figura 4.9 (a – d) mostra o comportamento da atividade nitrificante no decorrer dos testes 3 e 4, nos quais os reatores MBBR₁ e MBBR₂ foram submetidos, respectivamente, a um período de 25 dias com limitação contínua (Figura 4.9 (a, c)) e limitação intermitente (5 em 5 dias) (Figura 4.9 (b, d) e) de amônio. Os resultados obtidos a partir desses testes de atividade nitrificante estão sumarizados na Tabela 4.4.

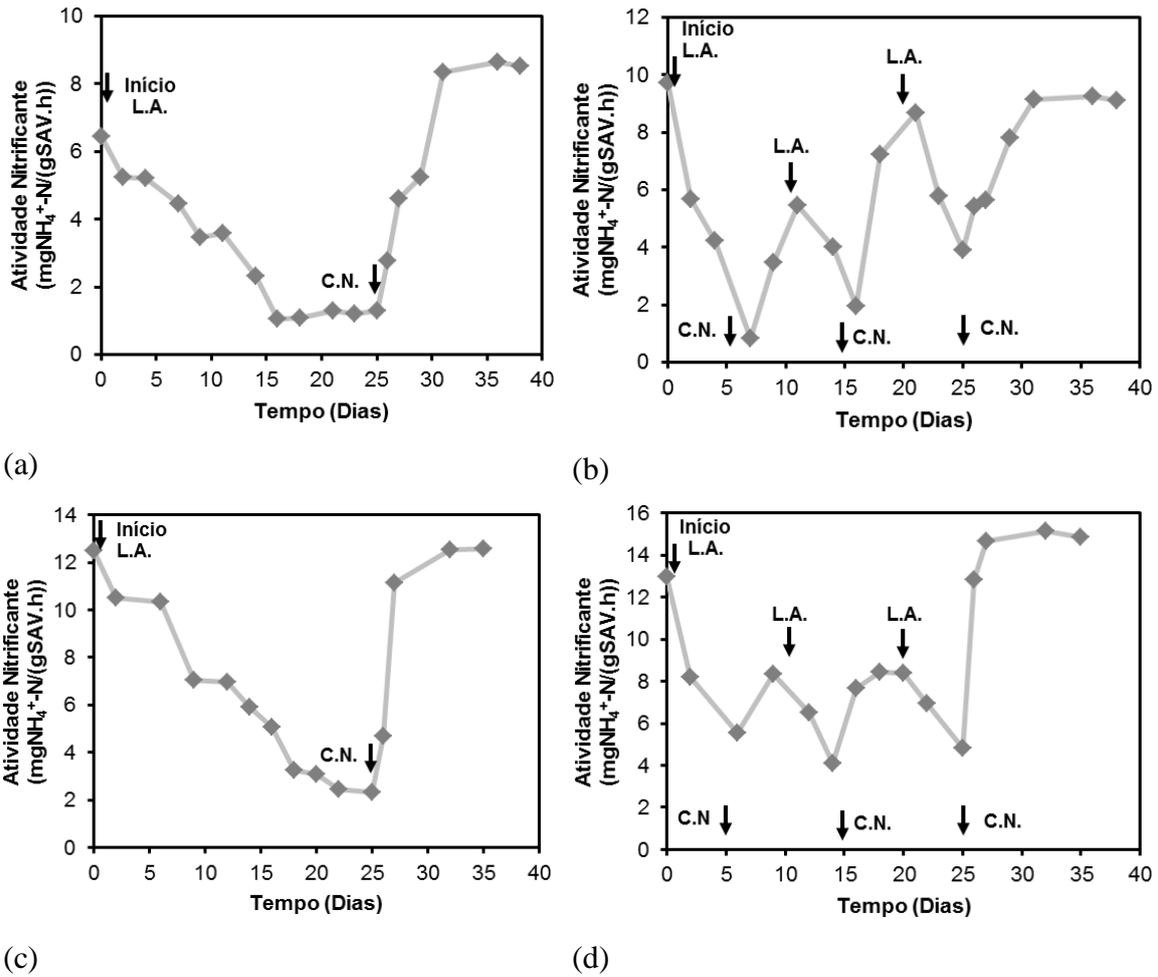


Figura 4.9.: Taxa específica nitrificante monitorada ao longo dos testes de 25 dias com limitação contínua (MBBR₁) e intermitente de amônio (MBBR₂). (a) MBBR₁ – Teste 3 (com DQO); (b) MBBR₂ – Teste 3 (com DQO); (c) MBBR₁ – Teste 4 (sem DQO) e (d) MBBR₂ – Teste 4 (sem DQO).

¹ L.A. (Limitação de Amônio). Indica o período a partir do qual se iniciou a limitação de amônio.

² C.N. (Condições normais de alimentação). Indica o período a partir do qual foram estabelecidas condições normais de alimentação.

Tabela 4.4.: Taxa específica nitrificante ao longo dos testes de 25 dias com limitação contínua (MBBR₁) e intermitente de amônio (MBBR₂)

Testes de limitação de amônio		Taxa Específica Nitrificante (mgNH ₄ ⁺ -N/(gSAV.h))			Intervalo de tempo (dias)
		Limitação de Amônio (L.A.)	Condições Normais de Alimentação (C.N)	Taxa Final Estável	
MBBR ₁	Teste 3 ^a – Contínuo	6,44	1,20	8,50	25
MBBR ₁	Teste 4 ^b – Contínuo	12,50	2,31	12,10	25
MBBR ₂	Teste 3 ^a - Intermitente	9,72	0,83	9,20	5
	Teste 3 ^a - Intermitente	5,46	1,97		
	Teste 3 ^a - Intermitente	8,69	3,91		
MBBR ₂	Teste 4 ^b - Intermitente	13,00	5,54	14,90	5
	Teste 4 ^b - Intermitente	8,34	4,12		
	Teste 4 ^b - Intermitente	8,44	4,84		

^aTeste 3 – com matéria orgânica (DQO afluyente presente)

^bTeste 4 – sem matéria orgânica (DQO afluyente ausente)

Conforme pode ser observado na Figura 4.9 (a, c), no reator submetido ao período contínuo de limitação de amônio, a atividade nitrificante decaiu gradualmente, tanto na presença como na ausência de DQO afluyente. No MBBR₁ (Figura 4.9(a)), após aproximadamente 15 dias de teste, a atividade nitrificante estabilizou-se em valores próximos a 1 mgNH₄⁺-N/(gSAV.h). Esse valor de atividade é baixo quando comparado ao valor de atividade nitrificante no início do teste (6,44 mgNH₄⁺-N/(gSAV.h)), demonstrando dessa forma, uma acentuada perda do potencial nitrificante ao longo do teste de limitação de amônio. Do mesmo modo, na Figura 4.9(c), pode-se observar um decaimento gradual da atividade nitrificante no teste com limitação contínua de amônio usando meio autotrófico, estabilizando em 2,3 mgNH₄⁺-N/(gSAV.h). Porém, neste segundo caso, o decaimento da atividade nitrificante ocorreu de forma mais lenta, conforme ilustrado na Figura 4.10, que apresenta a diminuição da atividade nitrificante nos testes 3 e 4 com limitação contínua de substrato. De fato, os valores médios do coeficiente de decaimento para os testes 3 e 4 (MBBR₁) após os 25 dias de teste foram

de $0,11 \text{ d}^{-1}$ e $0,08 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. No entanto, a perda de atividade ao final do experimento em relação à atividade inicial foi a mesma nos dois testes (3 e 4), isto é, de 80%. Além disso, a atividade específica nitrificante decaiu rapidamente nos 16 primeiros dias do teste 3, estabilizando-se e permanecendo quase que constante após esse período. Em contrapartida, o decaimento apresentado no teste 4 apresentou perfil quase linear ao longo de 25 dias.

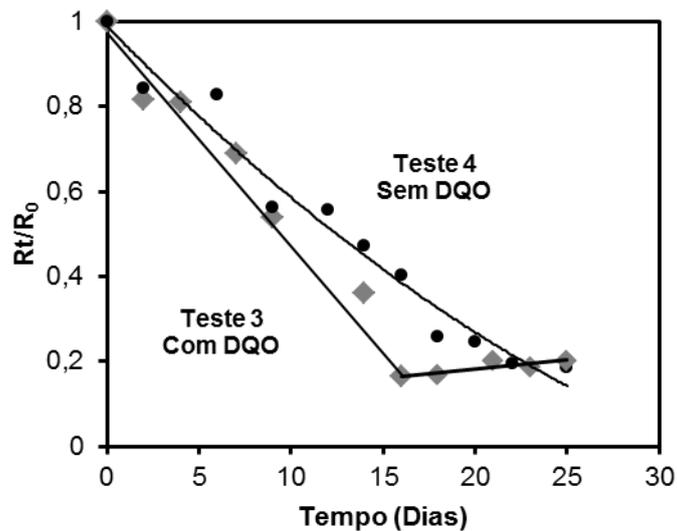


Figura 4.10.: Redução da atividade nitrificante ao longo de 25 dias contínuos de limitação de substrato (amônio) no MBBR₁ com (◆) e sem (●) a presença de DQO no afluente.

Já a Figura 4.9 (b, d), que apresenta, respectivamente, os testes 3 e 4 com limitação intermitente de amônio no MBBR₂, indica que a adição esporádica de substrato (amônio) ao longo do tempo não conseguiu manter a atividade nitrificante constante. Pelo contrário, as mudanças bruscas de concentração de amônio, que ocorreram de 5 em 5 dias até completar o total de 25 dias de teste, causaram um estresse nas bactérias nitrificantes, resultando em quedas na taxa específica nitrificante. A atividade nitrificante mínima foi de $0,83 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$ no teste 3 (com DQO afluente) e o tempo de recuperação da atividade nitrificante ao final do teste foi de 5

dias aproximadamente. No teste 4 (sem DQO), perfis semelhantes ao teste 3 foram observados, porém as quedas de atividade foram menos acentuadas. Adicionalmente, ao final do experimento, o tempo de recuperação para retornar à atividade inicial foi aproximadamente 2 dias. A atividade mínima em condições autotróficas foi de 4,12 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$.

Analisando somente os resultados obtidos no teste 3 em ambos os reatores (Figura 4.9 (a, b) e Tabela 4.4), observou-se que a taxa específica nitrificante ao final do teste de limitação contínua de amônio (MBBR₁) permaneceu próxima a 1 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$ por aproximadamente 10 dias. Em compensação, no MBBR₂, submetido à alimentação intermitente de amônio (Figura 4.9(b) e Tabela 4.4), observou-se que à medida que o sistema era submetido à limitação de amônio (5 em 5 dias), a redução da taxa específica nitrificante durante os períodos de escassez de substrato foi se tornando menos intensa. De fato, as atividades nitrificantes mínimas após o primeiro, segundo e terceiro período de 5 dias de limitação de substrato foram de 0,83 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$, 1,97 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$ e 3,91 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$, respectivamente. Esses resultados refletem certa adaptação das bactérias nitrificantes a períodos sequenciais de limitação de amônio.

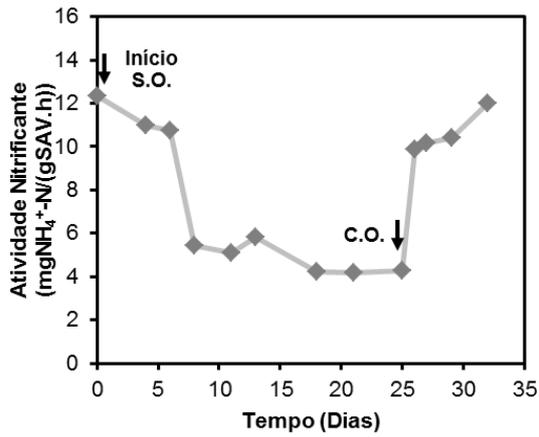
Analisando-se os dados do teste 4 no MBBR₁ e MBBR₂ (Figura 4.9 (c , d) e Tabela 4.4), durante o qual os mesmos foram alimentados com meio desprovido de DQO (autotrófico), observou-se que a mínima taxa específica nitrificante permaneceu próxima a 2,3 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$ no teste de limitação contínua de substrato. Por outro lado, os valores mínimos do teste intermitente foram bem superiores, isto é, 5,54 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$, 4,12 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$ e 4,84 $\text{mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$, no primeiro, segundo e terceiro período de limitação de amônio, respectivamente. Verifica-

se, portanto, que o valor mínimo de atividade nitrificante do teste contínuo é bastante inferior ao valor mínimo observado no teste intermitente.

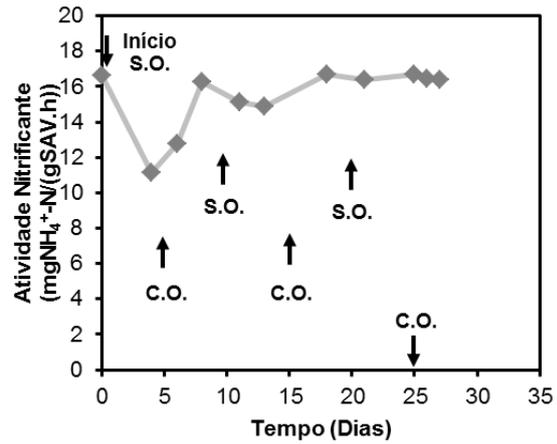
Levando em conta os experimentos realizados, depreende-se que a comunidade heterotrófica não contribuiu positivamente para preservação da atividade das bactérias autotróficas nitrificantes no biofilme. Pelo contrário, a comunidade nitrificante foi mais severamente afetada na presença de DQO afluente (teste 3), haja vista as quedas mais drásticas da atividade de nitrificação no teste 3.

4.3.4 Taxa específica nitrificante e o coeficiente de decaimento sob limitação de oxigênio

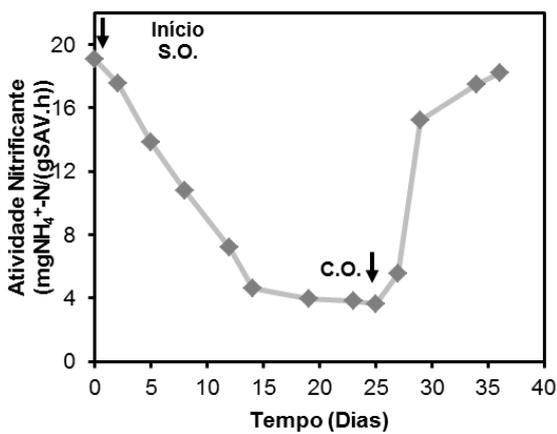
O acompanhamento da taxa específica nitrificante também foi realizado ao longo dos testes 5 e 6, isto é, com limitação contínua (MBBR₁) ou intermitente (MBBR₂) de oxigênio durante 25 dias na ausência ou presença de DQO afluente, respectivamente (Figura 4.11 (a – d)). A Tabela 4.5 apresenta a sumarização dos resultados obtidos nesses experimentos.



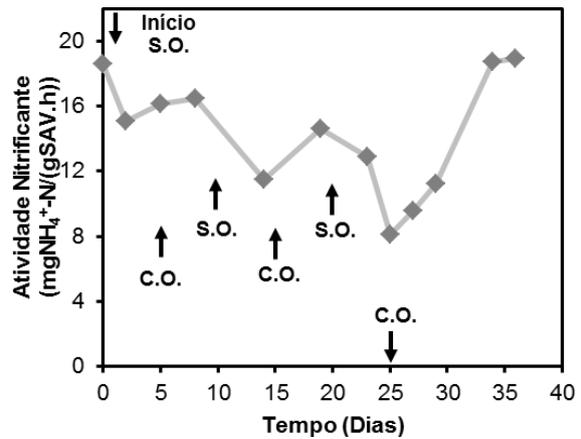
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.11.: Taxa específica nitrificante monitorada ao longo dos testes de 25 dias com limitação contínua e intermitente de oxigênio dissolvido (a) MBBR₁ – teste 5 – limitação contínua sem DQO afluente; (b) MBBR₂ – Teste 5 – limitação intermitente sem DQO afluente; (c) MBBR₁ – Teste 6 – limitação contínua com DQO afluente e (d) MBBR₂ – Teste 6 – limitação intermitente com DQO afluente.

¹ C.O. – Com oxigênio (aeração ligada)

² S.O. – Sem oxigênio (agitação por meio de borbulhamento de nitrogênio gasoso)

Tabela 4.5.: Taxa específica nitrificante ao longo dos testes de 25 dias com limitação contínua (MBBR₁) e intermitente (MBBR₂) de oxigênio.

Testes de limitação de oxigênio		Taxa Específica Nitrificante (mgNH ₄ ⁺ -N/(gSAV.h))			Intervalo de tempo (dias)
		Limitação de oxigênio (S.O.)	Aeração Normal (C.O.)	Taxa Final Estável	
MBBR ₁	Teste 5 ^a – Contínuo	12,32	4,25	10,60	25
MBBR ₁	Teste 6 ^b – Contínuo	19,09	4,01	12,10	25
MBBR ₂	Teste 5 ^a - Intermitente	16,60	11,15	16,40	5
	Teste 5 ^a - Intermitente	16,26	14,87		
	Teste 5 ^a - Intermitente	16,71	16,35		
MBBR ₂	Teste 6 ^b - Intermitente	18,59	15,05	18,70	5
	Teste 6 ^b - Intermitente	16,49	11,48		
	Teste 6 ^b - Intermitente	14,62	8,10		

^aTeste 5 – sem matéria orgânica (DQO afluente ausente)

^bTeste 6 – com matéria orgânica (DQO afluente presente)

Conforme pode ser observado na Figura 4.11(a), que representa o teste 5 (limitação contínua de oxigênio em condições autotróficas), a perda de atividade nitrificante ocorreu de forma bastante pronunciada durante os primeiros 8 dias de teste. Essa queda de atividade foi mais acentuada quando comparada àquelas observadas nos testes com limitação de amônio. No entanto, uma atividade nitrificante mínima e constante em torno de 4,8 mgNH₄⁺-N/(gSAV.h) foi mantida durante os 17 dias restantes de teste. O coeficiente de decaimento das bactérias nitrificantes ao longo dos 8 primeiros dias foi de 0,10 d⁻¹. Logo após o retorno do suprimento normal de oxigênio, 84% da taxa específica nitrificante inicial foi recuperada em apenas dois dias. No entanto, 6 dias foram necessários para recuperação total da taxa específica nitrificante aos índices atingidos previamente ao teste.

Na Figura 4.11(b), pode-se observar como o fornecimento intermitente de oxigênio de 5 em 5 dias agiu de forma positiva na manutenção da taxa específica nitrificante, cujo valor médio ficou em 16 mgNH₄⁺-N/(gSAV.h). Embora a atividade

nitrificante tenha sentido o efeito adverso do primeiro período de interrupção do fornecimento de oxigênio, após os períodos subsequentes de limitação intermitente de oxigênio a atividade permaneceu praticamente invariável.

A Figura 4.11(c) apresenta o teste de ausência contínua de oxigênio na presença de matéria orgânica afluyente. Como se pode observar, a queda de atividade nitrificante ocorreu até os primeiros 15 dias de teste, e posteriormente, o potencial de nitrificação se manteve praticamente constante em torno de $4 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$. Esse valor é similar ao observado no experimento 5 (sem adição de matéria orgânica), apresentado na Figura 11(a). Já o coeficiente de decaimento para esse experimento foi um pouco menor, isto é, $0,08 \text{ d}^{-1}$.

A Figura 4.11(d) ilustra o comportamento da atividade nitrificante durante o teste com limitação intermitente de oxigênio num meio suplementado com DQO externa. A queda da atividade nitrificante não ocorreu de forma acentuada, como foi observado nos testes de limitação de amônio. No entanto, ao longo dos sucessivos períodos de fornecimento intermitente de oxigênio, a atividade nitrificante foi diminuindo, até alcançar o valor mínimo de $8,1 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$.

Na comparação entre o decaimento celular observado nos testes 5 e 6, com ausência de oxigênio por períodos contínuos (Figura 4.11(a, c)), pode-se observar que no experimento realizado com a biomassa adaptada a condições autotróficas (teste 5), a perda da atividade nitrificante ocorreu de forma mais lenta do que no teste utilizando a biomassa alimentada com meio contendo matéria orgânica (teste 6) (Figura 4.12), a exemplo do ocorrido no teste com limitação contínua de amônio. Esses dados evidenciam que a atividade nitrificante é mantida por maior período de tempo em

condições autotróficas nas quais o crescimento heterotrófico é suprimido pela ausência de DQO na alimentação.

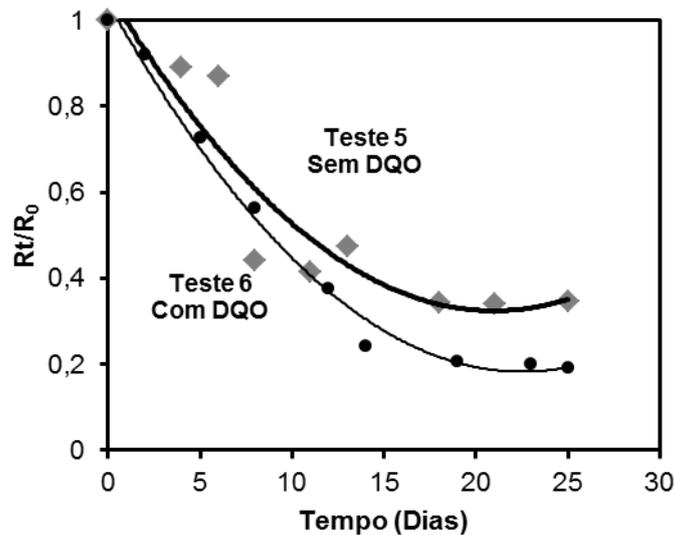


Figura 4.12.: Redução da atividade nitrificante ao longo de 25 dias contínuos de limitação de substrato (oxigênio) no reator MBBR₁ com (♦) e sem a presença de DQO externa (●).

Comparando-se os testes 5 e 6 com fornecimento intermitente de oxigênio e utilizando a biomassa aclimatada a condições sem e com a presença de matéria orgânica afluyente (Figura 4.11(b, d) e Tabela 4.5), tem-se que a perda de atividade nitrificante foi menor no teste sem DQO externa, assemelhando-se aos resultados dos testes contínuos. Apesar da diferença em termos de atividade nitrificante nos dois testes intermitentes, não ocorreu queda acentuada da mesma durante os testes. De fato, a atividade das bactérias nitrificantes se manteve mais estável em condições de aeração descontínua.

Levando em conta somente os dados do teste 5 (Figura 4.11(a, b) e Tabela 4.5), a estratégia de fornecer ar comprimido de 5 em 5 dias contribuiu para que a perda de atividade nitrificante não ocorresse de forma tão acentuada, mostrando-se, num primeiro momento, ser um bom método para a manutenção do potencial nitrificante do sistema. Porém, apesar da queda pronunciada da atividade do consórcio nitrificante no reator

submetido a períodos contínuos sem oxigênio (MBBR₁), a sua recuperação foi muito rápida. No teste 6 (Figura 4.11(c, d) e Tabela 4.5), no qual a fonte externa de matéria orgânica estava presente, o comportamento da atividade nitrificante tanto no teste de limitação contínua como no teste de limitação intermitente de oxigênio foi semelhante ao observado no teste 5 (sem DQO afluente).

4.4 Discussão

4.4.1 Potencial de nitrificação em reatores MBBR após períodos de limitação de amônio e oxigênio

O comportamento do consócio microbiano nitrificante em condições de limitação de amônio e oxigênio, passíveis de ocorrência nas plantas de tratamento de efluentes, foi avaliado por meio de testes de longa duração, a partir dos quais foram monitoradas a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, a taxa específica nitrificante e o coeficiente de decaimento dos organismos autotróficos.

Os resultados dos testes 1 a 6 revelaram que o desempenho da nitrificação em termos de eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal melhorou durante os sucessivos períodos de adição intermitente de amônio e oxigênio, proporcionando ao consócio nitrificante rápida recuperação de seu desempenho. Apenas dois dias foram necessários para que mais de 98% de remoção de amônio fosse obtida após os períodos de limitação intermitente do substrato nitrogenado e de oxigênio. No entanto, nos testes de limitação contínua desses dois componentes por longos períodos (25 dias), o tempo requerido para recuperação da eficiência de remoção de amônio foi maior, variando de 2 a 15 dias. Apesar disso, observou-se uma tendência de diminuição do tempo de

recuperação, resultado que pode ser atribuído à capacidade do consórcio microbiano nitrificante de adaptar-se à variação na concentração de amônio e oxigênio a que foi submetido.

Alguns autores relatam que devido ao estresse imposto às bactérias nitrificantes pela disponibilidade limitada de substrato/oxigênio, essas bactérias podem desenvolver uma série de mecanismos fisiológicos, enzimáticos e moleculares que lhes permitem a sobrevivência durante longos períodos de inanição (amônio e oxigênio), mantendo quase que intacta a atividade de oxidação de amônio (VERSTRAETE & FOCHT, 1977, WILHELM *et al.*, 1998).

Quando se compara o efeito da limitação de amônio e oxigênio, a ausência desse último ocasionou maior redução no desempenho nitrificante, mesmo não sendo percebidas grandes perdas de biomassa imobilizada nos diferentes testes com limitação prolongada de substrato e de oxigênio. Estudos apontam que condições aeróbias devem ser evitadas durante períodos de limitação de substrato (amônio) com objetivo de preservar as bactérias oxidadoras de amônio (BOA). A combinação da ausência de amônio com a ausência de oxigênio parece favorecer a manutenção da atividade das BOA nessas condições adversas (SIEGRIST *et al.*, 1999; SALEM *et al.*, 2006; ELAWWAD *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos da literatura sugerem diferentes técnicas para manter a eficiência de remoção de amônio após as bactérias nitrificantes serem submetidas a longos períodos de estresse. No estudo realizado por Elawwad e colaboradores (2013), foi observado que a técnica de aerar intermitentemente o reator e adicionar nitrato, de modo a manter condições anóxicas no sistema, ajuda na manutenção de um biofilme nitrificante ativo durante períodos de limitação de substrato. A estratégia de adicionar

nitrito ao consórcio foi adotada em virtude das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) serem mais sensíveis às condições de limitação de substrato, demandando maiores períodos de recuperação. Já Torà e colaboradores (2011) adotaram uma técnica de recuperação controlada da nitrificação, na qual foi realizado o controle da taxa de nitrogênio aplicada, induzindo a uma recuperação em apenas 5 dias. Outros trabalhos também indicam que a técnica de aporte gradual do substrato pode levar à rápida recuperação do sistema (YILMAZ *et al.*, 2007). No entanto, no presente trabalho, os sucessivos testes de limitação de amônio/oxigênio evidenciaram que, mesmo sem a incorporação de estratégias específicas de operação visando o restabelecimento do potencial nitrificante do consórcio microbiano, ocorreu a adaptação gradual das bactérias às condições adversas impostas, refletindo em curtos períodos de recuperação da nitrificação.

Estudos prévios relatam que as bactérias são induzidas a armazenarem polímeros intracelulares nos períodos de abundância de substrato, quando submetidas anteriormente a períodos intermitentes de limitação de substrato/oxigênio. Esses polímeros podem então ser consumidos nos períodos de inanição, servindo como fonte de energia para o crescimento e manutenção celular (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1997). Alternativamente, Schmidt e colaboradores (2004) relataram que as bactérias oxidadoras de amônio (BOA), após consecutivos eventos de privação de substrato (amônio), desenvolveram a capacidade de armazenar amônio intracelularmente como estratégia para manterem altas atividades de oxidação desse substrato nitrogenado. Este estudo, em particular, demonstrou a capacidade de recuperação gradual do sistema nitrificante ao longo dos sucessivos testes de ausência tanto de amônio quanto de oxigênio.

Bollmann e colaboradores (2005) também evidenciaram que as BOA possuem um mecanismo único para suportar períodos sem disponibilidade de nutrientes, diferente do apresentado pelas bactérias heterotróficas. Ao contrário dessas últimas, as BOA são capazes de manterem ativas as enzimas responsáveis pela conversão de substrato em energia, de modo a retomar a oxidação de amônio quase que imediatamente após o substrato se tornar disponível novamente. Essa habilidade representa uma estratégia de sobrevivência para essas bactérias, permitindo que compitam melhor no ambiente em que estão presentes (BOLLMANN *et al.*, 2005).

A análise em termos de taxa específica nitrificante proporciona prever o comportamento do consórcio microbiano frente às variações nos perfis de substrato/oxigênio em sistemas MBBR. A atividade nitrificante decaiu gradualmente quando o sistema foi submetido a períodos contínuos de limitação de amônio e de oxigênio. No entanto, atingiu um valor mínimo a partir do qual não se observou variação. Esse comportamento denota a capacidade do consórcio microbiano em manter uma atividade nitrificante mínima, fato que pode estar associado à estrutura do biofilme. Trabalhos anteriores empregando biomassa em suspensão relatam que a perda de atividade nitrificante chegou a níveis próximos a zero durante o período de inanição. Vukovic *et al.*, (2006), reportaram o valor mínimo de $0,4 \text{ mgNH}_4^+\text{-N}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$, enquanto que nessa pesquisa a atividade mínima foi de $1 \text{ mgNH}_4^+\text{-N}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$, atingida no teste contínuo de limitação de amônio. No entanto, em outros testes realizados, a atividade mínima chegou a $4 \text{ mgNH}_4^+\text{-N}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$, tal como observado nos experimentos contínuos com ausência de oxigênio.

Observou-se que nos testes em que o sistema foi submetido à adição intermitente de amônio e oxigênio, a recuperação do sistema foi mais rápida após os períodos de

limitação desses componentes, embora tenham sido observadas quedas bruscas de atividade nitrificante ao longo dos experimentos. Além disso, é possível observar que, apesar do efeito pronunciado da alimentação intermitente no potencial nitrificante, o sistema conseguiu reestabelecer a taxa específica nitrificante original (obtida antes dos testes) de forma muito rápida e a recuperação é cada vez mais intensa ao longo dos sucessivos períodos de limitação de amônio e oxigênio dissolvido. Diante desses resultados, pode-se pensar em uma estratégia de fornecimento intermitente de substrato (amônio) e oxigênio ao sistema mantido sem os mesmos por um longo período. No entanto, apesar de relativamente curto, o tempo de recuperação no teste de limitação intermitente (MBBR₂) se diferencia pouco daquele requerido em condições de limitação contínua de substrato (MBBR₁). Sendo assim, a estratégia de adicionar amônio ou oxigênio de forma intermitente pode ser dispensada a fim de evitar gastos extras de substrato externo e oxigenação artificial, particularmente em sistemas como biomassa imobilizada, tal como empregado nesse estudo.

Um fator muito importante na manutenção e recuperação rápida da atividade nitrificante em situações de inanição é a estrutura do biofilme. Operando reatores com biofilme, Forrez *et al.* (2008), relataram que em períodos de adaptação a longos períodos de oligotrofia (nutrição insuficiente), as bactérias nitrificantes foram capazes de se desenvolver em baixas concentrações de amônio, resultando em uma comunidade de nitrificantes (especificamente BOA) com baixas exigências nutricionais para manutenção celular e baixas taxas de decaimento. As bactérias oxidadoras de amônio (BOA) se mantiveram no biofilme, mesmo após um mês sem fornecimento do amônio. Além disso, no trabalho realizado por Wilhelm *et al.* (1998), foi relatado que a atividade das enzimas relacionadas à geração de energia em *Nitrosomonas europaea* não foi

afetada durante um longo período sem amônio. De fato, a estrutura do biofilme contribuiu positivamente para o bom desempenho dos reatores MBBR durante os testes realizados nessa pesquisa, demonstrando as vantagens dessa tecnologia de tratamento em comparação com outros sistemas de biomassa suspensa e aderida.

Em relação ao coeficiente de decaimento das bactérias nitrificantes, a Tabela 4 sumariza alguns autores que investigaram o efeito da limitação de substrato (amônio ou oxigênio) em sistemas nitrificantes. É possível observar que o coeficiente de decaimento nitrificante é muito variável, podendo ser influenciada por vários fatores, como por exemplo, o tipo de reator empregado e as condições de pH, temperatura e duração do período de inanição. Apesar disso, a referida taxa encontra-se entre 0,0069 a 0,21 d⁻¹. As taxas de decaimento encontradas neste trabalho nos testes de limitação de amônio e oxigênio apresentam-se dentro da faixa de valores reportados na literatura.

Tabela 4.6.: Coeficiente de decaimento celular em diversas condições experimentais

Condição aplicada ^a	Coeficiente de decaimento (d ⁻¹)	Condição experimental		Sistema biológico	Período de limitação (dias)	Referências
		pH	Temp. (°C)			
Aeróbio	0,21	7,3-7,6	20	Lodo ativado	7	Siegrist <i>et al.</i> (1999)
Anóxico	0,10	7,3-7,6	20	Lodo ativado	7	Siegrist <i>et al.</i> (1999)
Anóxico	0,097	7,7	20	SBR (lodo ativado)	9	Lee & Oleszkiewicz (2003)
Anóxico	0,017	7,0-7,9	18-22	SBR (lodo ativado)	33	Yilmaz <i>et al.</i> (2007)
Anaeróbio/ Aeróbio	0,0182	7,4-7,6	-	Lodo granular	28	Pijuan <i>et al.</i> (2009)
Anaeróbio	0,0069	7,4-7,6	-	Lodo granular	32	Pijuan <i>et al.</i> (2009)
Anaeróbio	0,06	7,5	20	Lodo ativado	30	Salem <i>et al.</i> (2006)
Anaeróbio/ Aeróbio	0,017	7,4-7,6	18.7± 0.9	SBR (lodo ativado)	25	Ma <i>et al.</i> (2015)
Aeróbio	0,11	7,0-7,5	25±2	Biomassa aderida (heterotrófico)	25	Este estudo
Aeróbio	0,08	7,0-7,5	25±2	Biomassa aderida (autotrófico)	25	Este estudo
Anaeróbio	0,10	7,0-7,5	25±2	Biomassa aderida (autotrófico)	25	Este estudo
Anaeróbio	0,08	7,0-7,5	25±2	Biomassa aderida (heterotrófico)	25	Este estudo

^aCondições anóxicas ou anaeróbias indicam testes com limitação de oxigênio; Condições aeróbias indicam testes com limitação de amônio

Há um consenso na literatura que, em geral, o coeficiente de decaimento autotrófica é maior em condições aeróbias, sendo recomendado manter as bactérias nitrificantes em estado anóxico ou anaeróbio durante o período de limitação de substrato nitrogenado (SALEM *et al.*, 2006; YILMAZ *et al.*, 2007; TORA *et al.*, 2011; ELAWWAD *et al.*, 2013). Corroborando com esta hipótese, estudos sugerem que as bactérias nitrificantes podem sobreviver às condições anaeróbias devido à sua capacidade de desacelerar o metabolismo, resultando em um estado de repouso das células (DIAB *et al.* 1992). Além disso, as baixas taxas de decaimento de bactérias nitrificantes encontradas nesse trabalho ao longo dos 25 dias contínuos de limitação de amônio e carência de oxigênio também podem ser consequência da estrutura do biofilme, cuja massa se manteve relativamente constante ao longo dos testes. A condição de proteção do biofilme pode ter selecionado bactérias nitrificantes capazes de preservar alto nível de atividade na limitação de amônio e oxigênio.

Outro ponto a ser discutido é sobre o coeficiente de decaimento nitrificante observada nesse trabalho, particularmente nos testes com limitação de amônio em condições aeróbias ($0,11 \text{ d}^{-1}$) e com ausência de oxigênio ($0,08 \text{ d}^{-1}$), ambos com a presença de matéria orgânica afluyente. Conforme apontado por Salem *et al.* (2006), os protozoários, ativos somente em condições aeróbias, podem contribuir para um maior coeficiente de decaimento em condições de inanição. Os autores encontraram taxas de decaimento de $0,2 \text{ d}^{-1}$, $0,1 \text{ d}^{-1}$ e $0,06 \text{ d}^{-1}$ em carência de substrato durante 30 dias em condições aeróbias, anóxicas e anaeróbias, respectivamente. Desse modo, a atividade de predadores em situações de aerobiose pode ter contribuído para a obtenção de um coeficiente de decaimento nitrificante maior no teste de limitação de amônio com matéria orgânica.

4.5 Conclusões parciais

Nesse trabalho, observou-se que a recuperação da eficiência da nitrificação foi relativamente rápida após longos e sucessivos períodos de limitação de amônio (25 dias). Apesar de perdas substanciais na eficiência de remoção de amônio nessas condições, as bactérias nitrificantes foram se tornando cada vez mais resistentes a condições de limitação do substrato nitrogenado, sendo capazes de se adaptar a repetidas variações da carga de amônio. No primeiro teste de longo período limitação de amônio (25 dias), foram necessários 15 dias para o sistema nitrificante retomar a máxima eficiência de remoção, enquanto que no segundo teste sob as mesmas condições, apenas 2 dias foram necessários para completa recuperação do sistema.

Em contrapartida, nos testes de limitação intermitente de amônio, com dosagem do mesmo de tempos em tempos (5 em 5 dias), não foram observados efeitos negativos no desempenho nitrificante, observando-se altas eficiências de remoção de amônio imediatamente após os testes.

Já os testes com limitação de oxigênio, seja contínua ou intermitente, revelaram rápido potencial de recuperação da nitrificação, de modo que completa remoção de amônio tenha sido obtida em, no máximo, 4 dias após o reestabelecimento de condições normais de aeração.

No que concerne à taxa específica nitrificante, a mesma declinou gradualmente nos testes contínuos de limitação de amônio e oxigênio, atingindo um valor mínimo constante. No entanto, ao longo dos testes com limitação intermitente, foi observada grande variação entre a mínima e a máxima taxa específica nitrificante.

5. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM REATOR DE LEITO MÓVEL COM BIOFILME (MBBR) DESNITRIFICANTE SUBMETIDO ÀS ALTAS CARGAS DE NITRATO

5.1 Introdução

A etapa de transformação do nitrogênio amoniacal em nitrato é bastante relevante no tratamento biológico de águas residuárias, tais como efluentes domésticos e industriais, dado os efeitos causados pela presença de amônio/amônia nos corpos d'água receptores. No entanto, quantidades excessivas de nitrato também apresentam alto potencial poluidor. O nitrato também pode afetar diretamente o ecossistema, aumentando o crescimento de algas para níveis prejudiciais ao corpo receptor.

Esse composto nitrogenado também pode ser nocivo à saúde humana, principalmente em bebês, que possuem sistema digestivo incapaz de transformar o nitrato em formas menos prejudiciais de nitrogênio. Essa doença, conhecida por metemoglobinemia, é formada quando o nitrito (obtido da conversão biológica de nitrato presente na água potável) oxida o íon ferroso (Fe^{2+}) presente na hemoglobina para o seu estado férrico (Fe^{3+}). Essa oxidação converte a hemoglobina em meta-hemoglobina, que não consegue se ligar ao oxigênio da corrente sanguínea, formando a condição de metemoglobinemia. Dessa forma, o nitrato interfere na transferência de oxigênio, privando o organismo do oxigênio necessário para suas funções vitais. Os sintomas incluem cor de pele cinzenta, acastanhada ou azulada, além de choro excessivo em crianças, podendo levar a letargia em determinados níveis de meta-hemoglobina (FEWTRELL, 2004).

Em vista disso, a conversão do nitrato para a sua forma elementar (nitrogênio gasoso) é tão importante quanto a etapa de oxidação do nitrogênio amoniacal. A forma mais comum de remoção de nitrato de águas residuárias é por meio do processo de desnitrificação. Esse processo é intermediado por vários micro-organismos na ausência de oxigênio. Desse modo, o nitrato é utilizado como acceptor final de elétrons na oxidação da matéria orgânica. Esse processo apresenta diversas reações em sequência, podendo gerar intermediários indesejáveis (METCALF & EDDY, 2016). Particularmente o gás intermediário óxido nitroso (N_2O) possui grande importância no contexto atual, devido à sua participação no processo de destruição da camada de ozônio na estratosfera, e conseqüentemente, a sua contribuição para o aquecimento global. Em virtude disso, conhecer a quantidade de óxido nitroso gerado no processo desnitrificante também é de suma importância (BERNET *et al.*, 1996; ITOKAWA *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2014; METCALF & EDDY, 2016).

Um parâmetro muito importante para o processo de desnitrificação e diretamente relacionado com a geração de compostos intermediários indesejáveis é a relação entre a quantidade de carbono orgânico biodegradável e nitrogênio, neste caso na forma de nitrato (METCALF & EDDY, 2016). Caso a quantidade de matéria orgânica não seja suficiente para garantir a conversão do nitrato a nitrogênio gasoso, a desnitrificação pode ocorrer de forma incompleta, e, por conseguinte, haver a liberação de produtos intermediários (ITOKAWA *et al.*, 2001; GE *et al.*, 2012). Diversos trabalhos apontam valores considerados ideais para essa relação, dependendo do substrato orgânico utilizado, de modo que ocorra a desnitrificação completa. Porém, há um consenso que a faixa satisfatória se situa entre 4 - 15 gDQO/gN. Caso o efluente não apresente

quantidade suficiente para desnitrificar todo o nitrato presente, é necessária a adição de uma fonte externa de carbono orgânico (ZHEN *et al.*, 2007).

Geralmente, a desnitrificação biológica é mais empregada no tratamento de efluentes com concentrações relativamente baixas de nitrato (10 - 200 mgNO₃-N/L), representativas de esgotos domésticos tratados (ou seja, previamente nitrificados) e determinados efluentes industriais (GLASS & SILVERSTEIN, 1998). No entanto, algumas indústrias, tais como de explosivos, fertilizantes, acabamentos de metais e indústria nuclear, são responsáveis pela geração de correntes líquidas residuárias contendo altas concentrações de nitrato, podendo chegar a 10.000 mgNO₃-N/L (NAIR & SOUZA, 2012). Alguns trabalhos relatam que a desnitrificação pode sofrer inibição em concentrações muito elevadas de nitrato (GLASS & SILVERSTEIN, 1998), as quais têm sido reportadas como causadoras de efeito tóxico sobre as bactérias desnitrificantes heterotróficas, frequentemente expresso pelo acúmulo do intermediário nitrito (ALMEIDA *et al.*, 1995). Também foi relatado que a inibição do processo de desnitrificação por nitrito é mais acentuada em valores de pH inferiores a 7, mesmo em concentrações relativamente baixas de nitrito, em virtude da formação do ácido nitroso (HNO₂) (GLASS *et al.*, 1997). Em contrapartida, valores de pH superiores a 7 não apresentam inibição significativa. Desta forma, o pH consiste em um parâmetro importante de controle para o processo desnitrificante.

Algumas estratégias operacionais já foram empregadas para o tratamento biológico de correntes concentradas em nitrato, incluindo a adaptação da biomassa a condições potencialmente inibidoras (GLASS & SILVERSTEIN, 1999; DHAMOLE *et al.*, 2007; NAIR & SOUZA, 2012). Tal procedimento pode contribuir para o desenvolvimento de um consórcio microbiano resistente a condições extremas desse

substrato nitrogenado. Além disso, o controle da alcalinidade pode ajudar a obter maiores conversões de nitrato a nitrogênio gasoso (GLASS & SILVERSTEIN, 1998).

Na literatura, alguns trabalhos abordaram o tratamento de águas residuárias com altas concentrações de nitrato. Foglar *et al.* (2005), Biradar *et al.* (2008) e Filippis *et al.* (2013) avaliaram a desnitrificação, em sistemas com biomassa em suspensão, de diversos tipos de efluentes cujas concentrações de nitrato variaram de 100 a 40.000 mgNO₃-N/L. Já os trabalhos de Oh *et al.* (2001), Zala *et al.* (2004) e Godini *et al.* (2010) avaliaram o tratamento de efluentes com concentrações de nitrato variando de 50 a 3.000 mgNO₃⁻-N/L em reatores de leito fixo. A Tabela 5.1 sumariza alguns trabalhos focados no tratamento de águas residuárias com elevadas concentrações de nitrato em diversas configurações de reatores.

Tabela 5.1.: Trabalhos que avaliaram a desnitrificação em reatores submetidos à alta carga de nitrato.

Sistema	Água residuária	Concentração afluenta de nitrato (mgNO ₃ -N/L)	Autores
Biomassa em suspensão	Sintético	3.000 – 9.000	Filippis <i>et al.</i> (2013)
Biofiltro submerso	Sintético	50 – 3.000	Oh <i>et al.</i> (2001)
Biomassa em suspensão	Sintético	100 – 500	Foglar <i>et al.</i> (2005)
Leito fixo	Efluente petroquímico	100 – 700	Godini <i>et al.</i> (2010)
Leito fixo	Indústria de fertilizantes	600 – 950	Zala <i>et al.</i> (2004)
Biomassa suspensa	Indústria Nuclear	10.000 – 40.000	Biradar <i>et al.</i> (2008)

Uma tecnologia com biofilme em constante ascensão é o reator de leito móvel com biofilme (MBBR, do inglês *Moving-bed biofilm reactor*). Esse processo apresenta algumas vantagens em relação a outros sistemas biológicos. Quando comparado ao tradicional processo de lodos ativados (biomassa em suspensão), o crescimento microbiano ocorre aderido a um meio de suporte móvel. Por esse motivo, as bactérias permanecem no tanque de aeração durante todo o tratamento e não necessitam ser recirculadas a partir do decantador secundário, o que possibilita uma biomassa mais especializada ao tratamento proposto. Além disso, um problema comum em sistemas de leito fixo é a colmatção/entupimento do leito a ser percolado pelo efluente, o que não ocorre no sistema MBBR. De fato, essa tecnologia foi desenvolvida para conciliar as melhores características dos sistemas com biomassa em suspensão e as melhores características dos sistemas com biomassa aderida (ODEGAARD, 2006).

Face às inúmeras vantagens associadas à tecnologia MBBR, esses reatores possivelmente apresentam grande potencial no tratamento de águas residuárias altamente concentradas em nitrato. Apesar de haverem pesquisas lançando mão de reatores com biomassa suspensa ou leito fixo para o tratamento de efluentes concentrados em nitrato, o emprego de reatores de leito móvel com biofilme para esse propósito não foi abordado em trabalhos anteriores da literatura. Nesse contexto, essa pesquisa teve como principal objetivo avaliar o comportamento de um sistema MBBR em relação à desnitrificação de um efluente sintético contendo elevadas concentrações de nitrato, aumentadas gradualmente ao longo do tempo. Testes de atividade desnitrificante foram realizados nas diferentes condições operacionais para observar a dinâmica do consumo de substrato durante a redução do nitrato a nitrogênio gasoso.

Além disso, a emissão de N_2O como possível intermediário da desnitrificação foi avaliada em determinados regimes operacionais.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Configuração do reator biológico desnitrificante

Um reator de leito móvel com biofilme (MBBR) de volume reacional de 500 mL, fabricado em vidro e com formato cilíndrico, conforme ilustrado na Figura 5.1, foi utilizado para o estudo do efeito de altas cargas de nitrato no desempenho da desnitrificação.

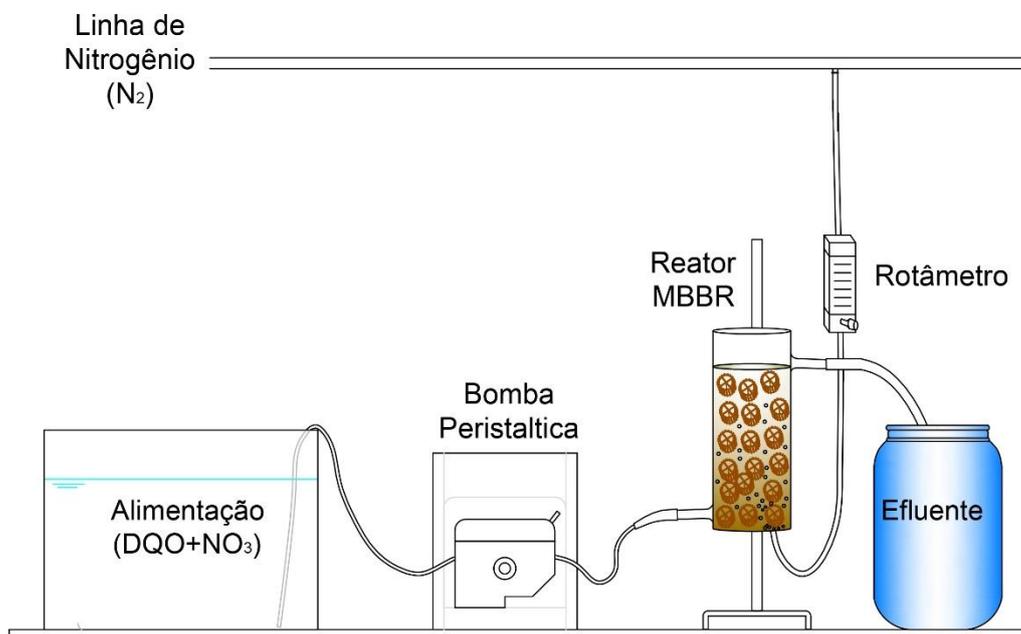


Figura 5.1.: Representação esquemática do sistema MBBR de escala laboratorial operado em condições anóxicas.

O suporte utilizado para adesão do consórcio microbiano foi o Kaldnes K1, com área superficial específica de $500 \text{ m}^2/\text{m}^3$. A fração de enchimento utilizada neste estudo foi de 50% em relação ao volume reacional (500 mL), resultando em uma área total para imobilização microbiana de $0,125 \text{ m}^2$. O lodo utilizado para inocular o reator foi oriundo de um sistema MBBR aeróbio nitrificante de escala laboratorial que estava em operação durante mais de 100 dias. O reator foi operado com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 6 h, sendo alimentado por uma bomba peristáltica de baixa vazão da marca Longer Pump, modelo BT100-2J. Para homogeneização do reator e obtenção de mistura perfeita em condições de ausência de oxigênio dissolvido (OD), foi utilizado um gás inerte (N_2), que foi adicionado ao reator por meio de um difusor poroso. Essa adaptação foi necessária devido à dificuldade de acoplamento de um agitador mecânico, necessário para manutenção de condições anóxicas, em um reator de pequena escala com dimensões reduzidas. A temperatura foi mantida em torno de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e o pH foi mantido na faixa entre 7,5 e 9,0.

Um efluente sintético foi preparado de modo a suprir o consórcio microbiano com os substratos necessários ao seu desenvolvimento. O meio de alimentação, cuja composição está descrita na Tabela 5.2, foi composto principalmente por acetato de sódio como única fonte de matéria orgânica, nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, fosfato monobásico como fonte de fósforo e cloreto de sódio como fonte de sal, comumente presente em efluentes domésticos ou industriais. A escolha de acetato de sódio como fonte de carbono se deu com base em estudos da literatura que comprovaram ser uma ótima fonte de carbono externa para desnitrificação de efluentes com elevadas concentrações de nitrato (GLASS & SILVERSTEIN, 1998; FOGLAR *et al.*, 2005; DHAMOLE *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2009). Ao efluente sintético foi dosada

uma quantidade de 0,5 mL de solução contendo elementos traço a cada litro de efluente preparado. A composição dessa solução de micronutrientes está descrita na Tabela 5.3.

Tabela 5.2.: Composição do efluente sintético

Componentes	Concentração (g/L)
Acetato	0,38 - 12,85 ^a
NaNO ₃	0,068 - 4,11 ^a
KH ₂ PO ₄	0,060 - 0,14 ^a
NaCl	0,22

^a A concentração foi variada em função da condição operacional (vide item 5.2.2).

Tabela 5.3.: Composição da solução de micronutrientes suplementada ao efluente sintético.

Componentes	Concentração (g/L)
EDTA	50
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1,0
ZnSO ₄	3,22
CaCl ₂	12,35
CoCL ₂	5,54
CuSO ₄	1,0
FeSO ₄	2,72

5.2.2 Avaliação das condições experimentais

A matéria orgânica (acetato) e o nitrogênio (nitrato de sódio) foram dosados de acordo com o regime operacional avaliado, conforme descrito na Tabela 5.4 e Figura 5.2. Foram investigados onze regimes operacionais distintos, de modo que a duração total do experimento fosse de aproximadamente 700 dias. Durante a operação do reator, a concentração de nitrato afluente foi variada de 15 a 650 mgNO₃-N/L. Logo a carga nitrogenada variou de 0,05 a 2,60 kgNO₃-N/(m³.d). A concentração de matéria orgânica foi alterada de acordo com a concentração afluente de nitrato, de modo que diferentes

razões DQO/N (demanda química de oxigênio/nitrogênio) fossem estabelecidas (5 a 25).

Nos regimes 1 a 3, o objetivo foi investigar o desempenho do sistema desnitrificante frente ao aumento gradual da carga nitrogenada, mantendo-se a relação DQO/N constante em valor que evitasse a limitação de substrato orgânico para a desnitrificação. Portanto, a DQO afluente foi gradativamente aumentada na mesma proporção da concentração de nitrato, de modo que a razão DQO/N fosse mantida próxima a 7. Durante os cinco regimes operacionais subsequentes (4 a 8), a concentração de nitrato e a DQO afluente foram diminuídas gradualmente, embora mantendo a relação DQO/N constante e próxima a 5, tida como a mínima requerida para remoção completa de nitrato (usando acetato como fonte de carbono) (GLASS & SILVERSTEIN, 1998). Em função dos resultados obtidos, a razão DQO/N foi aumentada para 6 na condição experimental 9, de modo a garantir remoção completa de nitrato. Além de acompanhar o comportamento do sistema em diferentes cargas orgânicas e nitrogenadas aplicadas ao longo dos regimes 1 – 9, o papel desempenhado pelas frações da biomassa aderida e suspensa no processo desnitrificante nas diversas condições operacionais foi avaliado.

Por fim, o comportamento do sistema desnitrificante quando submetido a condições de carga orgânica em excesso (DQO/N acima de 20) foi avaliado nas condições experimentais 10 e 11. Nesses regimes, em particular, avaliou-se a remoção de matéria orgânica não relacionada ao metabolismo desnitrificante.

Tabela 5.4.: Condições experimentais ao longo da operação do reator desnitrificante.

Regimes	Nitrato afluente (mgNO ₃ - N/L)	Carga nitrogenada (kgNO ₃ - N/(m ³ .d))	DQO afluente (mgO ₂ /L)	Carga Orgânica (kgDQO/(m ³ .d))	DQO/N
1	115	0,46	835	3,34	7,3
2	377	1,51	2737	10,95	7,3
3	656	2,62	5058	20,23	7,7
4	651	2,60	2943	11,77	4,6
5	307	1,23	1556	6,22	5,1
6	147	0,59	758	3,03	5,2
7	72	0,29	357	1,43	4,9
8	32	0,13	157	0,63	4,9
9	50	0,20	301	1,20	6,0
10	13	0,05	322	1,29	24,8
11	23	0,09	560	2,24	24,4

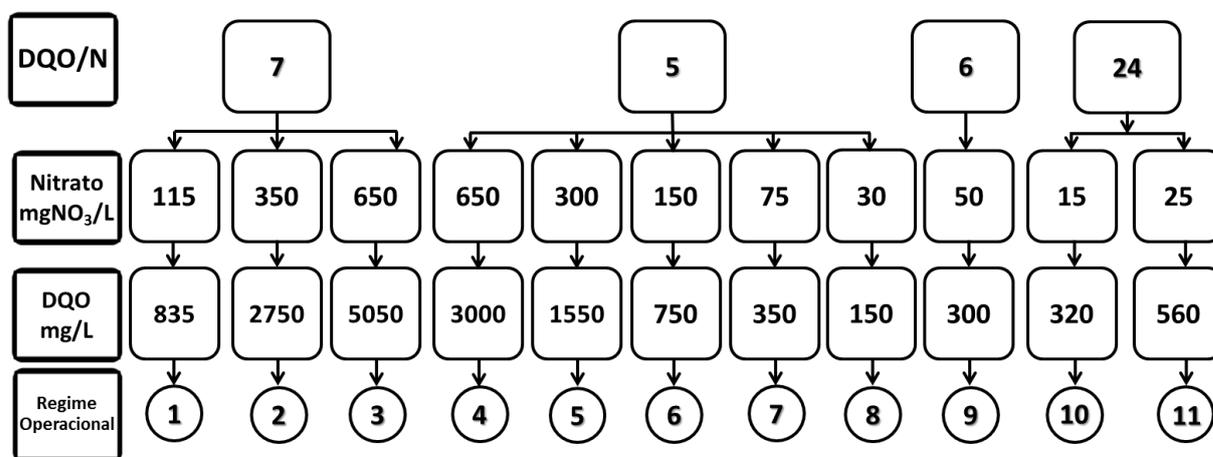


Figura 5.2.: Representação esquemática das condições experimentais empregadas ao longo dos regimes de operação. Os valores atribuídos às concentrações de nitrato e DQO foram arredondados para efeitos de apresentação. As cargas orgânica e nitrogenada em cada regime estão descritas na Tabela 5.4.

5.2.3 Testes em batelada para determinação da cinética da desnitrificação

Os testes para determinação da cinética de desnitrificação tiveram como objetivo a obtenção da máxima taxa de redução de nitrato durante os diversos regimes operacionais avaliados. Para realização desse teste, um pulso de 10 mL de uma solução concentrada de nitrato de sódio (NaNO_3) foi introduzido no reator mantido em condições anóxicas, de modo a se obter uma concentração inicial de nitrato desejada no início do teste. Para medir a cinética de consumo de nitrato, amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos a partir do instante zero (inicial) até o tempo final de 5 horas. As amostras foram filtradas em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ e a fonte de carbono necessária para a desnitrificação foi suprida com objetivo de não limitar a desnitrificação (excesso de DQO). As concentrações de nitrito e nitrato foram determinadas ao longo do tempo, e a atividade desnitrificante foi obtida pela regressão linear das concentrações dessas espécies nitrogenadas ao longo do tempo. O eventual acúmulo de nitrito observado concomitantemente à redução do nitrato foi considerado no cálculo da taxa de desnitrificação. Para o cálculo da taxa específica de desnitrificação, foi considerada a concentração de sólidos aderidos voláteis (SAV) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) no reator durante os testes. A taxa de redução de nitrato e nitrito foi determinada tanto para o sistema como um todo, contemplando a biomassa aderida e a biomassa em suspensão, quanto somente para a fração suspensa dos sólidos. Neste último caso, os suportes móveis foram retirados do reator de modo a contabilizar somente a atividade das bactérias em suspensão. A contribuição da biomassa aderida foi calculada a partir da diferença entre a carga volumétrica de remoção de nitrato obtida com ambas as frações de biomassa e aquela obtida com a parcela suspensa, conforme sugerido por Bassin *et al.* (2016). Alguns testes foram

realizados somente com a biomassa aderida, drenando todo o líquido do reator, contendo os sólidos suspensos, e substituindo-o pelo meio de alimentação sintético (desprovido de sólidos). Tais experimentos foram realizados para validar os resultados obtidos nos testes anteriores em relação à contribuição do biofilme na desnitrificação.

O mecanismo da desnitrificação biológica pode ser descrito simplificadaamente pela Equação (5.1):



em que k_1 e k_2 são constantes cinéticas.

Embora existam mais alguns intermediários entre nitrito e gás nitrogênio (particularmente óxido nítrico e óxido nitroso), a taxa de desnitrificação é controlada principalmente pela redução do nitrato e do nitrito. Assumindo-se que a constante de meia velocidade (K_s) é insignificante quando comparado a concentração de substrato, ou seja, em condições de abundância do substrato, a reação de desnitrificação é de ordem zero em relação ao nitrato e nitrito (FOGLAR *et al.*, 2005), as Equações (5.2) e (5.3) descrevem a taxa de redução do nitrato (r_{NO_3}) e do nitrito (r_{NO_2}).

$$r_{\text{NO}_3} = -k_1 \quad (5.2)$$

$$r_{\text{NO}_2} = k_1 - k_2 \quad (5.3)$$

r_{NO_3} é a taxa de consumo de nitrato (mg/(L.h)) e k_1 é o coeficiente reacional de ordem zero para o nitrato (mg/(L.h)). Similarmente para o nitrito, temos que r_{NO_2} é a taxa de consumo de nitrito e k_2 é o coeficiente reacional de ordem zero para o nitrito. Esses dois coeficientes podem ser obtidos diretamente a partir de dados experimentais,

notadamente a partir da inclinação das curvas de decaimento de nitrato e nitrito ao longo do tempo, obtidas a partir dos testes cinéticos. As taxas específicas de redução de nitrato e nitrito são calculadas dividindo k_1 e k_2 pela concentração de biomassa no reator (mg/L), conforme descrito pelas Equações (5.4) a (5.6). Quando nitrato está presente no meio, o acúmulo de nitrito pode ser descrito pela Equação (5.5), enquanto que na ausência de nitrato (totalmente consumido), o consumo de nitrito é expresso pela Equação (5.6).

$$\frac{r_{NO_3}}{X} = - \frac{k_1}{X} \quad (5.4)$$

$$\frac{r_{NO_2}}{X} = \frac{k_1 - k_2}{X} \quad (5.5)$$

$$\frac{r_{NO_2}}{X} = - \frac{k_2}{X} \quad (5.6)$$

5.2.4 Testes em batelada adicionais

Testes em bateladas adicionais foram realizados para determinação do fator de conversão substrato em células para as bactérias desnitrificantes (Y_d) de modo a avaliar o crescimento celular desses organismos. Os testes foram conduzidos somente com a fração suspensa da biomassa do MBBR, retirando-se todos os suportes do reator. No início dos testes, procedeu-se a dosagem de meio contendo nitrato e DQO (na forma de acetato) no reator, de modo que a DQO inicial e o nitrato não limitassem a síntese celular. Para o cálculo de Y_d , coletou-se uma amostra no tempo zero (começo do experimento) e após 1 hora do início do teste. Imediatamente após a coleta de amostras nesses intervalos de tempo, realizaram-se análises de DQO e sólidos suspensos voláteis (SSV), sendo assim possível calcular Y_d , conforme a Equação (5.7) (METCALF &

EDDY, 2016). Esses testes foram conduzidos somente nos regimes operacionais com participação expressiva da biomassa suspensa.

$$Y_d = \frac{g \text{ biomassa produzida}}{g \text{ substrato consumido}} = \frac{SSV_{if} - SSV_{fi}}{DQO_f - DQO_i} \quad (5.7)$$

Os índices i e f descrevem os termos inicial e final, respectivamente.

Para efeito de comparação, o fator Y_d também foi calculado levando em conta o substrato convertido (DQO removida) e a geração de sólidos durante a operação contínua dos reatores.

5.2.5 Determinação da mínima relação DQO/N para desnitrificação

Para o cálculo da mínima relação DQO/N teórica capaz de permitir a remoção integral de nitrato e nitrito, considerando o crescimento celular e portanto o fator de conversão substrato em células (Y_d) das bactérias heterotróficas desnitrificantes, são utilizadas as Equações (5.8) e (5.9), respectivamente (METCALF & EDDY, 2016).

$$\frac{gDQO}{g NO_3-N} = \frac{2,86}{(1-1,42Y_d)} \quad (5.8)$$

$$\frac{gDQO}{g NO_2-N} = \frac{1,71}{(1-1,42Y_d)} \quad (5.9)$$

Sendo 2,86 o oxigênio equivalente de nitrato, 1,71 o oxigênio equivalente de nitrito e 1,42 a relação entre a quantidade de oxigênio requerida para oxidação de 1 g célula (como SSV), isto é, gO₂/gSSV (ou gDQO/gSSS).

Assim, o percentual de remoção de DQO por outras vias alternativas, que não a desnitrificação, foi calculado com base na mínima relação DQO/N necessária para completa conversão do nitrato. O cálculo foi efetuado conforme a Equação (5.10).

$$\text{Remoção de DQO por vias alternativas} = \left(\frac{DQO_R - (C_N * DQO/N_{min})}{DQO_e} \right) * 10 \quad (5.10)$$

DQO_e – DQO na entrada (mg/L)

DQO_R – DQO removida total (mg/L)

C_N – Concentração de nitrato removido (mg/L)

DQO/N_{min} – Mínima relação DQO/N necessária para completa conversão completa do nitrato a nitrogênio gasoso (levando em conta o anabolismo microbiano)

5.2.6 Avaliação dos gases intermediários gerados na desnitrificação

A magnitude do fluxo de emissão de N₂O foi mensurada na interface água - atmosfera utilizando-se a técnica do funil embocado (RIBEIRO *et al.* 2013). A emissão desse gás foi medida no regime 3, no qual foram empregadas as maiores cargas nitrogenada e orgânica. Nessa técnica, os gases desprendidos na interface líquido-gás são capturados imergindo-se parcialmente um funil no reator para coleta da amostra. Após a imersão, esperou-se um tempo de aproximadamente 3 minutos para estabilização da concentração de N₂O no *headspace* do funil. A coleta foi realizada em

triplicata. O fluxo de N₂O foi calculado segundo a Equação (5.11), por meio do produto da vazão de gás alimentada ao reator (Q) pela diferença entre a concentração média de N₂O no *headspace* do funil e sua concentração na atmosfera (ΔN_2O), dividida pela área (A) total da interface água-atmosfera do reator.

$$F = (Q \times \Delta N_2O)/A \quad (5.11)$$

As amostras foram analisadas no mesmo dia da amostragem por meio de um cromatógrafo a gás equipado com coluna empacotada com Porapak-Q, mantida a 60°C, e detector de captura de elétrons (⁶³Ni), operado a 340°C. O gás utilizado para o arrase foi o argônio contendo 5% de metano.

5.2.7 Métodos analíticos

As concentrações de nitrito e nitrato foram mensuradas utilizando-se kits colorimétricos da marca HACH. O kit para análise de nitrato foi o NitraVer® 5 e o kit para quantificação de nitrito foi o NitriVer®5. Ambos foram lidos no espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR2800. A DQO foi analisada segundo o método colorimétrico 5220 (APHA, 2005). Os sólidos totais aderidos aos suportes (SAT) e os sólidos voláteis aderidos (SAV) foram obtidos por meio do método descrito no Capítulo 4 (item 4.2.4). Os sólidos suspensos totais (SST) e os voláteis (SSV) foram determinados de acordo com método gravimétrico 2540 (APHA, 2005). Os sólidos totais voláteis (STV) presentes no interior do reator foram determinados pela soma de SAV e de SSV. Além desses parâmetros, pH, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura foram constantemente monitorados por meio um eletrodo da marca Digimed DM-23 e com auxílio de um oxímetro WTW InoLabOxi 7310, respectivamente.

5.3 Resultados

5.3.1 Operação do reator desnitrificante: perfis de DQO, nitrato/nitrito e ácido nitroso

O reator desnitrificante foi operado continuamente por aproximadamente 700 dias, durante os quais foram testados 11 regimes operacionais, conforme descrito no item 5.2.2. Nesses regimes, foi variado o aporte de nitrato e, por conseguinte, a DQO afluente, para garantir que as relações DQO/N pré-estabelecidas fossem obtidas. A razão DQO/N variou, em média, de 5 a 24, dependendo da condição experimental (Tabela 5.4 e Figura 5.3). Com objetivo de manter a relação DQO/N desejada, a DQO afluente foi variada, em média, de 150 a 5.050 mg/L nos regimes operacionais estudados. Conforme pode ser observado na Figura 5.3, até a condição experimental 9, a relação DQO/N foi mantida em valores menores, particularmente entre 5 e 7, de modo a avaliar a menor relação DQO/N que permitiria desnitrificação completa no sistema MBBR. Durante esse período, a dinâmica dos sólidos voláteis totais (aderidos e suspensos) em função da carga orgânica variável e os efeitos adversos na microbiota aliados ao possível acúmulo de nitrito em regimes com altas concentrações de nitrato afluente foram avaliados. Nos regimes subsequentes (10 e 11), um excesso de matéria orgânica foi adicionado de modo a avaliar a remoção de DQO via metabolismo desnitrificante e/ou outro alternativo.

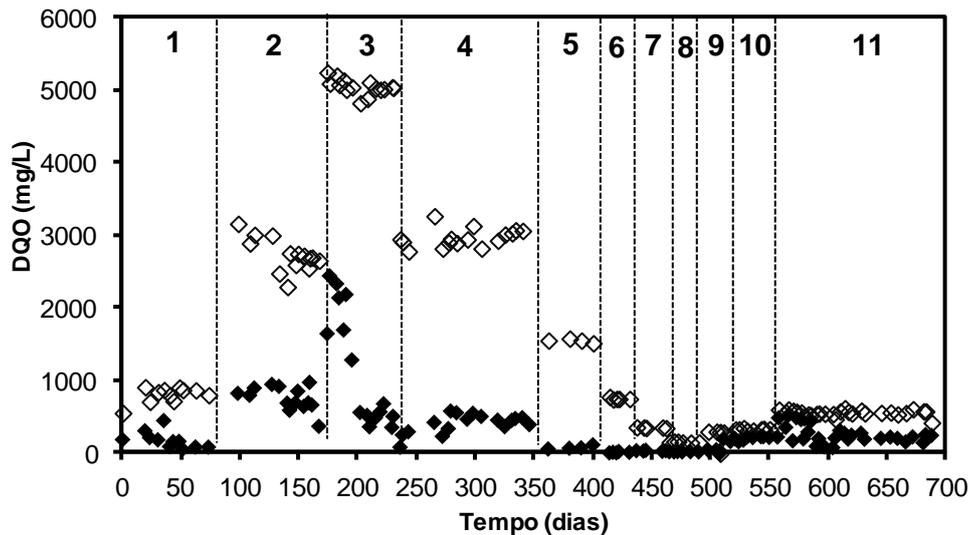


Figura 5.3.: Valores experimentais da relação DQO/N-NO₃ durante operação do sistema MBBR desnitrificante.

A Figura 5.4 apresenta a DQO na entrada e saída do sistema ao longo da operação do reator. Conforme pode ser observado, a eficiência de remoção de DQO foi superior a 90% para os regimes operacionais 5 – 9. Durante a maior parte desse período, a DQO remanescente na saída do reator foi mínima, e, conforme será abordado em seguida, nitrato e/ou nitrito foram encontrados no efluente do reator. Esses resultados indicam que possivelmente tenha ocorrido limitação de carbono orgânico para a desnitrificação, isto é, a relação DQO/N foi provavelmente insuficiente para a completa redução dos compostos nitrogenados oxidados. No entanto, nas demais condições operacionais (1 – 4, 10 e 11), as eficiências de remoção de matéria orgânica foram inferiores. Nos três primeiros regimes (DQO/N equivalente a 7), a remoção média de DQO foi de 75%, enquanto que no quarto regime, esse índice foi de 85%. Nos regimes 10 e 11 (relação DQO/N de 15 e 25, respectivamente), somente 37% e 54% da DQO afluyente foram removidas, respectivamente. Em função da DQO remanescente no efluente nos regimes operacionais 1 – 4, 10 e 11, pode-se inferir que a DQO adicionada

ao meio foi mais que suficiente para promover a desnitrificação completa, ou seja, pode ter havido carência de acceptor de elétrons para proporcionar completa remoção da matéria orgânica afluyente. No entanto, isso não é válido para o regime 4 (DQO/N = 5), em particular, conforme será abordado posteriormente. O propósito dos três primeiros regimes foi justamente investigar o comportamento do sistema frente a cargas crescentes de nitrato em condições sem limitação de matéria orgânica. Já nos regimes 10 e 11, conforme já explicitado, a matéria orgânica foi dosada em excesso para avaliar a sua remoção em condições anóxicas (com nitrato, pela desnitrificação) ou outro metabolismo alternativo em condições sem aceptores de elétrons externos.

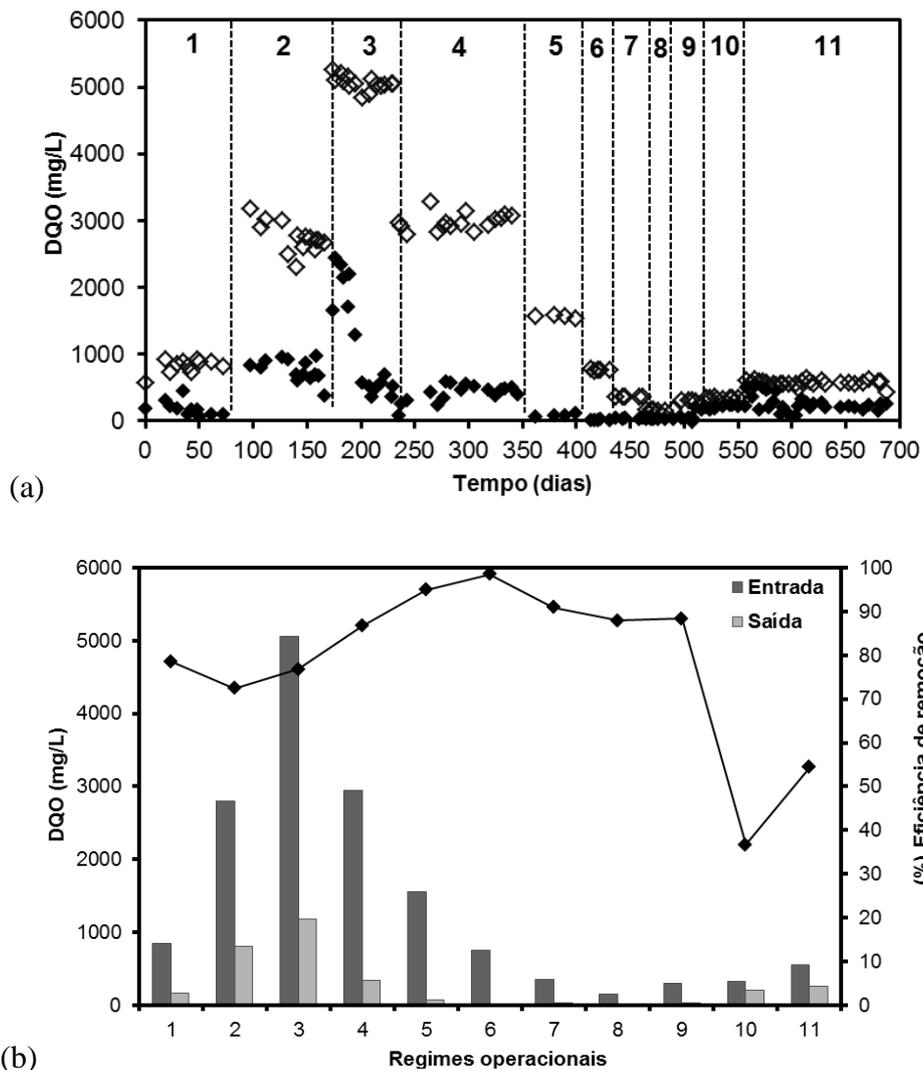


Figura 5.4.: (a) DQO afluente (\diamond) e efluente (\blacklozenge) ao longo dos 11 regimes de operacionais e (b) valores médios de DQO na entrada e saída do sistema e a eficiência de remoção de DQO em cada condição de operação.

A Figura 5.5 apresenta a concentração de nitrato na entrada e a concentração de nitrato e nitrito na saída do sistema. Como pode ser observado, a concentração afluente de nitrato foi aumentada gradualmente (do regime 1 ao 3) até o valor máximo de aproximadamente 650 mgNO₃-N/L, o que corresponde a uma carga nitrogenada de 2.6 kgNO₃-N/(m³.d). No regime 4, tal condição foi mantida, e, em seguida, a concentração de nitrato foi reduzida progressivamente até em torno de 15 mgNO₃-N/L no regime 10.

Nos regimes nos quais relação DQO/N era superior a 5 (1 – 3, 9 – 11), praticamente todo o nitrato foi consumido (remoção acima de 97%) (Figura 5.5). Porém, nos regimes 4 a 8, nos quais a relação DQO/N foi mantida próxima a 5, houve uma sobra significativa de nitrato. Nesses regimes, a remoção média de nitrato foi quase que constante, permanecendo próxima a 65%, muito inferior ao alcançado em regimes com relação DQO/N superior a 5. É importante destacar que nos regimes em que houve sobra de nitrato, especialmente entre o 5 e 8, mais de 90% da DQO afluente foi consumida.

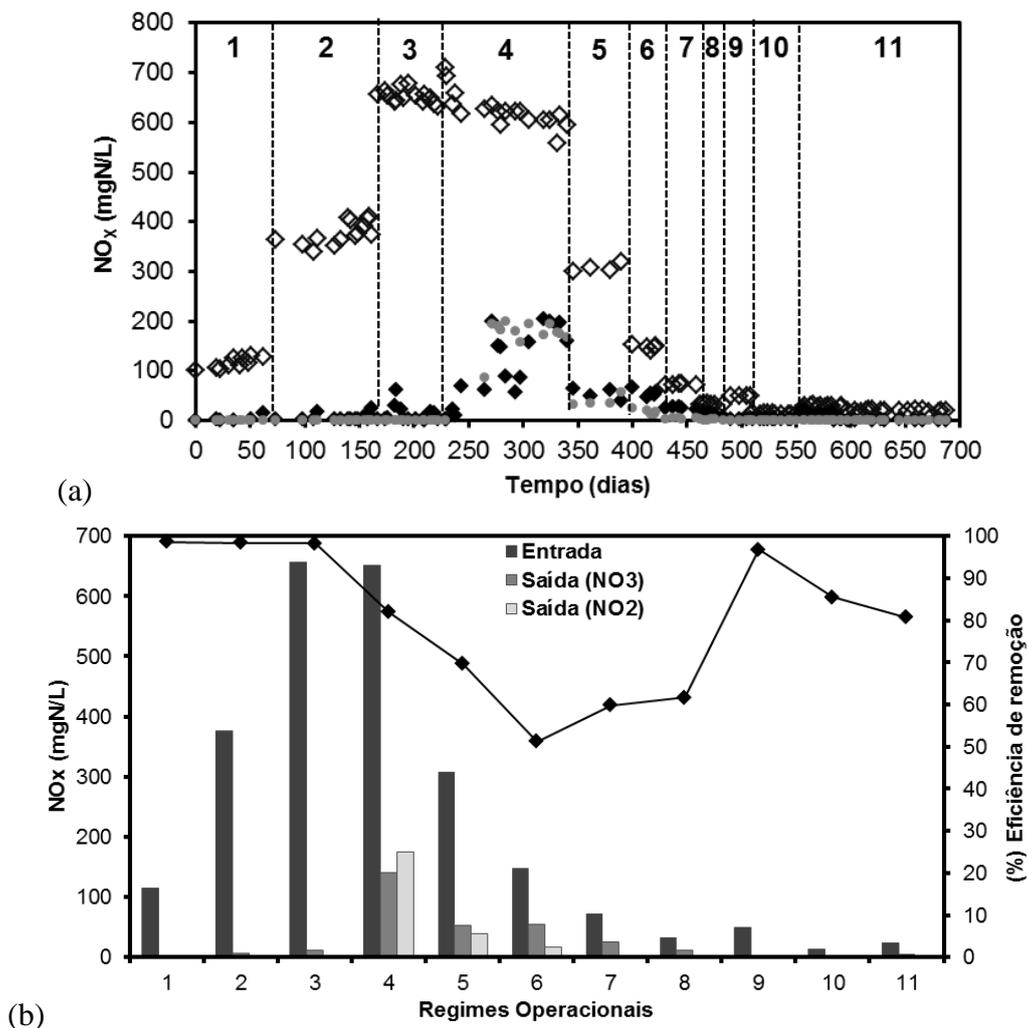


Figura 5.5.: Concentração das espécies nitrogenadas ao longo dos 11 regimes operacionais: nitrato afluente (\diamond), nitrato (\blacklozenge) e nitrito (\bullet) efluente, (b) média das espécies nitrogenadas na entrada (NO_3) e saída (NO_3 e NO_2).

Em alguns regimes operacionais em que houve sobra de nitrato, ou seja, em que a relação DQO/N foi de 5, observou-se desnitrificação incompleta, refletindo no acúmulo de nitrito. Esse acúmulo foi mais pronunciado no regime operacional 4, no qual a concentração de nitrito chegou a atingir 180 mgNO₂-N/L, embora ainda houvesse matéria orgânica (DQO) disponível para a desnitrificação (Figura 5.4 (a) e (b)). No regime 5, o acúmulo de nitrito foi um pouco menor, porém as suas concentrações efluentes alcançaram aproximadamente 50 mgNO₂-N/L. É importante mencionar que nos regimes operacionais 4 e 5, a concentração afluenta de nitrato estava entre as concentrações mais elevadas testadas (650 e 300 mgN/L, respectivamente), o que também pode ter influenciado no acúmulo de nitrito. Tais concentrações de nitrito são consideradas altas para sistemas desnitrificantes, podendo causar forte inibição às bactérias heterotróficas, provavelmente pela ação da forma não ionizada do nitrito, isto é, ácido nitroso (CHEN *et al.*, 1991; GLASS *et al.*, 1997). De fato, o regime operacional 4 apresentou a maior concentração de ácido nitroso, atingindo uma média de 0,013 mgHNO₂-N/L em pH 7,5. Os demais regimes operacionais apresentaram concentração inexpressiva de ácido nitroso livre.

Deste modo, a matéria orgânica (DQO) remanescente no efluente observada no regime 4 pode estar diretamente relacionada ao acúmulo do nitrito no meio. Nessa condição experimental, esperava-se alcançar valores de DQO efluente compatíveis com aqueles observados nos regimes 5 a 8, nos quais também havia aceptor de elétrons suficiente para remoção completa da matéria orgânica afluenta (relação DQO/N de 5) (Figura 5.6). No entanto, foi registrada uma remoção média de DQO de 85%, havendo, portanto, uma sobra de aproximadamente 500 mg/L de DQO na saída do reator.

A Figura 5.6 apresenta os dados de pH ao longo dos regimes de operação. O pH da alimentação esteve em torno de 7,5, enquanto o pH da saída situou-se em torno de 8,6 (Figura 5.6).

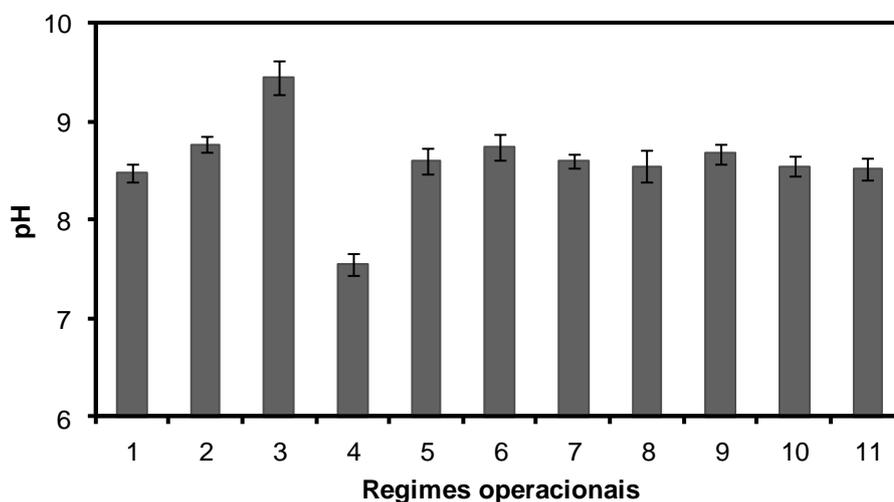


Figura 5.6.: Perfil do pH de saída durante os regimes operacionais.

Foram realizadas medições da emissão de óxido nitroso (N_2O) durante o regime de maior carga orgânica e nitrogenada (regime 3). Apesar das condições impostas serem as mais drásticas testadas, a quantidade de N_2O emitida foi de apenas 0,1% em relação ao total de nitrogênio removido, equivalendo a 0,6mg/L de óxido nitroso. Esse valor indica que a emissão de N_2O nesse sistema foi baixa, descartando a possibilidade de ter ocorrido desnitrificação incompleta até esse composto. Devido a limitações analíticas, a quantificação de N_2O não foi realizada em todos os regimes. Seria interessante observar se em razões DQO/N menores, insuficientes para desnitrificação completa, esse panorama seria alterado. É reportado na literatura que a competição entre as enzimas redutases envolvidas na desnitrificação pode levar ao acúmulo de N_2O em condições de limitação de carbono orgânico. De fato, estudos apontam que em relações DQO/N inferiores a 3,5, há quantidade expressiva de N_2O na fração gasosa de sistemas

desnitrificantes (BERNET *et al.*, 1996; ITOKAWA *et al.*, 2001). No entanto, outros fatores também podem contribuir na emissão desse gás, como, por exemplo, sistemas operando em pH reduzido, curtos tempos de retenção hidráulica, oxigênio dissolvido no meio e inibição por nitrito (LU *et al.*, 2014). Neste trabalho, a baixa emissão de N₂O observada no regime 3 foi consequência, da adequada relação DQO/N, pH ótimo e concentração de OD desprezível.

5.3.2 Avaliação da remoção simultânea de DQO e nitrato

Para entender melhor a remoção de DQO e nitrato, que ocorre conjuntamente como resultado do metabolismo desnitrificante, a Figura 5.7 apresenta relação entre a carga nitrogenada removida ($\text{kgNO}_x\text{-N}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$) e a carga de DQO removida ($\text{kgDQO}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$). Vale mencionar que foram desconsiderados os dados do regime 4 (no qual possivelmente ocorreu inibição por nitrito) e dos regimes 10 e 11 (nos quais a DQO alimentada foi muito superior ao nitrato afluente). O coeficiente angular obtido por meio de regressão linear dos pontos experimentais indica a relação entre o consumo de matéria orgânica (DQO) e de nitrato, que, para esse trabalho, foi de 5,75 kgDQO consumida/kgNO₃-N removido. Essa análise que considera os resultados obtidos durante todo o período operacional é muito importante para o sistema em questão, uma vez que revela a mínima relação DQO/N para remoção completa de nitrato (no caso desse estudo o valor é 5,75). De fato, tal relação DQO/N ótima para sistema MBBR desnitrificante em questão (alimentado com acetato como fonte de carbono), foi confirmada pelos resultados do regime operacional 9, no qual foi usada a relação DQO/N de 6.

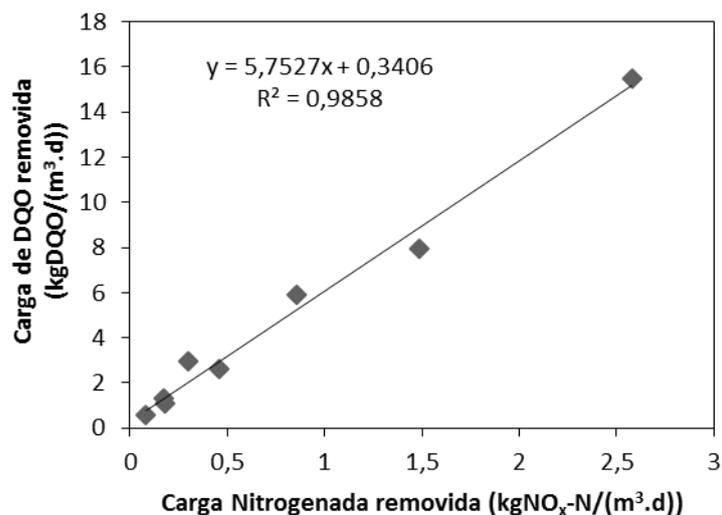


Figura 5.7.: Carga de DQO removida versus carga nitrogenada removida (a) nos regimes 1 – 3 e 5 – 9. Foram desconsiderados os dados do regime 4 (inibição por nitrato) e 10 e 11 (DQO/N superior a 20).

No intuito de calcular a mínima relação DQO/N teórica capaz de permitir a remoção integral de nitrato levando em conta também o consumo de matéria orgânica para o anabolismo celular (Equações 5.8 e 5.9), procedeu-se à determinação do fator de conversão de substrato em células (Y_d) para as bactérias heterotróficas desnitrificantes presente no reator. Os testes para determinação de Y_d foram realizados em batelada com a biomassa suspensa, de acordo com o descrito no item 5.2.4. Foram encontrados coeficientes de rendimento celular variando de 0,21 a 0,3 gSSV/gDQO, ou ainda 0,3 a 0,42 gDQO/gDQO. Esse último valor foi obtido expressando os sólidos em termos de DQO usando o fator de conversão 1,42 gO₂/gSSV, o qual corresponde à demanda de oxigênio necessária para oxidar 1 g de células (nesse caso expressas como SSV). Esses valores são bem parecidos com aqueles calculados durante a operação contínua dos reatores, levando em conta o substrato (DQO) convertido e a geração de sólidos ao longo do tempo.

Levando em conta o valor médio desse parâmetro durante os regimes operacionais (isto é, 0,27 gDQO/gDQO) e a razão DQO/N mínima de 2,86 necessária somente para a redução do nitrogênio, observa-se, pela Equação (5.8), uma relação de 4,52 kgDQO/kgNO₃-N necessária para a catabolismo e anabolismo. Esse valor foi 27% menor que a relação DQO/N mínima determinada experimentalmente, que foi de 5,75 kgDQO/kgNO₃-N.

A intenção dos regimes 10 e 11 nos quais razões DQO/N foram muito superiores ao mínimo requerido para completa desnitrificação foi avaliar se em condições de excesso de matéria orgânica, o perfil de consumo de DQO em relação ao nitrogênio alimentado seria distinto. Em outras palavras, o objetivo foi investigar se a remoção de DQO ocorreria não somente via ação das bactérias desnitrificantes, mas por outro metabolismo microbiano alternativo. Essa análise está ilustrada na Figura 5.8. Apesar do baixo percentual de remoção de DQO obtida nesses regimes operacionais, variando entre 37 – 54% (Figura 5.4), a remoção de DQO foi maior do que a esperada levando em conta a relação DQO/N de 5,75, necessária à desnitrificação e crescimento celular. Tal resultado sugere a existência de outras vias metabólicas. De fato, no regime 10, o percentual de remoção de DQO por vias alternativas, calculado pela Equação (5.13), correspondeu a 46% do total removido, enquanto no regime operacional 11, 65% de toda a DQO removida.

Interessante observar que nos regimes nos quais a relação DQO/N foi mais elevada, e, portanto, com maior carência de aceptor de elétrons em relação à matéria orgânica alimentada, o coeficiente de rendimento celular (Y), em geral, foi menor. Tal resultado está ligado à ocorrência de metabolismo alternativo, potencialmente anaeróbico, no qual o crescimento microbiano é menor.

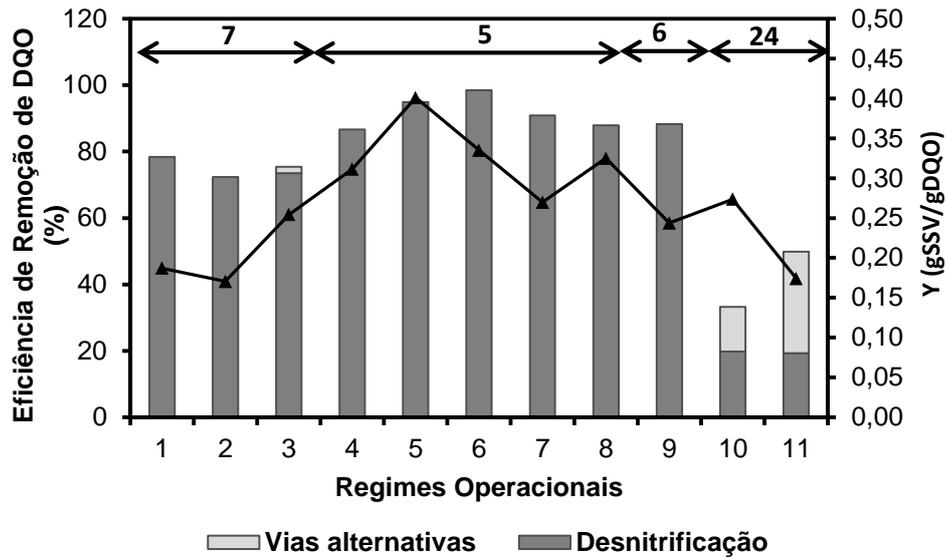


Figura 5.8.: Percentual de matéria orgânica removida pela reação de desnitrificação e por vias alternativas. A relação DQO/N está mostrada acima dos pontos experimentais.

5.3.3 Dinâmica dos sólidos ao longo dos regimes operação

A dinâmica dos sólidos no interior do MBBR durante os 11 regimes operacionais está mostrada na Figura 5.9, que ilustra os sólidos aderidos voláteis (SAV) e os sólidos suspensos voláteis (SSV). A concentração de sólidos imobilizados foi expressa em g/L para efeito de comparação com o teor de sólidos em suspensão.

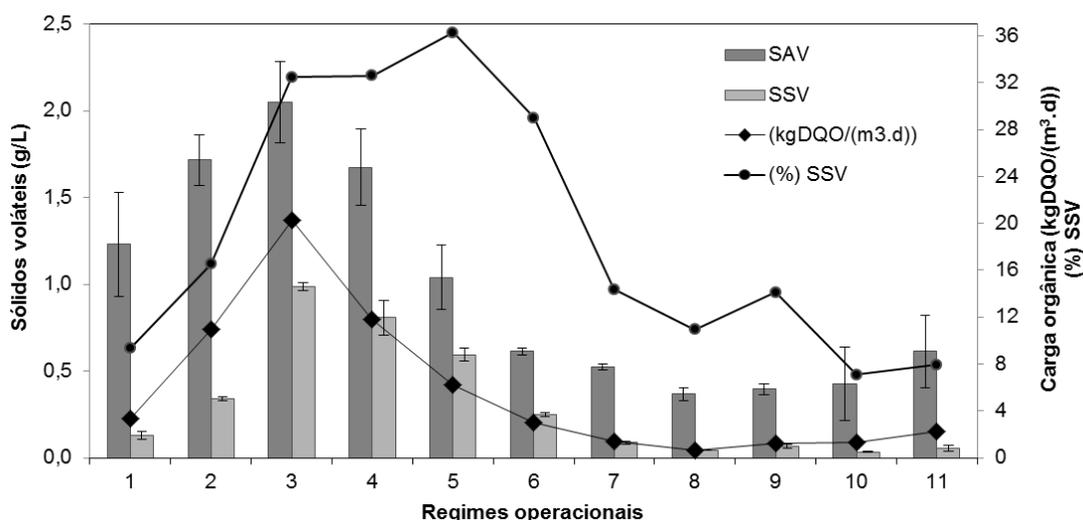


Figura 5.9.: Sólidos aderidos voláteis (SAV) e sólidos suspensos voláteis (SSV) ao longo da operação do reator. A carga orgânica aplicada e a porcentagem de SSV em relação ao total de sólidos voláteis (razão SSV/SAV+SSV) em cada condição operacional também estão indicadas no eixo secundário.

Conforme pode ser observado, a concentração de sólidos aderidos e suspensos voláteis estiveram diretamente relacionados com a carga orgânica aplicada. Essa relação está melhor representada na Figura 5.10. Os valores máximos de SAV e SSV, de 2,05 g/L e 0,98 g/L, respectivamente, foram observados no regime 3, no qual a carga orgânica alcançou em torno de 20 kgDQO/(m³.d). Nesse mesmo regime, a concentração de sólidos suspensos voláteis representou 32% dos sólidos voláteis totais (SVT) no meio reacional. A contribuição da biomassa suspensa também foi bastante expressiva nos regimes 4, 5 e 6 (Figura 5.9), condições comumente encontradas em sistemas híbridos integrando lodo ativado e MBBR (BASSIN *et al.*, 2016). Em função da presença significativa da fração de biomassa em suspensão, a sua contribuição no processo de desnitrificação foi mensurada por meio de testes de atividade, conforme será abordado adiante. Alguns trabalhos da literatura verificaram comportamento semelhante quando operaram reatores MBBR submetidos a altas cargas orgânicas (BASSIN *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2016). Em contrapartida, nos regimes 8, 9 e 10, a

concentração de sólidos aderidos e suspensos voláteis foi menor, equivalendo a 0,40 gSAV/L e 0,050 gSSV/L, respectivamente. Nesse mesmo período, o sistema foi submetido às menores cargas orgânicas, variando de 0,63 e 1,29 kgDQO/(m³.d).

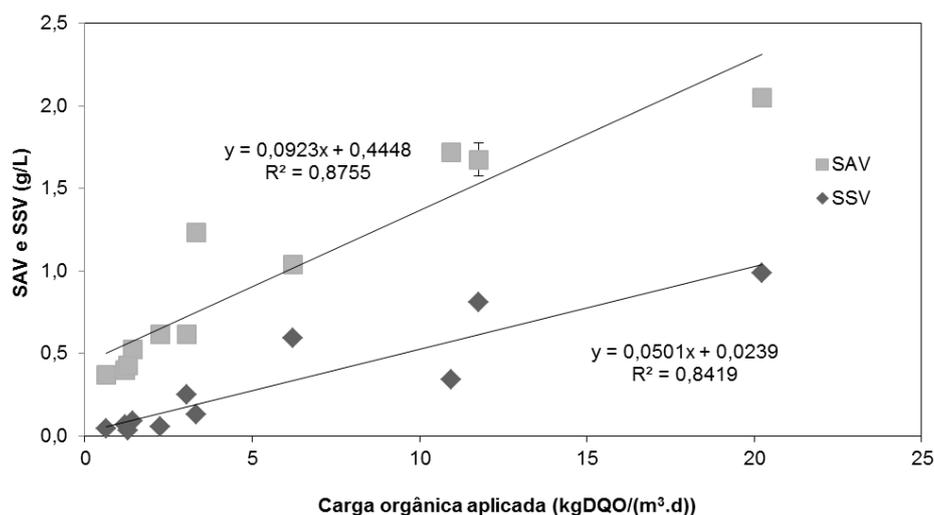


Figura 5.10.: Relação entre a concentração de sólidos aderidos voláteis (SAV) e sólidos suspensos voláteis (SSV) e a carga orgânica aplicada.

Conforme a carga orgânica foi aumentada, a concentração tanto de SAV como de SSV aumentou, embora a primeira tivesse um aumento mais pronunciado, conforme mostrado na Figura 5.10. A concentração de sólidos aderidos voláteis em sistemas de biomassa aderida, tal como MBBR, pode variar de acordo com a carga orgânica aplicada e outras condições operacionais, como por exemplo, aeração/agitação (que afetam a hidrodinâmica e o cisalhamento), e temperatura, pH, entre outros (que afetam o crescimento microbiano). No trabalho realizado por Bassin *et al.* (2016), foi constatado que o aumento gradual na carga orgânica volumétrica aplicada a um reator MBBR, contendo o mesmo suporte do usado neste trabalho, ocasionou o aumento da concentração de sólidos aderidos voláteis, que variou de 3 a 6 gSAV/L para uma carga

orgânica de 0,8 a 3,2 kgDQO/(m³.d), respectivamente. Já Lima *et al.* (2016) encontraram valores de 5,72 e 6,14 gSAV/L para carga orgânica variando de 0,53 a 3,2 kgDQO/(m³.d). Deve-se ressaltar que o método analítico para a quantificação de sólidos do presente trabalho foi distinto do método utilizado pelos autores mencionados, o que pode explicar diferenças no teor de sólidos aderidos em relação a outros sistemas MBBR submetidos a cargas orgânicas similares. Além disso, deve-se ressaltar que o crescimento bacteriano é menor em condições anóxicas (utilizadas nesse trabalho) do que em condições nas quais o oxigênio atua como acceptor final de elétrons (como nos trabalhos supracitados). Apesar da variação, os valores de sólidos aderidos voláteis estão dentro da faixa tipicamente encontrada para sistemas MBBR, que varia entre 2 a 8 gSAV/L (RUSTEN *et al.*, 1998).

A relação entre os sólidos aderidos voláteis e os sólidos aderidos totais (SAV/SAT), variou de 60 a 92% dependendo do regime operacional aplicado, com média de 75%. A parcela restante corresponde ao material inerte e biomassa mineralizada. Trabalhos na literatura reportam teores superiores de sólidos voláteis no lodo, como pode ser observado no trabalho de Lima *et al.* (2016) e o de Cao *et al.* (2016), que encontraram razões SAV/SAT superiores a 95% e 90%, respectivamente. No entanto, alguns trabalhos também reportam baixos valores para essa relação em reatores MBBR. Gong *et al.* (2012), investigando o tratamento de efluente rural, obtiveram um percentual de sólidos voláteis de 55% no reator. Os autores atribuíram esse resultado à carga variável de substrato e à força de cisalhamento do meio reacional. Fonseca (2016) operou um reator MBBR piloto alimentado com esgoto sanitário e submetido à carga afluente variável, e observou valores de SAV/SAT na faixa de 75 a 85%. O autor atribuiu esse resultado às características atípicas do afluente, que apresentavam características singulares, como por exemplo, baixa concentração de

matéria orgânica e alta salinidade. Já a proporção de sólidos voláteis em relação aos sólidos totais para a fração suspensa do lodo (isto é, SSV/SST) foi em média de 70% durante toda operação do reator desnitrificante. Os resultados apontam que a variação da relação SAV/SAT e SSV/SST ao longo dos regimes esteja provavelmente relacionada à variação da carga orgânica afluyente, que influenciou a quantidade de matéria orgânica disponível no meio e, portanto, a manutenção de condições exógenas (com DQO externa presente) ou endógenas (sem DQO externa presente) (Figura 5.4). De fato, nos regimes operacionais em que houve sobra de matéria orgânica, a relação entre sólidos voláteis e totais (tanto para a fração suspensa como aderida) foi superior a 90%, ao passo que nos regimes operacionais em que a DQO efluente foi praticamente nula e, portanto, com possibilidade de ocorrência de condições endógenas, essa relação foi em média 65%.

A quantidade de sólidos aderidos por m^2 também foi estimada. Ao longo dos regimes operacionais, grande variação desse parâmetro foi observada, de 3,0 a 16,4 gSAV/ m^2 . A maior quantidade de biomassa por m^2 foi observada no regime 3, no qual foi aplicada a maior carga orgânica.

5.3.4 Avaliação da taxa específica desnitrificante

Testes em batelada foram realizados para determinação da máxima taxa específica desnitrificante entre os regimes 1 a 9, de modo a contemplar diferentes condições operacionais. Coeficientes de correlação maiores que 0,97 foram obtidos considerando uma cinética de ordem zero para a desnitrificação, isto é, independente da concentração de nitrato (FOGLAR *et al.*, 2005). Essa abordagem foi usada em função de se trabalhar em condições sem limitação de substrato. As taxas específicas de

desnitrificação variaram de 8,93 a 60 mgN-NO₃/(gSVT.h), conforme mostrado na Figura 5.11.

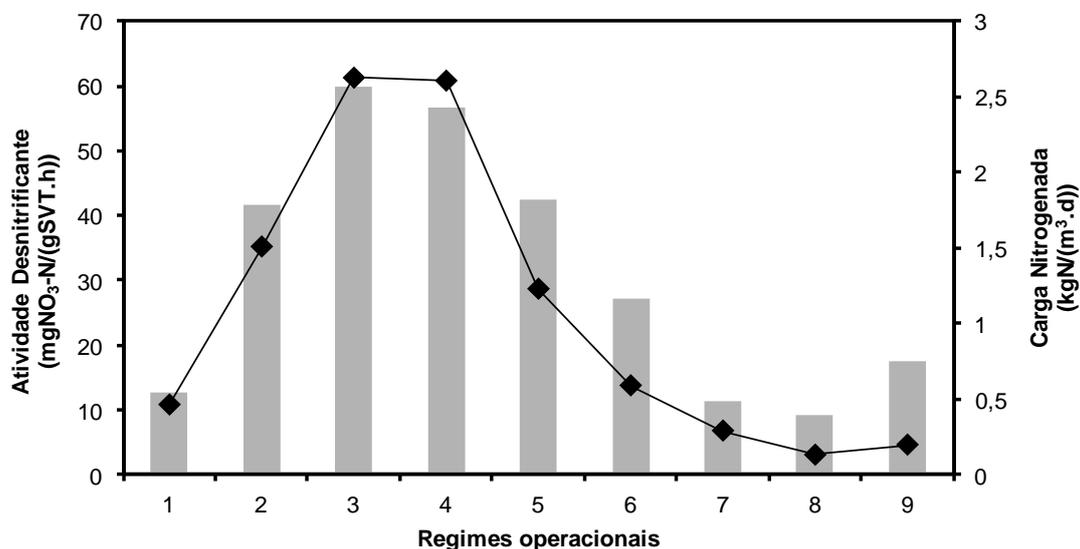


Figura 5.11.: Taxa específica desnitrificante ao longo dos regimes operacionais de 1-9 (barras). A carga nitrogenada aplicada (♦) também está ilustrada no gráfico.

Conforme pode ser observado, houve um incremento na máxima taxa específica desnitrificante do regime 1 ao 3, o qual pode ser explicado pelo aumento na carga de nitrato aplicada, de 0,46 a 2,62 kgNO₃-N/(m³.d), respectivamente. Concomitantemente, a taxa específica desnitrificante passou de aproximadamente 13 para 60 mgNO₃-N/(gSTV.h), correspondendo a um aumento de mais de 4,5 vezes. Nos regimes subsequentes (4 a 8), no qual a relação DQO/N foi fixada em 5 e a carga de nitrato foi gradualmente reduzida de 2,60 para 0,13 kgNO₃-N/(m³.d), a taxa específica desnitrificante decaiu de aproximadamente 57 para 9 mgNO₃-N/(gSTV.h).

Tendo em vista a quantidade expressiva de sólidos em suspensão a partir do segundo regime operacional, chegando a representar cerca de 36% dos sólidos voláteis totais do sistema desnitrificante (Figura 5.9), procurou-se avaliar a participação dessas

bactérias na desnitrificação. Para tanto, foram avaliadas separadamente a atividade dos micro-organismos suspensos, aderidos e do sistema global (suspensão + aderido) (os procedimentos desses experimentos estão descritos no item 5.2.3). As cargas volumétricas de desnitrificação obtidas com cada fração de biomassa estão mostradas na Tabela 5.5.

Tabela 5.5.: Cargas volumétricas de desnitrificação obtidas com as diferentes frações de biomassa (suspensa e aderida) para os regimes 2 a 9.

Regimes	Carga volumétrica de desnitrificação (mgNO _x -N/(L.h))		Fração de biomassa em relação ao total (%)	
	Biomassa Suspensa	Biomassa aderida ^a	Biomassa suspensa	Biomassa aderida
2	44,9	40,5	53	47
3	125,3	56,7	69	31
4	56,1	84,7	40	60
5	24,3	48,5	33	67
6	6,02	17,4	26	74
7	1,34	5,6	19	81
8	1,5	2,63	29	71
9	2,65	8,9	23	77

^a Calculada a partir da diferença entre a carga volumétrica obtida com ambas as frações da biomassa (aderida+suspensa) e aquela obtida somente com a biomassa em suspensão. Nos regimes 3 e 4 foram realizados testes somente com biomassa aderida (removendo os sólidos suspensos), e os resultados confirmaram a validade do procedimento anterior.

A Figura 5.12 apresenta a contribuição dos sólidos aderidos e voláteis na desnitrificação em cada regime operacional, estimadas por meio das cargas volumétricas de desnitrificação obtidas com cada fração de biomassa.

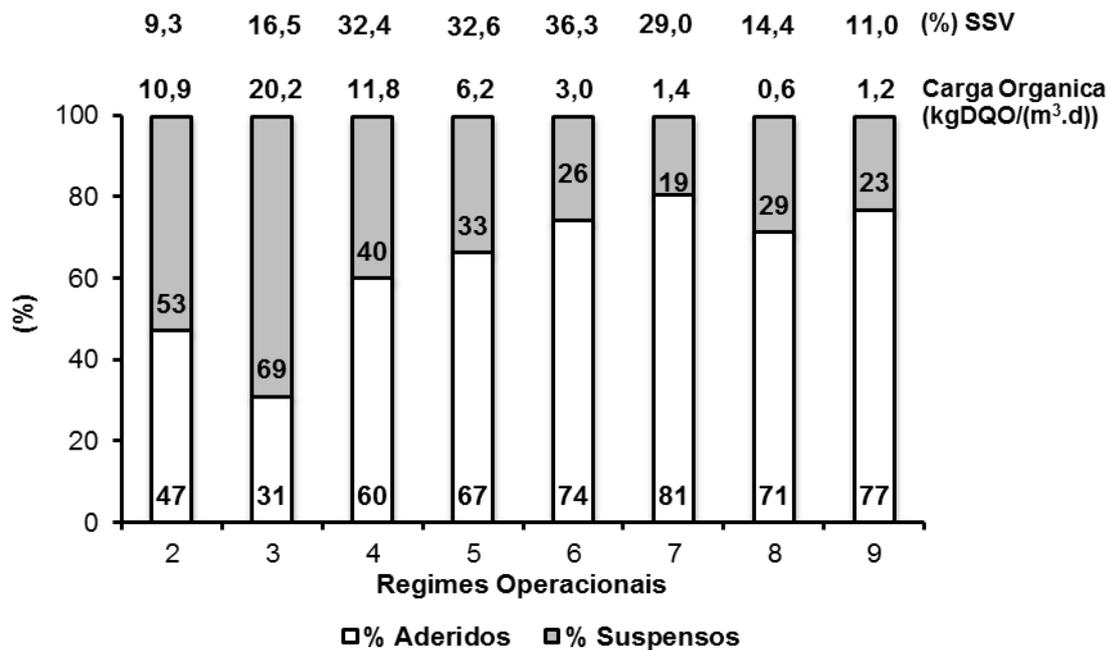


Figura 5.12.: Contribuição dos sólidos suspensos e aderidos na desnitrificação em diferentes regimes de operação. Os números dentro das barras indicam o percentual de contribuição de cada fração de biomassa. A carga orgânica aplicada está mostrada acima dos pontos experimentais, assim como a fração de SSV em cada regime operacional.

De acordo com os resultados obtidos nos testes de atividade em batelada, pode-se inferir que o aumento da carga orgânica (Tabela 5.4) e o conseqüente incremento dos sólidos suspensos (Figura 5.9) levaram ao aumento da participação dos sólidos em suspensão na conversão de nitrato/nitrito no MBBR (Figura 5.12). Tal evidência é especialmente observada nos regimes 2 a 5, nos quais elevadas cargas orgânicas (superiores a 6,2 kgDQO/m³.d) levaram a maiores percentuais de desnitrificação pela biomassa em suspensão, chegando a 69% no regime 3, no qual foi aplicada a maior carga orgânica (Figura 5.12).

É interessante ressaltar que a biomassa suspensa, mesmo em proporções menores em relação à biomassa aderida, contribuiu mais para a desnitrificação que essa última. Tal assertiva pode ser comprovada, por exemplo, quando são analisados os resultados dos regimes 2 e 3, nos quais a biomassa suspensa representou 9,3 e 16,5% do

total de sólidos voláteis, embora tenha contribuído, respectivamente, para 53 e 69% da desnitrificação global do sistema (conforme estimado pelas cargas volumétricas de redução de nitrato com cada fração de biomassa). Esses dados indicam que a taxa específica da biomassa suspensa (taxa por grama de células) é superior à da biomassa aderida, conforme é ilustrado na Tabela 5.6 e Figura 5.13. A única exceção foi observada para o regime 6, no qual a taxa específica do lodo suspenso foi ligeiramente menor que a do lodo aderido.

Tabela 5.6.: Taxa específica desnitrificante para as frações de biomassas suspensa e aderida ao longo dos regimes operacionais de 1 a 9.

Regime	Taxa específica desnitrificante (mgN-NO ₃ /(gSV ^a .h))		
	Total (STV) ^b	Suspenso (SSV)	Aderido (SAV)
1	12,8	-	-
2	41,5	132,0	23,6
3	60,0	127,2	34,1
4	56,7	69,3	42,9
5	42,6	41,8	39,1
6	27,2	24,1	28,5
7	11,3	15,7	10,8
8	9,2	23,2	7,2
9	17,4	68,3	22,5

^a SV pode ser representado como sólidos totais voláteis (STV), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos aderidos voláteis (SAV).

^b Dados já mostrados na Figura 5.9

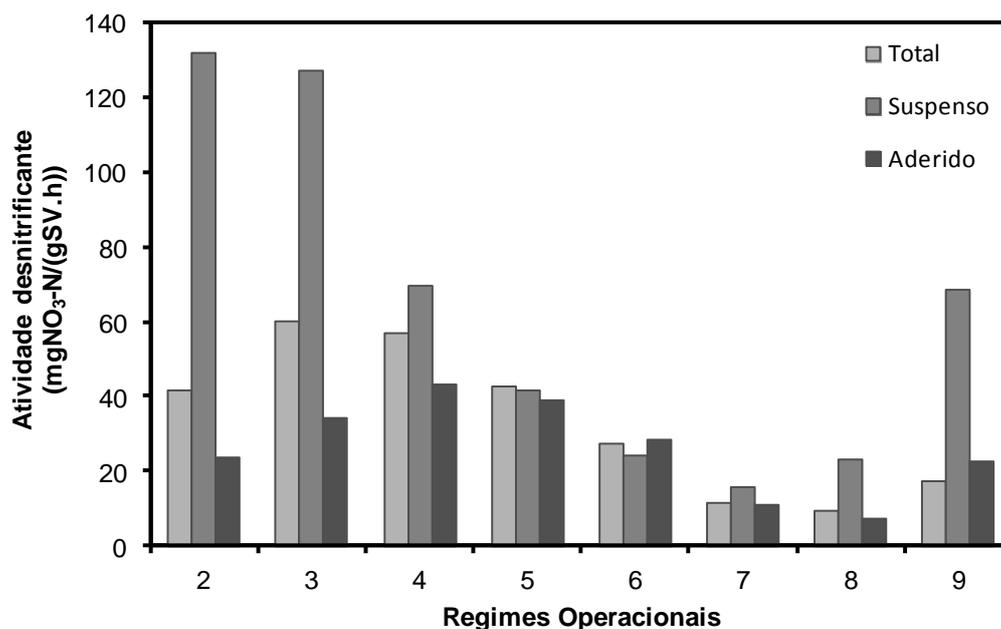


Figura 5.13.: Taxa específica desnitrificante das diferentes frações de biomassa do reator ao longo dos regimes operacionais 2 a 9.

^a SV pode ser representado como sólidos totais voláteis (STV), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos aderidos voláteis (SAV).

5.4 Discussão

5.4.1 Efeito da relação DQO/N na desnitrificação e no crescimento bacteriano

Um dos fatores mais importantes no processo de desnitrificação é a relação DQO/N. O carbono orgânico disponível no meio não é usado somente para respiração celular usando nitrato/nitrito como aceptor de elétrons, mas também para o crescimento e manutenção celular (CONSTANTIN & FICK, 1997). Portanto, depende de alguns parâmetros intrínsecos à microbiota desnitrificante, tais como o fator de conversão substrato em células (Y_d). Ademais, a relação DQO/N ideal depende diretamente da fonte de substrato utilizada, e os valores típicos para essa razão em sistemas desnitrificantes encontram-se na faixa entre 4 e 15.

Com o objetivo de determinar a razão DQO/N que permitisse atingir remoção completa de nitrato no sistema MBBR alimentado com acetato como fonte de carbono externa, várias razões DQO/N foram avaliadas. Observou-se que a mínima relação DQO/N necessária para a remoção de nitrogênio foi em torno de 6 kgDQO/kgNO₃-N. Esse valor é próximo ao reportado por Fernandez-Nava *et al.* (2010), que observaram desnitrificação completa utilizando uma relação DQO/N de 5, também empregando acetato como fonte de carbono. Além disso, esses autores também testaram outras fontes de carbono, e obtiveram razões DQO/N ótimas variando de 4,6 a 6,5. Yuan *et al.* (2017) relataram altas remoções de nitrogênio quando a relação DQO/N foi de 4,6 em um sistema MBBR. Fernandez-Nava *et al.* (2008) encontraram uma relação ótima de 3,6 utilizando metanol como fonte extra de carbono.

Com base nos resultados obtidos, os regimes operacionais investigados podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo é composto pelos regimes em que a relação DQO/N foi superior a 6 e, portanto, suficiente para promover remoção total de nitrogênio (Figura 5.14). O segundo grupo é constituído pelos regimes nos quais a razão DQO/N foi inferior a 6, havendo, portanto, remoção parcial de nitrogênio (Figura 5.15). Nos regimes com remoção completa de nitrogênio (1, 2, 3, 9, 10 e 11) não foi observado qualquer acúmulo de nitrito. Em contrapartida, nos demais regimes (4 a 8), ocorreu acúmulo de nitrito, principalmente em condições de maior carga nitrogenada afluyente (4 e 5). Para ser ter uma ideia, o nitrito chegou a representar mais de 50% do nitrogênio total efluente no regime 4 (Figura 5.5).

Conforme reportado na literatura, o acúmulo de nitrito pode ser causado por diversos fatores, tais como limitação de doador de elétrons, presença de oxigênio, ou tempo de retenção hidráulica insuficiente (GLASS & SILVESTEIN, 1998; METCALF

& EDDY, 2016). Alguns trabalhos relatam que o acúmulo de nitrito ocorreu devido à perda da atividade da enzima nitrito redutase na presença de acetato (VAN RIJN *et al.*, 1996). Uprety *et al.* 2012 atribuíram o acúmulo de nitrito à elevada relação A/M (alimento/micro-organismo) e armazenagem de substrato pela biomassa, de forma que uma restrita quantidade de carbono estava disponível para a reação de redução do nitrito. Na presente pesquisa, acredita-se que o acúmulo de nitrito se deve à limitação de matéria orgânica, assim como observado em outros trabalhos (MCADAM & JUDD, 2007; WANG *et al.*, 2009; SHEN *et al.*, 2009). No entanto, inibição por esse composto (nitrito) também pode ter ocorrido.

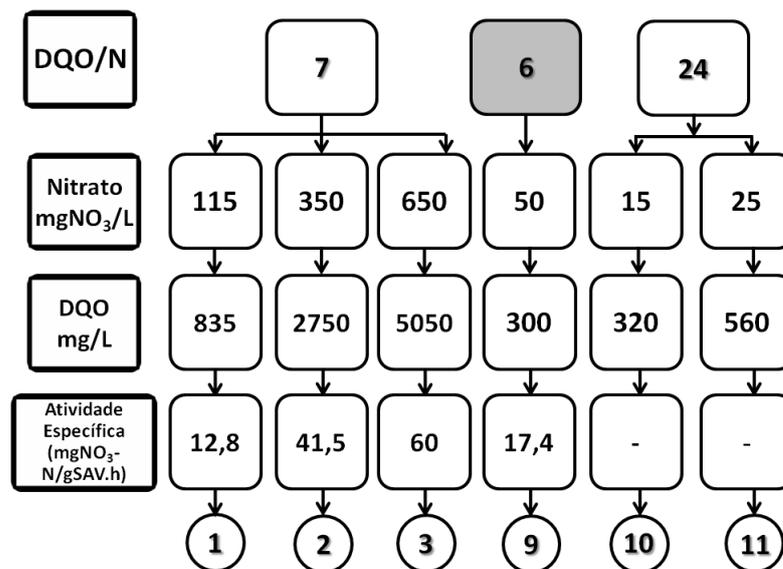


Figura 5.14.: Regimes operacionais nos quais se observou remoção completa de nitrogênio. O regime 6 está destacado por ser aquele no qual a relação DQO/N esteve próxima da mínima necessária para completa conversão de nitrato.

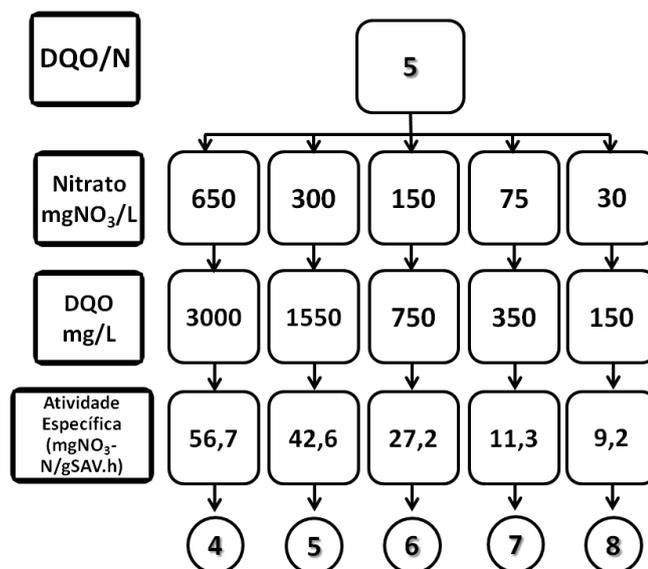


Figura 5.15.: Regimes operacionais com remoção parcial de nitrogênio.

Altas concentrações de nitrito podem inibir a desnitrificação, conforme reportado por GLASS & SILVERSTEIN (1998). Além disso, podem levar ao aumento da concentração de ácido nitroso, o qual também pode causar efeito adverso à desnitrificação (ABELING & SEYFRIED, 1992; GLASS *et al.*, 1997). Nesse trabalho, o efeito inibitório do nitrito e/ou de sua forma não ionizada (ácido nitroso) foi observada no regime 4 (DQO/N=5). Nessa condição experimental, mesmo havendo acceptor de elétrons suficiente para remoção completa da matéria orgânica, tal situação não foi observada, diferentemente do que ocorreu nos regimes 5 a 8, nos quais foi aplicada a mesma relação DQO/N. A concentração de ácido nitroso foi calculada para os regimes 4 e 5, nos quais o acúmulo de nitrito foi mais pronunciado (180 e 50 mgN/L, respectivamente). Os valores obtidos foram 0,013 e 0,0003 mgHNO₂/L para os regimes 4 (pH igual a 7,5) e 5 (pH igual a 8,0), respectivamente. Estudos reportaram que baixas concentrações ácido nitroso, por exemplo, de 0,04 mgHNO₂-N/L, foram capazes de inibir a desnitrificação (ABELING & SEYFRIED, 1992). GLASS *et al.* (1997) concluiu

que concentrações mais baixas de HNO_2 , inferiores a $0,02 \text{ mgHNO}_2\text{-N/L}$ em pH 6, também favoreceram a inibição da desnitrificação. Desse modo, é possível que esse composto tenha exercido inibição da desnitrificação no regime operacional 4, mesmo presente em baixas concentrações.

Os resultados oriundos dos regimes de operação nos quais a relação DQO/N foi extremamente elevada, isto é, quando a DQO afluente foi adicionada em excesso em relação ao mínimo requerido para completa desnitrificação (regimes 10 e 11), revelaram que, em situação de carência de aceptor de elétrons para oxidação anóxica da matéria orgânica, essa foi removida por vias alternativas, sem depender da presença de nitrato ou nitrito. Adicionalmente, foi observado que, sob a mesma razão DQO/N, a remoção de DQO por metabolismo alternativo cresce à medida que a carga orgânica aplicada aumenta. Tal efeito pode ser claramente observado quando se compara os regimes 10 e 11. Estudos apontam que, em sistemas anaeróbios, a atividade metanogênica ocorre somente após a desnitrificação, isto é, na ausência dos aceptores de elétrons. A presença de aceptores de elétrons energeticamente mais favoráveis do que o CO_2 , como por exemplo, nitrato, nitrito e sulfato, faz com que eles sejam reduzidos em detrimento daquele, e, por conseguinte, a produção de metano não ocorre (KLUBER & CONRAD, 1998). Por outro lado, na ausência desses, as bactérias facultativas podem usar vias metabólicas alternativas para síntese celular de modo que o carbono orgânico remanescente após a desnitrificação possa ser convertido em metano e dióxido de carbono (AKUNNA *et al.*, 1991, 1993, RUSTRIAN *et al.*, 1997).

Em um sistema de biomassa aderida, foi demonstrado que as bactérias desnitrificantes levam à formação de um biofilme menos denso e com maior taxa de crescimento, crescendo preferencialmente na superfície externa do suporte, enquanto as

bactérias anaeróbias possuem taxa de crescimento mais lenta, se acumulando no interior do biofilme (LIN&CHEN, 1995, ZELLNER *et al.*, 1995). De fato, a ação de bactérias anaeróbias no biofilme pode ser comprovada pelo alto consumo de matéria orgânica sem acceptor de elétrons nos regimes 10 e 11, representando grande parcela do total consumido de DQO (Figura 5.8). O estudo realizado por Akunna *et al.* (1993) mostrou que o lodo anaeróbio estrito, que era inicialmente desprovido de oxigênio e nitrato, poderia ter uma alta capacidade de desnitrificação. Neste estudo, até 80% do nitrato adicionado ao lodo anaeróbio foi desnitrificado, concluindo que muitas bactérias anaeróbias facultativas e obrigatórias encontradas em ambientes anaeróbios também são capazes de desnitrificar. Rustrian *et al.* (1997) também realizou um estudo sobre a ocorrência de desnitrificação em lodos anaeróbios estritos e concluiu que a relação DQO/N influenciou diretamente na ocorrência de desnitrificação e/ou metanogênese no sistema. Quanto maior a razão DQO/N, mais significativa foi a metanogênese. Em contrapartida, quanto menor a razão DQO/N, maior foi a predominância da reação de desnitrificação.

O coeficiente de síntese celular (Y) do sistema desnitrificante apresentou valores na faixa de 0,17 a 0,40 gSSV/gDQO, dependendo do regime operacional (Figura 5.8). É interessante ressaltar que os maiores valores de Y foram observados nos regimes com menor relação DQO/N afluyente (4 a 8). Os menores valores para esse coeficiente nos demais regimes com razões DQO/N superiores provavelmente estão associados à ocorrência de um metabolismo anaeróbio, que levou à menor geração de células por substrato removido. Segundo Metcalf & Eddy (2016), o valor típico para o coeficiente de síntese celular para bactérias oriundas de reatores de lodo ativado tratando esgoto doméstico em condições anóxicas situa-se em torno de 0,30 gSSV/gDQO, valor

compatível com o encontrado nesse trabalho. Outros trabalhos também avaliaram o coeficiente de rendimento celular em sistemas anóxicos, como por exemplo, o conduzido por Muller *et al.* (2003), no qual foi reportado um coeficiente de rendimento celular de 0,4. Corroborando com os resultados da literatura e os encontrados nesse trabalho, Sperandio *et al.* (1999) também avaliou o rendimento celular da biomassa desnitrificante em condições anóxicas utilizando como fonte de carbono o acetato e a glucose obteve valores na faixa de 0,44 a 0,55 gSSV/gDQO.

5.4.2 Efeito da carga orgânica na dinâmica dos sólidos suspensos e aderidos

A carga orgânica aplicada influenciou diretamente o crescimento da biomassa, tanto aderida quanto em suspensão. As concentrações de sólidos aderidos (SAV) e suspensos voláteis (SSV) aumentaram gradualmente, até certo limite, conforme a carga orgânica afluyente foi aumentada. A maior concentração de sólidos voláteis totais (SVT=SAV+SSV), isto é, de 3 g/L, foi observada quando da aplicação da maior carga orgânica, de 20 kgDQO/(m³.d). Observou-se que no sistema MBBR em estudo, o aumento da carga orgânica até 5 kgDQO/(m³.d) ocasionou aumento substancial na concentração de sólidos. No entanto, para cargas orgânicas maiores, esse aumento é menos pronunciado (Figura 5.16a). Para cargas volumétricas entre 5 e 20 kgDQO/(m³.d), a concentração de SVT permaneceu entre 2 e 3 g/L.

Além disso, os dados revelaram que, embora o percentual dos sólidos em suspensão em relação ao total de sólidos (SSV/SVT) tenha aumentado consideravelmente quando a carga orgânica aumentou até 5 kgDQO/(m³.d), a relação SSV/SVT atingiu um valor que se manteve entre 30 e 35% quando a carga foi aumentada de 5 a 20 kgDQO/(m³.d) (Figura 5.16b). Depreende-se que, em reatores

anóxicos, partir de uma determinada carga orgânica volumétrica aplicada em sistemas MBBR, a concentração de sólidos na fase suspensa aumenta na mesma proporção que a concentração de sólidos imobilizados na forma de biofilme, mantendo a relação SSV/SVT constante.

Na pesquisa realizada por Bassin *et al.* (2016), em MBBR similar ao utilizado nesta pesquisa, foi constatado que no regime de maior carga orgânica volumétrica, a concentração de SSV no meio atingiu um percentual constante de 28% da biomassa ativa total no reator, valor próximo ao encontrado nesse trabalho. Porém, as condições de carga orgânica e TRH eram bastante diferentes. Provavelmente a contribuição dos sólidos suspensos em relação ao total é influenciada diretamente pelas condições hidráulicas impostas ao reator (por exemplo, do TRH) e pela carga orgânica aplicada.

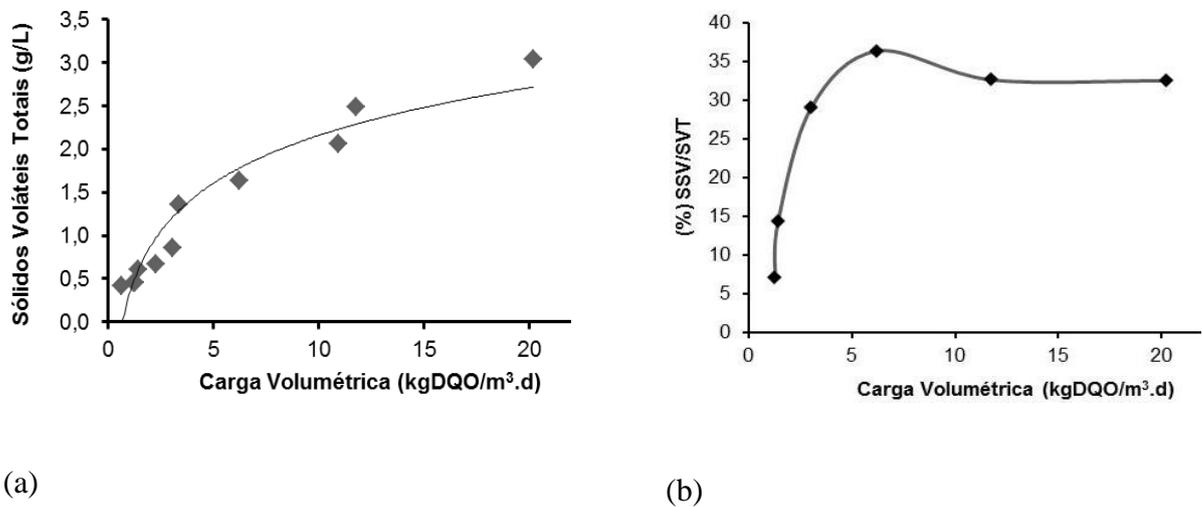


Figura 5.16.: (a) Relação da concentração de sólidos voláteis totais (SVT) e (b) a fração dos sólidos suspensos totais (SSV) em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao sistema desnitrificante.

5.4.3 Efeito da carga nitrogenada aplicada na desnitrificação e na taxa desnitrificante

O sistema MBBR foi submetido a uma máxima concentração de nitrato equivalente a 650 mg/L (regimes 3 e 4), o que correspondeu a uma carga nitrogenada de 2,6 kgNO₃-N/(m³.d). Quando havia quantidade suficiente de matéria orgânica para que a desnitrificação fosse completa (tal como no regime 3, DQO/N = 7), não foi detectado nitrato e nitrito no efluente. Isso demonstra a capacidade do reator com biomassa imobilizada em tolerar cargas elevadas de nitrato. Cabe destacar que o aumento da concentração de nitrato ao longo dos três primeiros regimes foi gradativo, o que pode ter permitido a adaptação da biomassa desnitrificante capaz de suportar tais condições (DHAMOLE *et al.*, 2008). Além disso, essa estratégia operacional contribuiu para que a eficiência de remoção de nitrato se mantivesse praticamente invariável de um regime para o outro, mantendo um bom desempenho mesmo com aumentos da carga nitrogenada do regime 1 ao 3.

As altas eficiências de redução de nitrato, especialmente nos regimes operacionais com relação DQO/N igual ou superior a 6, também podem estar relacionadas com a fonte de carbono orgânico utilizada. Estudos apontam que a diversidade de micro-organismos desnitrificantes em um sistema operado com acetato é consideravelmente maior que em um sistema operado com outras fontes de carbono orgânico, como por exemplo, metanol (LU *et al.*, 2014).

Shen *et al.* (2009) operaram um biorreator a membranas para tratamento de efluentes altamente carregados de nitrato proveniente de uma fábrica de explosivos. Sob condições de C/N 1,56, pH 7,5-8,5 e TRH de 30 h, os autores obtiveram eficiência de remoção de nitrato maiores que 99,9%, sem acúmulo de nitrito. Além disso, altas taxas de desnitrificação foram atingidas.

Os resultados também mostraram que, em geral, a taxa específica desnitrificante cresceu à medida que a carga de nitrato aplicada ao sistema aumentou (Figura 5.9). Isso implica no desenvolvimento de um consórcio microbiano mais específico, capaz de metabolizar toda a carga orgânica e nitrogenada recebida pela sistema. Por outro lado, a redução da carga de nitrato afluente repercutiu na redução da taxa específica desnitrificante, que atingiu seu menor valor no regime 8.

A Tabela 5.7 apresenta uma síntese de alguns trabalhos na literatura, que correlacionam a taxa específica desnitrificante com diversos fatores, como por exemplo, a concentração inicial de nitrato, a relação DQO/N, a fonte de carbono utilizada, além do tipo de reator empregado. Conforme pode ser observado, esses fatores influenciaram diretamente a taxa específica desnitrificante, sendo difícil prever valores com base nos trabalhos da literatura.

Tabela 5.7.: Taxa específica desnitrificante e sua relação com a concentração inicial de nitrato, carga de nitrato, relação DQO/N, fonte de carbono utilizada e tipo de reator empregado.

Entrada NO ₃ -N (mg/L)	DQO/N ^a ou C/N ^b	Carga de Nitrato (kgNO ₃ -N/m ³ .d)	Fonte de Carbono Orgânico	Reator	Taxa específica desnitrificante (mgNO ₃ -N/gSSV. h)	Referências
700	3,4 ^b	2,8 ^d	Metanol	SBR	30,4	Fernandez-Nava <i>et al.</i> (2008)
200	3,5 ^c	0,8 ^d	Metanol	Lodo Ativado	21	Foglar <i>et al.</i> (2005)
500	6,5 ^a	1,0 ^d	Indústria de alimentos	SBR	41,6	Fernandez-Nava <i>et al.</i> (2010)
3388	2 ^b	7,4 ^d	Indústria de Fertilizantes	SBR	91	Dhamole <i>et al.</i> (2007)
3600	1,56 ^b	2,88 ^d	Indústria de explosivos	MBR-membrana	324	Shen <i>et al.</i> (2009)
2700	1,5 ^b	5,9 ^d	Acetato	SBR	54	Glass & Silverstein (1998)
650	7,7 ^a	2,62	Acetato	MBBR	60,0	Este Estudo (Regime 3)
300	5 ^a	1,23	Acetato	MBBR	42,6	Este Estudo (Regime 5)
50	6 ^a	0,20	Acetato	MBBR	27,2	Este Estudo (Regime 9)

^a Relação DQO/N

^b Relação Carbono/Nitrogênio (C/N)

^c Relação Metanol/Nitrogênio (MeOH/NO₃-N)

^d Carga nitrogenada calculada a partir de dados fornecidos pelos autores dos respectivos trabalhos.

É interessante notar que nos regimes operacionais com carga nitrogenada semelhante (regimes 3 e 4), a taxa específica desnitrificante foi mais pronunciada na condição com maior concentração de sólidos suspensos voláteis. A taxa específica desses regimes foi de 60 kgNO₃-N/(gSSV.h) e 56,7 kgNO₃-N/(gSSV.h), enquanto a concentração de sólidos suspensos foi de 1,0 e 0,80 gSSV/L, respectivamente. Além disso, quando se compara os resultados obtidos nos regimes 2 e 5, observa-se que, apesar do primeiro apresentar maior carga nitrogenada, o segundo apresentou maior

taxa específica de desnitrificação. Vale lembrar que o primeiro apresentava maior concentração de sólidos aderidos e o segundo de sólidos suspensos. A partir desses resultados pode-se inferir que a taxa específica do lodo suspenso é maior que a taxa do lodo imobilizada, embora dados mais conclusivos sejam discutidos a seguir.

5.4.4 Taxa desnitrificante das frações de biomassa suspensa e aderida e sua importância para a desnitrificação

Em virtude da quantidade expressiva de sólidos suspensos, sobretudo nos regimes nos quais a carga orgânica aplicada foi maior, alguns testes em batelada foram realizados para avaliar separadamente a atividade dos micro-organismos suspensos e dos aderidos de modo a estimar a contribuição de cada uma dessas frações para a desnitrificação global do sistema. O papel desempenhado pelas bactérias suspensas na remoção de nitrato foi bastante significativo, sobretudo nos regimes com maior carga orgânica, e, por conseguinte, com maior teor de sólidos em suspensão. Além disso, observou-se que atividade da biomassa suspensa foi superior à da biomassa aderida na grande maioria dos regimes operacionais, fazendo com que sua contribuição para a desnitrificação global do sistema tenha sido bastante notável mesmo sendo o teor de sólidos em suspensão inferior ao dos sólidos aderidos.

Esse prognóstico pode ser confirmado pelos resultados dos testes em batelada, que mostraram que a biomassa suspensa representa 53%, 69%, 40% e 33% da desnitrificação total nos regimes operacionais 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Tal resultado está ligado ao fato de que a fração suspensa dos sólidos não é tão influenciada pela limitação à transferência de massa como é a fração imobilizada.

Portanto, possuem maior acessibilidade ao substrato presente no meio. Lima *et al.* (2016) operaram um sistema MBBR submetido a altas cargas orgânicas e constataram que a atividade da biomassa em suspensão chegou a contribuir para 75% da nitrificação global do sistema. Do mesmo modo, Bassin *et al.* (2016) reportaram que 85% da remoção de amônio foi atribuída aos sólidos suspensos voláteis em um sistema MBBR com alta carga orgânica. Tais resultados demonstram que a participação dos sólidos suspensos em sistemas MBBR não pode ser negligenciada, sobretudo em condições de alta carga orgânica. Portanto, em sistemas com biofilme voltados à desnitrificação, não somente a relação DQO/N, mas também a carga orgânica aplicada deve ser considerada para prever o comportamento e a eficiência do reator devido à sua relação direta com distribuição e magnitude das frações de biomassa suspensa e aderida e, portanto, com a atividade desnitrificante do reator e as remoções de matéria orgânica e compostos nitrogenados associadas.

5.4.5 Efeito da desnitrificação no pH

O processo de desnitrificação é capaz de levar ao aumento de pH do meio, devido ao consumo de acidez durante a reação de redução do nitrato a nitrogênio gasoso (WANG *et al.*, 1995; HENZE *et al.*, 1997; GLASS & SILVERSTEIN, 1998; METCALF & EDDY, 2016). A geração de alcalinidade e o aumento de pH para valores acima de 8,5, foi, de fato, observado nessa pesquisa.

Alguns trabalhos da literatura relatam valores de pH situados entre 7 a 8,5 como sendo ideais para desnitrificação (HENZE *et al.*, 1997; SHEN *et al.*, 2009). Durante a maior parte dos regimes de operação, o pH se manteve dentro dessa faixa, embora

valores acima de 9,5 foram eventualmente observados no regime 3, no qual o reator foi submetido a maior carga nitrogenada. No entanto, isso não influenciou negativamente a desnitrificação, uma vez que remoção completa de nitrato foi observada nesse regime, que contava com quantidade suficiente de doador de elétrons para desnitrificação completa. Alguns trabalhos relataram a ocorrência de acúmulo de nitrito em pH superior a 9 (GLASS & SILVERSTEIN, 1998; SHEN *et al.*, 2009). No entanto, na maioria dos estudos foi observado que pH elevado não exerceu efeito adverso ao processo desnitrificante (GABALDÓN *et al.*, 2007; OH *et al.*, 2001). Além disso, o efeito protetor do biofilme pode ter contribuído para que o pH elevado não afetasse as bactérias desnitrificantes.

As bactérias desnitrificantes parecem ser mais sensíveis a variações de temperatura do que de pH. Saleh-Lakha *et al.* (2009) estudaram os efeitos do pH e da temperatura na expressão dos genes envolvidos na desnitrificação por meio de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) em *Pseudomonas mandelii*. Esses autores concluíram que os níveis de expressão da enzima nitrito redutase e óxido nítrico redutase foram semelhantes com pH variando de 6 a 8. No entanto, as células cultivadas a 30°C exibiram níveis de expressão dessas enzimas significativamente maiores do que aquelas cultivadas a 10 ou 20°C. No presente trabalho, a variação da temperatura foi bastante pequena (27 ± 3), de modo que o efeito da temperatura na atividade desnitrificante nos diferentes regimes pode ser desprezado.

5.5 Conclusões parciais

O desempenho do reator de desnitrificação foi quase que proporcional a relação DQO/N aplicada ao sistema. Nos regimes operacionais com relação DQO/N superior a 5 (1 – 3, 9 – 11), praticamente todo o nitrato foi consumido (remoção acima de 97%). Em contrapartida, os regimes 4 a 8, os quais a relação DQO/N foi mantida próxima a 5, houve uma sobra significativa de nitrato, atingindo remoção média de nitrato de 65%. Observou-se ainda desnitrificação incompleta nos regimes operacionais 4 e 5 (DQO/N = 5), refletindo no acúmulo substancial de nitrito. Consoante ao acúmulo de nitrito, o regime operacional 4 apresentou concentração de ácido nitroso relativamente elevada, possivelmente causando inibição nesse regime operacional. A relação DQO/N ótima encontrada nesse trabalho foi de 5,75 kgDQO consumida/kgNO₃-N removido.

Nos regimes operacionais com alta relação DQO/N (acima de 20), foi observada remoção de DQO consideravelmente maior do que a esperada em função da desnitrificação, sugerindo a existência de outras vias metabólicas de remoção de matéria orgânica. O percentual de remoção de DQO por vias alternativas correspondeu a 46% do total removido no regime 10 e 65% no regime 11.

As taxas específicas de desnitrificação foram proporcionais à carga nitrogenada aplicada. Além disso, foi observado que o aumento da carga orgânica e consequente incremento dos sólidos suspensos ocasionaram o aumento da participação dos sólidos em suspensão (SSV) na conversão de nitrato/nitrito no MBBR. Os sólidos suspensos voláteis foram responsáveis pela remoção de até 69% do nitrato no regime 3.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram estudados alguns aspectos relacionados com os processos integrantes da remoção biológica de nitrogênio, particularmente a nitrificação e a desnitrificação.

O primeiro estudo realizado avaliou o comportamento do processo de nitrificação quando submetido a longos períodos com disponibilidade limitada de substrato (amônio) e oxigênio. Sendo assim, buscou-se conhecer como as bactérias nitrificantes immobilizadas no biofilme de sistemas MBBR respondiam a essas condições de processo, factíveis de ocorrer nas plantas de tratamento de efluentes domésticos e industriais. Para tanto, foram avaliados 6 testes operacionais, nos quais diversas variáveis foram analisadas: tempo de limitação de amônio ou oxigênio (contínua ou intermitente), e efeito da presença ou ausência de matéria orgânica (esse último ligado com a influência das bactérias heterotróficas).

O desenvolvimento do trabalho iniciou-se pela avaliação da remoção de nitrogênio amoniacal durante os sucessivos testes de limitação de amônio no consórcio microbiano adaptado à presença de DQO externa (testes 1, 2 e 3). Nesse primeiro estágio, concluiu-se que o desempenho da nitrificação, em termos de eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, melhorou gradualmente durante os consecutivos períodos de adição intermitente de amônio. Consequentemente, o tempo requerido para o reestabelecimento total da eficiência de remoção de amônio (referido como tempo de recuperação) foi diminuindo gradualmente, variando de 15 dias no primeiro teste, para apenas 2 dias no terceiro teste.

Após a adaptação da biomassa aos seguidos testes de limitação de amônio com matéria orgânica, avaliou-se como a biomassa nitrificante se comportaria em um sistema puramente autotrófico (sem DQO externa) e com limitação de amônio (Teste 4). Nessa fase, concluiu-se que a retirada da matéria orgânica afluyente fez com que o crescimento heterotrófico fosse diminuído, resultando no decréscimo abrupto da biomassa imobilizada nos suportes. Além disso, uma biomassa mais especializada foi observada no reator, apresentando uma menor queda na eficiência de remoção de amônio após o teste 4 quando comparado com o teste 3.

Na comparação entre os testes contínuos e intermitentes de limitação de amônio, ficou constatado que a mínima taxa específica nitrificante permaneceu próxima a $2,3 \text{ mgNH}_4^+-\text{N}/(\text{gSAV}\cdot\text{h})$, no teste de limitação contínua, e a $4,8 \text{ mgNH}_4^+-\text{N}/(\text{gSAV}\cdot\text{h})$, nos testes de limitação intermitente. Depreende-se, portanto, que o valor mínimo de atividade nitrificante do teste contínuo é metade do valor mínimo observado no teste intermitente. Além disso, os valores médios da coeficiente de decaimento para os testes 3 e 4 após os 25 dias de teste foram de $0,11 \text{ d}^{-1}$ e $0,08 \text{ d}^{-1}$.

A outra etapa do estudo avaliou a retomada de desempenho do sistema nitrificante submetido à ausência de oxigênio e matéria orgânica (teste 5), constatando rápida recuperação da eficiência de remoção de amônio após o teste. Em termos de taxa específica nitrificante, a diminuição desse parâmetro foi mais pronunciada, decaindo em apenas 8 dias de teste. O teste de limitação intermitente de oxigênio em meio autotrófico agiu de forma positiva na manutenção da taxa específica nitrificante, cujo valor médio ficou em $16 \text{ mgNH}_4^+-\text{N}/(\text{gSAV}\cdot\text{h})$ (teste 5). O mesmo comportamento foi observado no experimento sem oxigênio e com matéria orgânica (teste 6). Nesse teste, a queda de atividade nitrificante ocorreu até os primeiros 15 dias de teste com limitação

continua. No teste com disponibilidade intermitente de oxigênio, observou-se que a atividade nitrificante foi diminuindo ao longo dos consecutivos períodos de fornecimento de oxigênio, até alcançar o valor mínimo de $8,1 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{gSAV.h})$.

Em suma, os resultados dos testes com limitação de amônio e oxigênio revelaram que uma possível estratégia de adicionar amônio ou oxigênio de forma intermitente para manutenção dos níveis de nitrificação pode ser dispensada a fim de evitar gastos extras de substrato externo e oxigenação artificial. De fato, após os sucessivos testes de limitação de ambos, as bactérias presentes no biofilme adaptaram-se as variações na concentração de amônio/oxigênio a que foram submetidas.

Em relação ao estudo acerca da segunda etapa da remoção biológica convencional de nitrogênio, isto é, a desnitrificação, procurou-se avaliar como um sistema desnitrificante com biomassa imobilizada responde a altas cargas de nitrato e variadas relações DQO/N. Para tal fim, foram investigados 11 regimes operacionais ao longo de 700 dias. Nos primeiros regimes operacionais (1 a 3), nos quais o objetivo foi investigar o desempenho do sistema desnitrificante frente ao aumento gradual da carga nitrogenada, com relação DQO/N constante mantida próxima a 7, concluiu-se que a DQO adicionada foi mais que suficiente para promover altas eficiências de remoção de nitrato. Além disso, com aumento da carga nitrogenada de 0,46 para $2,62 \text{ KgNO}_3\text{-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ nos regimes de 1 a 3, houve um incremento quase que proporcionalmente na máxima taxa específica desnitrificante, passando de aproximadamente 13 para $60 \text{ mgNO}_3\text{-N}/(\text{gSTV.h})$. Simultaneamente, a participação da biomassa em suspensão também aumentou, ampliando-se de 53 para 69% no regime 3. Além disso, conclui-se que em condições de matéria orgânica suficiente, não foi detectado nitrato e nitrito no efluente, comprovando a capacidade do reator MBBR de suportar altas cargas de

nitrato. Ademais, a concentração de sólidos na fase suspensa aumentou na mesma intensidade que os sólidos aderidos, conservando a relação SSV/SVT constante a partir de determinada carga orgânica volumétrica aplicada em sistemas MBBR.

Nos cinco regimes operacionais subsequentes (4 a 8), a concentração de nitrato e a DQO afluente foram reduzidas gradualmente, mantendo-se a relação DQO/N constante e próxima a 5. Constatou-se que houve uma sobra significativa de nitrato, obtendo-se remoções de aproximadamente 65%. Em particular, no regime operacional 4 houve acúmulo de nitrito, cuja concentração chegou a 180 mgNO₂-N/L no meio reacional. Essa concentração foi suficiente para promover a inibição do meio, atribuído provavelmente à concentração de ácido nitroso (0,013 mgHNO₂-N/L em pH 7,5). Além disso, observou-se uma tendência de variação quase que proporcional na taxa específica desnitrificante à medida que a carga nitrogenada era alterada. Como resultado, constatou-se o desenvolvimento de um consórcio microbiano mais específico no processo de desnitrificação.

Em função dos resultados obtidos, a razão DQO/N foi aumentada para 6 na condição experimental 9, de modo a garantir remoção completa de nitrato. De fato, nessa condição experimental houve altas eficiências de remoção de nitrato sem que ocorresse acúmulo de nitrito. A partir dos dados experimentais, foi possível construir uma curva de carga nitrogenada removida pela carga de DQO removida, obtendo a relação DQO/N ótima 5,75 kgDQO consumida/kgNO₃-N removido, para o sistema MBBR desnitrificante em questão, utilizando acetato como fonte de carbono orgânico.

Ao final, o comportamento do sistema desnitrificante quando submetido a condições de carga orgânica em excesso (DQO/N acima de 20) foi avaliado nas condições experimentais 10 e 11. Nesse caso, foi constatado que a remoção de DQO foi

atribuída não somente à desnitrificação, mas também por vias metabólicas alternativas possivelmente anaeróbias, que contribuíram para que 46% de toda DQO removida do regime operacional 10 e 65% do regime operacional 11.

Por fim, constatou-se que os valores de taxa específica desnitrificante da biomassa em suspensão foram maiores que o da biomassa aderida na grande maioria dos regimes operacionais, apresentando grande relevância ao sistema de tratamento. Consequentemente, houve significativa contribuição dos micro-organismos suspensos para a desnitrificação global do sistema, mesmo apresentando teor de sólidos em suspensão inferior ao dos sólidos aderidos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando o melhor entendimento e prosseguimento deste trabalho, sugere-se realizar os seguintes estudos:

- Avaliar simultaneamente longos períodos de limitação de amônio e ausência de oxigênio;
- Avaliar períodos maiores que 25 dias de limitação de amônio e ausência de oxigênio;
- Identificar os micro-organismos autotróficos presentes no biofilme dos sistemas MBBR, por meio de técnicas moleculares, de modo a avaliar aqueles mais resistentes e, portanto, que melhor se adaptaram às condições de limitação de amônio ou oxigênio;
- Determinar estratégias para a seleção de bactérias de melhor adaptação às variações de substrato (amônio) e oxigênio, de modo a criar um sistema nitrificante resistente para uso em plantas de tratamento suscetíveis à variação desses componentes;
- Testar diferentes perturbações no sistema MBBR desnitrificante, como por exemplo, salinidade, pH, carga nitrogenada, entre outros parâmetros;
- Identificar as bactérias desnitrificantes dominantes e relacionar o consumo de matéria orgânica por vias alternativas a organismos específicos do biofilme;
- Medir as emissões de N_2O em diferentes condições experimentais.

8. REFERÊNCIAS

- ABELING, U., SEYFRIED, C., 1992, "Anaerobic ± aerobic treatment of high – strength ammonium wastewater-nitrogen removal via nitrite", *Water Science Technology*, 26 (56), p. 1007-1015.
- AHN, Y.H., 2006, "Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review", *Process Biochemistry*, 41, p. 1709-1721.
- AKUNNA, J.C., BIZEAU, C., MOLETTA, R., 1992, "Denitrification in anaerobic digesters: Possibilities and influence of wastewater COD/N-NOX ratio", *Environmental Technology*, 13 (9), p. 825-836.
- AKUNNA, J.C., BIZEAU, C., MOLETTA, R., 1994, "Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations - ammonification, denitrification and methanogenic activities", *Environmental Technology*, 15 (1), p. 41-49.
- ALMADA, R. B., 2012, "Avaliação de reatores de leito móvel com biofilme (MBBR) em série para tratamento de diferentes efluentes de refinaria de petróleo visando ao reúso industrial", Tese de Doutorado, PEQ/UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro.
- ALMEIDA, J.S., JU'LIO, S.M., REIS, M.A.M., CARRONDO, M.J.T., 1995, "Nitrite inhibition of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*", *Biotechnology and Bioengineering*, 46 (3), p.194-201.
- ANTHONISEN A.C., LOEHR R.C., PRAKASAM T.B.S., SRINATH E.G., 1976, "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid", *Journal Water Pollution Control Federation*, 48 (5), p. 835-852.
- APHA – American Public Health Association, 2005, Standard methods for examination of water and wastewater, 21ª ed., Washington D.C., USA.
- BASSIN, J.P., 2012, "Remoção Biológica de Nutrientes em Sistemas Compactos e Estudo da Diversidade Microbiana por Técnicas de Biologia Molecular", Tese de Doutorado, PEQ/UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro.
- BASSIN, J.P., DEZOTTI, M., 2011, "Reator de leito móvel com biofilme Moving bed biofilm reactor - MBBR". In: DEZOTTI, M., SANT'ANNA JR, G.L., BASSIN, J.P. (Org.) Processos biológicos avançados para tratamento de efluente e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana. Rio de Janeiro: Editora Interciência.
- BASSIN, J.P., DEZOTTI, M., SANT'ANNA JR, G.L., 2011, "Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor", *Journal Hazardous Materials*, 185 (1), p. 242-248.
- BASSIN, J.P., DIAS, I.N., CAO, S.M.S., SENRA, E., LARANJEIRA, Y., DEZOTTI, M., 2016, "Effect of increasing organic loading rates on the performance of moving-bed biofilm reactors filled with different support media: Assessing the activity of suspended and attached biomass fractions", *Process Safety and Environmental Protection*, 100, p. 131-141.
- BERNET, N.; DELGENES, N.; MOLETTA, R., 1996, "Denitrification by anaerobic sludge in piggery wastewater", *Environmental Technology*, 17 (3), p.293-300.
- BEYENAL, H.; LEWANDOWSKI, Z., 2002, "Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities", *Biotechnology progress*, 18 (1), p. 55-61.

BIRADAR PM, DHAMOLE PB, NAIR RR, ROY SB, SATPATI SK, D'SOUZA SF, LELE SS, PANDIT AB, 2008, "Long-term stability of biological denitrification process for high strength nitrate removal from wastewater of uranium industry", *Environmental Progress*, 27 (3), p. 365-372.

BOLLMANN A., SCHMIDT I., SAUNDERS A.M., NICOLAISEN M.H., 2005, "Influence of starvation on potential ammonia-oxidizing activity and amoA mRNA levels of *Nitrosospira briensis*", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), p. 1276-1282.

BOLLMANN, A., LAANBROEK, H.J., 2001, "Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations", *FEMS Microbiology Ecology*, 37 (3), p. 211-221.

CABEZAS A., DRAPER P., ETCHEBEHERE C., 2009, "Fluctuation of microbial activities after influent load variations in a full-scale SBR: recovery of the biomass after starvation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (6), p. 1191-1202.

CAO, S. M. S., FONTOURA, G.A.T., DEZOTTI, M., BASSIN, J. P., 2016, "Combined organic matter and nitrogen removal from a chemical industry wastewater in a two-stage MBBR system", *Environmental Technology*, 37 (1), p. 96-107.

CAPONE D.G., POPA R., FLOOD B., NEALSON K.H., 2006, "Follow the Nitrogen", *Science*, 312 (5774), p. 708-709.

CASTRO, F.D., BASSIN, J. P., DEZOTTI, M., 2017, "Treatment of a simulated textile wastewater containing the Reactive Orange 16 azo dye by a combination of ozonation and moving-bed biofilm reactor: evaluating the performance, toxicity, and oxidation by-products", *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (7), p. 6307-6316.

CHEN S., LING J., BLANCHETON J.PAUL., 2006, "Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors", *Aquacultural Engineering*, 34 (3), p.179-197.

CHEN, S., JUAW, C., CHENG, S., 1991, "Nitrification and denitrification of high-strength ammonium and nitrite wastewater with biofilm reactors", *Water Science Technology*, 23 (7-9), p. 1417-1425.

CHRISTENSSON, M., LIE, E., WELANDER, T., 1994, "A comparison between ethanol and methanol as carbon sources for denitrification", *Water Science Technology*, 30 (6), p. 83-90.

CONSTANTIN H., FICK M., 1997, "Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater", *Water Research*, 31 (3), p.538-589.

CORTEZ S., TEIXEIRA P., OLIVEIRA R., MOTA M., 2008, "Rotating biological contactors: a review on main factors affecting performance", *Environmental Science Biotechnology*, 7 (2), p. 155-172.

DHAMOLE PB, NAIR RR, D'SOUZA SF, LELE SS, 2008, "Denitrification of highly alkaline nitrate waste Using Adapted Sludge", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151 (2-3), p.433-440.

DHAMOLE, P.B., NAIR, R.R., SOUZA, S.F.D., LELE,S.S., 2007, "Denitrification of high strength nitrate waste", *Bioresource Technology*, 98 (2), p. 247-252.

DIAB S., KOCHBA M., MIRES D., AVNIMELECH Y., 1992, "Combined intensive-extensive (CIE) pond system A: inorganic nitrogen transformations", *Aquaculture*, 101 (1-2), p. 33-39.

DUNNE W.M., 2002, "Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?" *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), p. 155-166.

- DUTTA S., HOFFMANN E., HAHN H.H., 2007, "Study of rotating biological contactor performance in wastewater treatment using multi-culture biofilm model", *Water Science Technology*, 55 (8-9), p. 345-353.
- ELAWWAD A., SANDNER H., KAPPELMEYER U., KOESER H., 2013, "Long-term starvation and subsequent recovery of nitrifiers in aerated submerged fixed-bed biofilm reactors", *Environmental Technology*, 34 (8), p. 945-959.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U.S.), 2007, "Nitrates and Nitrites", <http://www.epa.gov/teach/chem_summ/Nitrates_summary.pdf>.
- FDZ-POLANCO, F., VILLAVERDE, S., GARCÍA, P.A., 1994, "Temperature effect on nitrifying bacteria activity in biofilters: activation and free ammonia inhibition", *Water Science and Technology*, 30 (11), 121–130.
- FERNÁNDEZ-NAVA, Y., MARAÑÓN, E., SOONS, J., CASTRILLÓN, L., 2008, "Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations", *Bioresource Technology*, 99 (17), p. 7976-7981.
- FERNÁNDEZ-NAVA, Y., MARAÑÓN, E., SOONS, J., CASTRILLÓN, L., 2010, "Denitrification of high nitrate concentration wastewater using alternative carbon sources", *Journal of Hazardous Materials*, 173 (1-3), p. 682-688.
- FEWTRELL L., 2004, "Drinking-Water Nitrate, Methemoglobinemia, and Global Burden of Disease: A Discussion", *Environmental Health Perspectives*. 112(14), p. 1371-1374.
- FILIPPIS P.D., PALMA, L.D., SCARSELLA M., VERDONE N., 2013, "Biological Denitrification of High-Nitrate Wastewaters: a Comparison Between Three Electron Donors", *Chemical Engineering Transactions*, 32, 319-324.
- FLEMMING H.-C., WINGENDER J., KJELLEBERG S., STEINBERG P.D., RICE S.A. AND SZEWZYK U., 2016, "Biofilms: an emergent form of bacterial life", *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), p.563-75.
- FOGLAR, L., BRISKI, F., SIPOS, L., VUKOVIC, M., 2005, "High nitrate removal from synthetic wastewater with the mixed bacterial culture", *Bioresource Technology*, 96 (8), p.879–888.
- FONSECA, D.L., 2016, "Desempenho de sistemas MBBR em diferentes condições de recheio e vazão: estudo em escala piloto e laboratorial", Dissertação de Mestrado, PEQ/UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro.
- FORREZ I., CARBALLA M., BOON N., VERSTRAETE W., 2009, "Biological removal of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in an aerated nitrifying fixed bed reactor during ammonium starvation", *Journal of Chemical Technology Biotechnology*; 84 (1): p. 119-125.
- FORSTER C., 2003, "Wastewater treatment and technology", London: Thomas Telford.
- FRANCIS CA, BEMAN JM, KUYPERS MM., 2007, "New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation", *ISME Journal*, 1(1), p.19-27.
- FURUMAI, H., RITTMANN, B.E., 1994, "Interpretation of bacterial activities in nitrification filters by a biofilm model considering the kinetics of soluble microbial products", *Water Science and Technology*, 30 (11), p. 147-156.

- GABALDON, C.; IZQUIERDO, M.; MARTINEZ-SORIA, V.; MARZAL, P.; PENYA-ROJA, J.M.; ALVAREZ-HORNOS, J., 2007, "Biological nitrate removal from wastewater of a metal-finishing industry", *Journal of Hazardous Materials*, 148 (1-2), p. 485-490.
- GABARRÓ J., GANIGUÉ R., GICH F., RUSCALLEDA M., BALAGUER M.D., COLPRIM J., 2012, "Effect of temperature on AOB activity of a partial nitrification SBR treating landfill leachate with extremely high nitrogen concentration", *Bioresource Technology*, 126, p.283-289
- GE S, PENG Y, WANG S, LU C, CAO X, ZHU Y., 2012, "Nitrite accumulation under constant temperature in anoxic denitrification process: The effects of carbon sources and COD/NO₃-N", *Bioresource Technology*. 114, p. 137-143
- GEETS J., BOON N., VERSTRAETE W., 2006, "Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations", *Fems Microbiology Ecology*, 58 (1), pp. 1-13.
- GLASS C., SILVERSTEIN J., 1999, "Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater", *Water Resource*, 33 (1), 223– 229.
- GLASS C., SILVERSTEIN J., OH J., 1997, "Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite", *Water Environmental Research*, 69 (6), p. 1086-1093.
- GLASS, C., SILVERSTEIN, J., 1998, "Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation", *Water Research*, 32 (3), p. 831-839.
- GODINI H., REZAEI A., JAFARI A., MIRHOUSAINI S.H., 2010, "Denitrification of Wastewater Containing High Nitrate Using a Bioreactor System Packed by Microbial Cellulose", *Engineering and Technology*. 4 (2), p. 239-243.
- GONG, L. JUN, L., YANG, Q., WANG, S., MA, B., PENG, Y., 2012, "Biomass characteristics and simultaneous nitrification–denitrification under long sludge retention time in an integrated reactor treating rural domestic sewage", *Bioresource Technology*, 119, p. 277-284.
- GRADY, C. P. L.; DAIGGER, G. T.; LIM, H. C., 1999, "Biological wastewater treatment", Second Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker.
- HANAKI K., WANATWIN C., OHGAKI S., 1990, "Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor", *Water Research*, 24 (3), 289-296.
- HARRISON J.A., 2003, "The nitrogen cycle of microbes and men". In: Vision Learning, http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=98
- HENZE, M., HARREMOES, P., LA COUR JANSEN, J., ARVIN, E., 1997, "Biological and Chemical Wastewater Treatment", Second Edition, Springer, Berlin.
- HU S., YANG F., LIU S., YU L., 2009, "The development of a novel hybrid aerating membrane-anaerobic baffled reactor for the simultaneous nitrogen and organic carbon removal from wastewater", *Water Research*, 43 (2), p. 381-388.
- ITOKAWA, H., HANAKI, K., MATSUO, T., 2001, "Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition", *Water Research*, 35 (3), p. 657-64.
- JETTEN M.S.M., VAN NIFTRIK L., STROUS M., KARTAL B., KELTJENS J.T., OP DEN CAMP H.J.M., 2009, "Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria", *Biochemistry and Molecular Biology*, 44 (2-3), p. 65-84.

- KIM JH, GUO XJ, PARK HS. 2008, "Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation", *Process Biochemistry*, 43 (2), p. 154-160.
- KLUBER H.D., CONRAD. R., 1998, "Effects of nitrate, nitrite, NO, and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil", *FEMS Microbiology Ecology*, 25 (3), p. 301-318.
- LAM P, JENSEN MM, LAVIK G, MCGINNIS DF, MULLER B, SCHUBERT CJ, 2007, "Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea", *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 104 (17), p. 7104-7109.
- LEE Y., OLESZKIEWICZ J.A., 2003, "Effects of predation and ORP conditions on the performance of nitrifiers in activated sludge systems", *Water research*, 37 (17), p. 4202-4210.
- LEYVA-DÍAZ J.C., MUÑO M.M., GONZÁLEZ-LÓPEZ J., POYATOS J.M., 2016, Anaerobic/anoxic/oxic configuration in hybrid moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor for nutrient removal from municipal wastewater. *Ecological Engineering*. 91, p. 449-458.
- LIMA, P. S., DEZOTTI, M., BASSIN, J. P., 2016, "Interpreting the effect of increasing COD loading rates on the performance of a pre-anoxic MBBR system: implications on the attached and suspended biomass dynamics and nitrification-denitrification activity", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (6), p. 945-957.
- LIN, Y., CHEN, K., 1995, "Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system Ying", *Water Research*, 29 (1), p. 35-43.
- LU, H., CHANDRAN, K., STENSEL, D., 2014, "Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment", *Water Research*, 64, (1), p. 237-254.
- MA F., LI A., LI B., CUI Z., SHI C., ZHOU B., 2015, "Prolonged starvation and subsequent recovery of nitrification process in a simulated photovoltaic aeration SBR", *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (14), p.10778-10787.
- MAYER, M., SMEETS, W., BRAUN, R., FUCHS, W., 2009, "Enhanced ammonium removal from liquid anaerobic digestion residuals in an advanced sequencing batch reactor system", *Water Science & Technology*, 60 (7), p. 1649-1660.
- MCADAM E.J., JUDD S.J., 2007. "Denitrification from drinking water using a membrane bioreactor: Chemical and biochemical feasibility", *Water Research*, 41 (18), p. 4242- 4250.
- METCALF & EDDY, 2016, Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. 5. ed. Porto Alegre: AMGH.
- MULLER A., WENTZEL M.C., LOEWENTHAL R.E., EKAMA G.A., 2003, "Heterotroph anoxic yield in anoxic aerobic activated sludge systems treating municipal wastewater", *Water Research*, 37 (10), pp.2435-2441.
- NAIR, R.R., SOUZA, S.F., 2012, "Denitrification of high nitrate wastewater in a cloth strip bioreactor with immobilized sludge", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39 (11), p.1637-1643.
- ØDEGAARD H., GISVOLD B., STRICKLAND J., 2000, "The influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process", *Water Science and Technology*, 41 (4-5), p. 383-391
- ØDEGAARD, H., 2006, "Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process", *Water Science Technology*, 53 (9), pp. 17-33.

- OH J., YOON S.M., PARK J.M., 2001, "Denitrification in submerged biofilters of concentrated nitrate wastewater", *Water Science and Technology*, 43 (1), p. 217–223.
- OHASHI A., SILVA D. G., MOBARRY B., MANEM J. A., STAHL D. A., RITTMANN B. E., 1995, "Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs", *Water Science & Technology*, 32 (8), p. 75-84.
- OSAKA, T., SHIROTANI, K., YOSHIE, S., TSUNEDA, S. 2008, "Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process", *Water Research*, 42 (14), p. 3709-3718.
- PIJUAN, M., WERNER, U., YUAN, Z., 2009, "Effect of long term anaerobic and intermittent anaerobic/aerobic starvation on aerobic granules", *Water Research*, 43 (14), p.3622-3632.
- RASMUSSEN K., LEWANDOWSKI Z., 1998, "Microelectrode measurements of local mass transport rates in heterogeneous biofilms", *Biotechnology and Bioengineering*, 59(3), p.302-309.
- RIBEIRO R.P., DE MELLO W.Z., ALVIM R.B., ANDRADE S.A., BROTTA A.C., KLIGERMAN D.C., OLIVEIRA, J.L.M., ALMEIDA P.A., 2013, "Emissões de óxido nitroso do tanque de aeração de uma estação de tratamento de esgotos com sistema de lodos ativados convencional", *Química Nova*, 36 (7), p. 998-1003.
- RISGAARD-PETERSEN N, LANGEZAAL AM, INGVARSDEN S, SCHMID MC, JETTEN MSM, OP DEN CAMP HJM., 2006, "Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer", *Nature*, 443 (7107) p.93–96.
- RITTMANN B. E., MCCARTY P. L., 1980, "Model of steady-state-biofilm kinetics", *Biotechnology and Bioengineering*, 22 (11), p. 2343-2357.
- RUSTEN B., EIKEBROKK B., ULGENES Y., LYGREN E., 2006, "Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors", *Aquacultural Engineering*, 34 (3), p. 322-331.
- RUSTEN, B., MCCOY, M., PROCTOR, R., SILJUDALEN, J. G., 1998, "The innovative moving bed biofilm reactor/ solids contact reaeration process for secondary treatment of municipal wastewater", *Water Environmental Research*, 70 (5), p. 1083-1089.
- RUSTRIAN, E; DELGENES, JP; BERNET, N; MOLETTA. R. 1997, "Nitrate reduction in acidogenic reactor: Influence of wastewater COD/N-NO₃ ratio on denitrification and acidogenic activity", *Environmental Technology*, 18 (3), p. 309-315.
- SALEH-LAKHA, SALEEMA; SHANNON, KELLY E.; HENDERSON, SHERRI L.; C. GOYER , JT TREVORS , BJ ZEBARTH , DL BURTON., 2009, "Effect of pH and Temperature on Denitrification Gene Expression and Activity in *Pseudomonas mandelii*", *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (12), p. 3903-3911.
- SALEM S., MOUSSA M.S., VAN LOOSDRECHT M.C.M., 2006, "Determination of the decay rate of nitrifying bacteria", *Biotechnology and Bioengineering*, 94 (2), p. 252-262.
- SALVETTI R., AZZELLINO A., CANZIANI R., BONOMO L., 2006, "Effects of temperature on tertiary nitrification in moving-bed biofilm reactors", *Water Research*, 40 (15), p. 2981-2993.
- SATOH, H., OKABE, S., NORIMATSU, N., WATANABE, Y., 2000, "Significance of substrate C/N ratio on structure and activity of nitrifying biofilms determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes", *Water Science and Technology*, 41 (4-5), p. 317-321.

- SCHMIDT I., LOOK C., BOCK E., JETTEN M.S.M., 2004, "Ammonium and hydroxylamine uptake and accumulation in *Nitrosomonas*", *Microbiology*, 150 (5), p. 1405-1412.
- SHARMA B., AHLERT R.C., 1977, "Nitrification and nitrogen removal", *Water Research*, 11 (10), p. 897-925.
- SHEN J., HE R., HAN W., SUN X., LI J., WANG L., 2009, "Biological denitrification of high-nitrate wastewater in a modified anoxic/oxic-membrane bioreactor (A/O-MBR)", *Journal of Hazardous Materials*, 172 (2-3), p. 595-600.
- SIEGRIST H., BRUNNER I., KOCH G., PHAN L.C., LE V.C., 1999, "Reduction of biomass decay rate under anoxic and anaerobic conditions", *Water Science Technology*, 39 (1), p. 129-137.
- SPERANDIO M., URBAIN V., AUDIC J.M., PAUL E., 1999, "Use of carbon dioxide evolution rate for determining heterotrophic yield and characterizing denitrifying biomass", *Water Science Technology*, 39 (1), p. 139-146.
- STEIN, L.Y., KLOTZ, M.G., 2016, "The nitrogen cycle", *Current Biology*. 26(3), p. 94-98.
- STROUS M., KUENEN J.G., JETTEN M.S.M., 1999, "Key physiology of anaerobic ammonium oxidation", *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7), p.3248-3250.
- SUN, F., WU, W., LIU, J., LI, B., CHEN, Y., WU, W., 2012, "Denitrification capacity of a landfilled refuse in response to the variations of COD/NO₃-N in the injected leachate", *Bioresource Technology*. 103 (1), p. 109-115
- SURAMPALLI, R.Y., TYAGI, R.D., SCHEIBLE, O.K., HEIDMAN, J.A., 1997, "Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors", *Bioresource Technology*, 61 (2), p. 151-157.
- TORÀ J.A., LAFUENTEJ, BAEZA J.A., CARRERA J., 2011, "Long-term starvation and subsequent reactivation of a high-rate partial nitrification activated sludge pilot plant", *Bioresource Technology*, 102 (21), p. 9870-9875.
- UPRETY K., BOTT C., BURBAGE C., PARKER K., BALZER B., BILYK K., LATIMER R., 2012, "Glycerol-Driven Denitrification: Evaluating the Specialist-Generalist Theory and Partial Denitrification to Nitrite", *Proceedings of the Water Environment Federation*, 25(51-60), p. 3747-3771.
- VAN HAANDEL A.C., VAN DER LUBBE J.G.M., 2007, "Handbook Biological Waste Water Treatment: Design and Optimisation of Activated Sludge Systems". Quist Publishing, Leidschendam, Netherlands.
- VAN LOOSDRECHT M.C.M., HENZE M., 1999, "Maintenance, endogeneous respiration, lysis, decay and predation", *Water Science Technology*, 39(1), p. 107-117.
- VAN RIJN J., TAL Y., BARAK Y., 1996, "Influence of Volatile Fatty Acids on Nitrite Accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* Strain Isolated from a Denitrifying Fluidized Bed Reactor". *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (7), p. 2615-2620.
- VERSTRAETE W., FOCHT D.D., 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Advances in Microbial Ecology*, 1, p.135-214.
- VON SPERLING M., 1996, Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos, "Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias", 2ª Ed., v. 1.

- VUKOVIC M., BRIŠKI F., MATOŠIĆ M., MIJATOVIĆ I, 2006, “Analysis of the Activated Sludge Process in an MBR under Starvation Conditions”, *Chemical Engineering & Technology*, 29 (3), p. 357-363.
- WANG Q., FENG C., ZHAO Y., HAO C., 2009, “Denitrification of nitrate contaminated groundwater with a fiber-based biofilm reactor”, *Bioresource Technology*, 100 (7), p. 2223–2227.
- WANG, J., BALTZIS, B., LEWANDOWSKI, G., 1995, “Fundamental denitrification kinetic studies with *Pseudomonas denitrificans*”, *Biotechnology and Bioengineering*, 47 (1), p. 27–41.
- WEBSTER G.; EMBLEY T.M., FREITAG T.E., SMITH Z., PROSSER J.I., 2005, “Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils”, *Environmental Microbiology*, 7(5), p. 676-684.
- WILHELM R., ABELIOVICH A., NEJIDAT A., 1998, “Effect of long-term ammonia starvation on the oxidation of ammonia and hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*”, *Journal of Biochemistry*, 124 (4), p.811-815.
- YILMAZ G., LEMAIRE R., KELLER J., YUANZ. Q., 2007, “Effectiveness of an alternating aerobics, anoxic/anaerobic strategy for maintaining biomass activity of BNR sludge during long-term starvation”, *Water Research*, 41 (12), p. 2590-2598.
- YUAN Q., WANG H.Y., CHU Z., HANG Q., LIU K., LI C., 2017, “Influence of C/N ratio on MBBR denitrification for advanced nitrogen removal of wastewater treatment plant effluent”, *Desalination and Water Treatment*, 66, p. 158-165.
- ZALA SL, AYYER J, DESAI AJ., 2004, “Nitrate removal from the effluent of a fertilizer industry using a bioreactor packed with immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* and *Comamonas testosteroni*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (7), p.661–665.
- ZELLNER G., FEUERHAKE E., JOERDENING H.J., MACARIO A.J.L., CARIO D.M., NWAY E.C., 1995, “Denitrifying and methanogenic bacteria in the biofilm of a fixed-film reactor operated with methanol/nitrate demonstrated by immunofluorescence and microscopy”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43 (3), p. 566–571.
- ZHANG X., SONGA Z., GUO W., LU Y., QI L., WEN H., HAO H., 2017, “Behavior of nitrogen removal in an aerobic sponge based moving bed biofilm reactor”, *Bioresource Technology*, 245, p. 1282-1285.
- ZHEN, P.Y., YONG, M., YING, W.S., 2007, “Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process”, *Journal Environmental Sciences*, 19 (3), p. 284-289.
- ZHU S., CHEN S., 1999, “An experimental study on nitrification biofilm performances using a series reactor system”, *Aquacultural Engineering*, 20 (4), p. 245-259.
- ZHU S., CHEN S., 2001, “Impacts of Reynolds number on nitrification biofilm kinetics”, *Aquacultural Engineering*, 24 (3), 213-229.
- ZHU S., CHEN S., 2002, “The impact of temperature on nitrification rate in fixed film biofilters”, *Aquacultural Engineering*, 26 (4), 221-237.