Ana Lucia Gerardi Spínola

**BIOFILMES AERÓBIOS PARA REMOÇÃO DE
NITROGÊNIO EM CÉLULAS DE FLUXO, SUBMETIDOS A
DIFERENTES VELOCIDADES SUPERFICIAIS E TAXAS
DE CARREGAMENTO.**

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos, da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Hidráulica
e Saneamento.

Orientador: Prof. Titular José Roberto Campos

São Carlos-SP

2009

(ficha catalográfica)

(folha de aprovação)

Dedico aos meus pais Dálvaro Galvão Spínola e Heloisa Lúcia Gerardi que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e sempre estiverem muito presentes na minha vida.

Dedico aos meus avós Nadir Gerardi e Genésio Gerardi pelo grande carinho e apoio sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Roberto Campos pela orientação e incentivo durante a realização desse trabalho.

Ao Técnico Antônio Wagner Lamon pela amizade e ajuda com os microssores e operação do reator.

À Dra. Eloisa Pozzi pela grande amizade, apoio e ajuda com a parte microbilógica.

À Beatriz Cruz Gonzalez, pela amizade, companheirismo e parceria durante o nosso trabalho.

Ao Paulo “Jalaska”, pela amizade e ajuda com os gráficos e formatações.

Ao Dr. Arnaldo Sarti pela ajuda com o desenvolvimento do substrato sintético.

À Professora Maria Bernadete pela disponibilidade do uso do LPB e pelas sugestões no exame de qualificação.

Ao Professor Marcelo Zaiat pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos funcionários do Laboratório de Saneamento, Julio, Cidinha, Juliana e Paulo pela ajuda nas análises físico-químicas.

À Glauce, ex-funcionária do LATAR pela amizade e ajuda com o FIA.

À Julia Sumiko pela atenção e ajuda na iniciação na técnica de FISH.

À Técnica Maria Ângela Talarico pelo auxílio no uso do LPB.

À Juliana Calábria de Araujo pela atenção e dedicação com as minhas dúvidas sobre o FISH.

À Sá, Pavi, Flávia, Rose, Márcia, Jaqueline e Valderez, funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento, pelo atendimento de qualidade, atenção e gentileza.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado e a Fapesp pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todos os meus amigos, do mestrado ou não, que estiveram ao meu lado nesse período.

Ao André Castro de Souza Villela, que me ajudou muito, tanto na parte profissional quanto na pessoal, ao longo desse trabalho.

À minha família, porque se não fosse por ela, não teria chegado até aqui.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

SPÍNOLA, A. L. G. **Biofilmes aeróbios para remoção de nitrogênio em células de fluxo, submetidos a diferentes velocidades superficiais e taxas de carregamento.** 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

O pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, tais como o *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB), na maior parte de suas aplicações, faz-se necessário, já que esse tipo de tratamento biológico promove remoção de DBO na faixa de 60 a 75% e tem baixa eficiência na remoção de nitrogênio e fósforo. A remoção de nitrogênio geralmente é feita de forma convencional pela nitrificação, seguida da desnitrificação. Tanto a nitrificação, como a desnitrificação podem ser efetuadas em reatores com crescimento suspenso ou crescimento aderido, contudo é conhecido que sistemas baseados em biofilmes exercem influência direta na taxa da degradação de substrato e facilitam a retenção de bactérias nitrificantes em reatores. O principal objetivo deste trabalho é o de acompanhar o desenvolvimento de biofilmes aeróbios em reatores do tipo célula de fluxo para a nitrificação de substrato sintético simulando efluente de UASB, submetidos a diferentes velocidades superficiais (1, 4 e 8 m.h⁻¹) e taxas de carregamento (0,25; 0,5 e 1,0 g N.m⁻² biofilme.dia). O desenvolvimento dos biofilmes nitrificantes foi acompanhado mediante perfis de microssensores e estimativa do número mais provável de bactérias nitrificantes (NMP). Nas células de fluxo operadas com taxa de carregamento mais baixa (0,25 g N.m⁻² biofilme.dia), foram obtidas as melhores eficiências de remoção de NTK, a qual representa valor menor que as taxas de carregamento empregadas na literatura para reatores de crescimento aderido usados na nitrificação. Considerando as células de fluxo com taxa de carregamento mais baixa, a célula que apresentou remoção de NTK próxima a 100% foi a de menor velocidade superficial de (1 m.h⁻¹). Porém, esses sistemas apresentaram baixa eficiência para a nitrificação completa, obtendo maior produção de nitrito do que de nitrato; poderiam ser usados então na remoção de nitrogênio pela via curta. Os microssensores de OD foram eficientes para as análises de perfis de OD no interior dos biofilmes nitrificantes, mostrando grandes variações, à medida que o biofilme se desenvolvia, nas concentrações de OD do líquido circundante e do fundo do biofilme

Palavras-chave: Biofilmes aeróbios. Pós-tratamento. Nitrificação. Microssensores

ABSTRACT

SPÍNOLA, A. L. G. Aerobic biofilms for nitrogen removal in flow cells, submitted to different superficial velocities and loading rates. 2009. 80 p. Dissertation (Master's Degree) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

The post-treatment of anaerobic reactor effluents, such as the *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB), in most applications, is necessary, since this kind of biological treatment promotes BOD removal ranging from 60 to 75% and it has low efficiency in nitrogen and phosphorous removal. Nitrogen removal is usually carried out in a conventional way through nitrification, followed by denitrification. Nitrification, as well as denitrification, can be achieved in suspended growth reactors, or in adhered growth reactors, however it is known that systems based on biofilms exert direct influence in substrate degradation rates and ease the retention of nitrifying bacteria in reactors. The main objective of this work is to follow the development of aerobic biofilms in flow cell type reactors for the nitrification of synthetic substrate simulating an UASB effluent, submitted to different superficial velocities (1, 4 and 8 m.h⁻¹) and loading rates (0.25; 0.5 and 1.0 g N.m⁻² biofilm.day). The development of nitrifying biofilms was followed by microsensors profiles and an estimative of the most probable number of nitrifying bacteria (MPN). The best NTK removal efficiencies were obtained in flow cells operated with a lower loading rate (0.25 g N.m⁻² biofilm.day), which represents a lower level than the levels applied in literature for adhered growth reactors used for nitrification. Considering the flow cells with a lower loading rate, the cell that presented NTK removal close to 100% was the one with the lowest superficial velocity (1 m.h⁻¹). However, these systems present low efficiency for complete nitrification, obtaining higher nitrite than nitrate production; they could then be used in nitrogen removal by short way. The DO microsensors were efficient for analyses of DO profiles inside nitrifying biofilms, showing great variations, while the biofilm developed itself, in the DO concentrations in the contiguous liquid and at the bottom of the biofilm.

Key-words: Aerobic biofilms. Post-treatment. Nitrification. Microsensors

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Desenvolvimento do biofilme segundo Stoodley et al. (2002)	10
Figura 4.1. Esquema da ETE das Flores mostrando ponto de coleta do lodo de inóculo	23
Figura 4.2. Reator tipo célula de fluxo utilizado para o crescimento do biofilme e estudo com microsensores	24
Figura 4.3. Esquema do sistema experimental com uma célula de fluxo.	25
Figura 4.4. Foto da instalação experimental	26
Figura 4.5. Fotografia microscópica (aumento de 100 X) do microsensor de OD	28
Figura 5.1. Imagem de microscopia de contraste de fase do lodo de inóculo da fase I	36
Figura 5.2. Imagens de microscopia de contraste de fase do lodo de inóculo da fase II	36
Figura 5.3. Imagens de microscopia de contraste de fase do lodo de inóculo da fase III	37
Figura 5.4. Fotomicrografia do biofilme com 24h de desenvolvimento.....	38
Figura 5.5. Fotomicrografia do biofilme com 29h de desenvolvimento.....	38
Figura 5.6. Fotomicrografia do biofilme com 2 dias de desenvolvimento	39
Figura 5.7. Fotomicrografia do biofilme com 3 dias de desenvolvimento	39
Figura 5.8. Perfil de OD do biofilme no 1º, 2º, 3º e 4º dia de operação (Taxa= 1,5 g N m ⁻² biofilme.dia, v _{superf} = 1 m.h ⁻¹ , Tº= (25±2) °C).....	40
Figura 5.9. Perfil de OD do biofilme no 5º dia de operação (Taxa= 1,5 g N m ⁻² biofilme.dia, v _{superf} = 1 m.h ⁻¹ , Tº= (25±2) °C)	41
Figura 5.10. Fotomicrografia do biofilme aderido do 1º, 2º, 3º e 4º dia de operação (Taxa= 1,5 g N m ⁻² biofilme.dia, v _{superf} = 1 m.h ⁻¹ , Tº= (25±2) °C)	41
Figura 5.11. Perfis de OD do 1º e 2º dia de operação do Pré-teste II	42
Figura 5.12. Perfis de OD do 3º e 4º dia de operação do Pré-teste II	43
Figura 5.13. Perfis de OD do 5º ao 9º dia de operação do Pré-teste II	43
Figura 5.14. Concentração de NTK nas amostras do afluente e dos efluentes.....	45

Figura 5.15. Concentração de nitrito nas amostras de efluentes das células de.....	46
Figura 5.16. Concentração de nitrato nas amostras de efluentes das células de	46
Figura 5.17. Concentração da alcalinidade nas amostras de efluentes das	47
Figura 5.18. Eficiência de Remoção de NTK do biofilme nitrificante das.....	48
Figura 5.19. Consumo de alcalinidade nas amostras de efluentes das células.....	49
Figura 5.20. Concentração de NTK nas amostras do afluente e dos efluentes.....	50
Figura 5.21. Concentração de nitrito nas amostras de efluentes das células	50
Figura 5.22. Concentração da alcalinidade nas amostras de efluentes das	51
Figura 5.23. Eficiência de Remoção de NTK no biofilme nitrificante das células	51
Figura 5.24. Consumo de alcalinidade nas amostras de efluentes das células.....	52
Figura 5.25. Concentração de NTK nas amostras do afluente e dos efluentes.....	53
Figura 5.26. Concentração de nitrito nas amostras de efluentes das células	53
Figura 5.27. Concentração de nitrato nas amostras de efluentes das células.....	54
Figura 5.28. Concentração da alcalinidade nas amostras de efluentes das	55
Figura 5.29. Eficiência de Remoção de NTK do biofilme nitrificante das células	55
Figura 5.30. Consumo de alcalinidade nas amostras de efluentes das células de	56
Figura 5.31. Perfis de OD do início e final da operação da Fase I, Taxa= 0,5 g N m ⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (:1 m.h ⁻¹ , : 4 m.h ⁻¹ , : 8 m.h ⁻¹).....	57
Figura 5.32. Perfis de OD do início e final da operação da Fase II, Taxa= 1,0 g N m ⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (:1 m.h ⁻¹ , : 4 m.h ⁻¹ , : 8 m.h ⁻¹).....	58
Figura 5.33. Perfis de OD do início e final da operação da Fase III, Taxa= 0,25 g N m ⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (:1 m.h ⁻¹ , : 4 m.h ⁻¹ , : 8 m.h ⁻¹).....	58
Figura 5.34. Estimativa de bactérias nitrificantes oxidantes de amônia no lodo de inóculo e nas fases: I (Taxa _{carreg} = 0,5), II (Taxa _{carreg} =1,0) e III (Taxa _{carreg} =0,25).....	61
Figura 5.35. Estimativa de bactérias nitrificantes oxidantes de nitrito no lodo de inóculo e nas fases: I (Taxa _{carreg} = 0,5), II (Taxa _{carreg} =1,0) e III (Taxa _{carreg} =0,25).....	62
Figura 5.36. Eficiências de remoção de NTK (porcentagem) em função da taxa de carregamento e velocidade superficial (T°= (25±2) °C).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Efeitos da temperatura, pH e HNO_2 na nitrificação	6
Tabela 3.2- Exemplos de sistemas para estudos de formação de biofilme.....	15
Tabela 4.1- Taxas de carregamento e velocidades superficiais dos pré-testes	19
Tabela 4.2- Taxas de carregamento e velocidades superficiais das operações.....	19
Tabela 4.3- Composição do substrato sintético simulando esgoto sanitário	20
Tabela 4.4- Resultados médios dos principais parâmetros físico-químicos de operação no período de Fevereiro/2006 até Janeiro/2007 levantados na ETE de Piçarrão-Campinas/SP.	21
Tabela 4.5- Quantidades de componentes orgânicos e inorgânicos presentes no substrato	22
Tabela 4.6- Soluções de sais minerais acrescentadas ao substrato sintético	22
Tabela 4.7- Frequência das análises e métodos utilizados.....	26
Tabela 4.8- Soluções estoque para o preparo do meio de cultura para as bactérias oxidantes de amônia.....	30
Tabela 4.9- Soluções estoque para o preparo do meio de cultura para as bactérias oxidantes de nitrito	32
Tabela 5.1- Características do lodo de inóculo das fases I, II e III.....	35
Tabela 5.2- Valores de pH do afluente e dos efluentes das células na Fase I	59
Tabela 5.3- Valores de pH do afluente e dos efluentes das células na Fase II	60
Tabela 5.4- Valores de pH dos efluentes das células na Fase III	60
Tabela A. 1- Valores das concentrações de NTK, NO_2^- e NO_3^- no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase I.....	74
Tabela A. 2- Valores das concentrações de alcalinidade no afluente e nos efluentes das células.....	75
Tabela A. 3- Valores das concentrações de NTK, NO_2^- e NO_3^- no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase II.....	76

Tabela A. 4- Valores das concentrações de alcalinidade no afluente e nos efluentes das células.....	77
Tabela A. 5- Valores das concentrações de NTK, NO_2^- e NO_3^- no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase III	78
Tabela A. 6- Valores das concentrações de alcalinidade no afluente e nos efluentes das células.....	79
Tabela A. 7- Valores da estimativa da população de bactérias nitrificantes nas Fases I,II e III.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANAMMOX	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i>
AOB	<i>Amonia-oxidizing bacteria</i>
BRN	Bactérias Redutoras de Nitrogênio
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CBE	<i>Center for Biofilm Engineering</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DBO ₅ , DBO _{5,20}	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DMSO	Dimetil sulfóxido
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
LATAR	Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Águas
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
LPS	Lipopolissacarídeos
MEA	Monoetanolamina
N-Amoniacal	Nitrogênio na forma amoniacal
NH ₄ ⁺	Nitrogênio na forma de íon amônio
NMP	Número Mais Provável
NO ₂ ⁻	Nitrogênio na forma nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrogênio na forma nitrato
NOB	<i>Nitrite-oxidizing bacteria</i>
NT	Nitrogênio Total
NTK	Nitrogênio Total Kjeldhal

OD	Oxigênio dissolvido
RBS	Reator Operados em Bateladas Seqüenciais
SHARON	<i>Single reactor High activity Ammonia Removal Over Nitrite</i>
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TMAH	Tetra-metil ammonia hidróxido
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Objetivos	3
3	Revisão Bibliográfica	4
3.1	Nitrificação e Remoção Biológica de Nitrogênio.....	4
3.2	Biofilmes.....	7
3.2.1	Generalidades	7
3.2.2	Processo de formação do biofilme.....	8
3.2.3	Reatores baseados em biofilmes	11
3.3	Microsensores no estudo de biofilmes.....	12
3.4	Sistemas para o estudo de biofilmes	14
4	Material e Métodos.....	18
4.1	Considerações Gerais	18
4.2	Substrato Sintético	20
4.3	Coleta e caracterização do lodo de inóculo	23
4.4	Instalação experimental.....	23
4.5	Análises físico-químicas.....	26
4.6	Análises com microsensores.....	27
4.6.1	Construção e calibração do microsensor de OD.....	27
4.7	Monitoramento microbiológico	28
4.7.1	Introdução	28
4.7.2	NMP de Bactérias Nitrificantes	29
4.7.2.1	Diluição em Série.....	29
4.7.2.2	Bactérias Oxidantes de Amônia	30

4.7.2.3	Bactérias Oxidantes de Nitrito	32
4.7.3	Microscopia Óptica.....	33
5	Resultados e Discussão	35
5.1	Considerações Iniciais	35
5.2	Caracterização do lodo de inóculo	35
5.3	Acompanhamento microscópico do desenvolvimento do biofilme	37
5.4	Definição do tempo de operação do sistema	40
5.5	Remoção de Nitrogênio	44
5.5.1	Fase I.....	45
5.5.2	Fase II.....	49
5.5.3	Fase III.....	52
5.6	Oxigênio Dissolvido (OD).....	56
5.7	pH	59
5.8	Monitoramento microbiológico	61
5.9	Comparação das Fases I, II e III	63
6	Conclusões.....	65
7	Referências.....	67

1 Introdução

O tratamento biológico, aeróbio ou anaeróbio, é o mais empregado atualmente para o tratamento de águas residuárias, devido a seu baixo custo de operação. Contudo, os sistemas anaeróbios devem ser encarados como uma primeira etapa do tratamento, uma vez que estes não são capazes de produzir efluentes finais com elevado grau de qualidade, principalmente em relação à remoção de nutrientes.

A tendência atual de acoplar um reator aeróbio a um anaeróbio tem como objetivo a remoção de matéria orgânica remanescente do tratamento anaeróbio e a remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo.

O pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, tais como o *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB), faz-se necessário para que esses se adequem aos padrões estabelecidos pela Resolução 375/2005 do CONAMA, minimizando assim os danos causados aos corpos receptores pelo excesso de nitrogênio, como é o caso da eutrofização

A remoção de nitrogênio, na grande maioria das ETEs que possuem tratamento terciário, é feita de forma convencional pela nitrificação, seguida da desnitrificação, sendo que foi demonstrado que sistemas baseados em biofilmes exercem influência direta na taxa da degradação de substrato e facilitam a retenção de bactérias nitrificantes em reatores (WUERTZ *et al.*, 2004).

Apesar do conhecimento sobre os efeitos da hidrodinâmica, da composição do substrato e da transferência de massa no desenvolvimento de biofilmes, através de estudos computacionais e experimentais, ainda há pouca informação sobre como comunidades microbianas são afetadas pela estrutura dos biofilmes e quando a análise dessas comunidades pode ser usada para

explicar ou prever o desempenho dos sistemas que os utilizam (BATHE *et al.*, 2004).

Especificamente na linha de pesquisa de reator de leito expandido/fluidificado, estudos feitos no Departamento de Hidráulica e Saneamento enfocaram a atividade de grupos microbianos presentes em biofilmes (CAMPOS, 1989 e ARAÚJO, 1995). Porém, chegou-se a um ponto que concluiu-se que seria conveniente aprofundar o estudo da formação e ação desses biofilmes, visando assim melhor conhecer esses consórcios e aprimorar o processo e a operação dos reatores.

O espectro de técnicas utilizadas para a investigação de biofilmes é vasto, abrange elevado número de áreas científicas, envolvendo desde métodos de biologia molecular em escala laboratorial, aplicação de microssensores, até o uso de reatores em escala plena. Microssensores, por exemplo, podem ser usados para monitorar microperfis de concentrações químicas, permitindo assim análises das taxas de conversão dos substratos e da atividade microbiana em biofilmes.

A formação, estrutura e metabolismo de comunidades microbianas imobilizadas em biofilme estão associadas às forças hidrodinâmicas em reatores. A influência das forças hidrodinâmicas podem resultar em biofilmes fracos e porosos ou densos e fortes e também influenciar no processo de desprendimento desses do meio suporte (LIU, 2001; STOODLEY, 2002). O presente estudo usa sistemas para o estudo de biofilmes com o objetivo de analisar a influência das taxas de carregamento e velocidades tangenciais na formação e estrutura de biofilmes nitrificantes. Os resultados dessa pesquisa fornecerão dados sobre as melhores taxas de carregamentos e velocidades tangenciais para promover a nitrificação em reatores de filme fixo e poderão subsidiar trabalhos futuros com reatores de leito expandido em escala real na EESC-USP.

2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi o de acompanhar o desenvolvimento, mediante o uso de microssensores e a técnica do número mais provável (NMP), de biofilmes aeróbios em reatores do tipo célula de fluxo para a nitrificação de substrato sintético simulando efluente de UASB, submetidos a diferentes velocidades superficiais e taxas de carregamentos.

Os objetivos específicos são:

- Verificar se os reatores do tipo células de fluxo constituem ferramentas apropriadas para o estudo do desenvolvimento de biofilme nitrificante para pós-tratamento de efluente de UASB;
- Definir a melhor taxa de carregamento para a maior eficiência de remoção de nitrogênio;
- Definir a melhor velocidade superficial para a maior eficiência de remoção de nitrogênio.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Nitrificação e Remoção Biológica de Nitrogênio

Nitrificação é o processo no qual o nitrogênio amoniacal é biologicamente oxidado a nitrito (nitritação) e a nitrato (nitratação) com O_2 como receptor final de elétrons. O processo da oxidação de nitrogênio é catalizado por dois grupos de bactérias filogeneticamente não relacionados. O primeiro passo da nitrificação é a oxidação da amônia a nitrito, com a hidroxilamina (NH_2OH) como produto intermediário. Esse passo é catalizado pelas enzimas de membrana amônia mono-oxidase e hidroxilamina oxidoredutase e é feito pelas bactérias oxidantes de amônia (AOB). O segundo grupo, as bactérias oxidantes de nitrito, oxida posteriormente o nitrito a nitrato. Até agora, nenhum gênero encontrado foi capaz de oxidar diretamente amônia a nitrato.

Considera-se que a reação da oxidação da amônia a nitrito é a etapa limitante do processo. Em contraste, o nitrito é oxidado rapidamente a nitrato e, conseqüentemente, o acúmulo de nitrito é raro em reatores usados para a nitrificação. No processo de nitrificação parcial, entretanto, o acúmulo de nitrito é necessário, e o segundo passo da nitrificação deve ser inibido com o objetivo de reter as AOB e lavar as NOB do sistema (PENG, 2006).

Em sistemas de tratamento, a população microbiana representa um balanço delicado de microrganismos que interagem e influenciam outras populações. A nitrificação é suscetível à instabilidade, pois envolve uma interação frágil de mutualismo (KNAPP & GRAHAM, 2007). Durante o processo

de nitrificação, AOB e NOB co-existem e se beneficiam energeticamente dessa íntima associação. As NOB são capazes de interceptar o nitrito produzido pelas AOB, ajudando-as assim a lidar com baixa quantidade de energia liberada na reação de oxidação de nitrito. Por outro lado, AOB se beneficiam pela presença das NOB, pois essas liberam o ambiente da presença tóxica do nitrito (PENG, 2006).

Os gêneros responsáveis pela oxidação do N-amoniacoal são *Nitrosomonas* e *Nitrosospira*, enquanto que a oxidação do nitrito é atribuída aos gêneros *Nitrobacter* e *Nitrospira*. Porém, existem outros gêneros que promovem a oxidação de N-amoniacoal, tais como: *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio* e a oxidação de nitrito: *Nitrospina* e *Nitrococcus* (MADIGAN, 2004).

A maior parte das bactérias nitrificantes é quimioautotrófica obrigatória, isto é, usam CO_2 , mediante a fixação pelo Ciclo de Calvin, para a biossíntese de carbono orgânico. Essas bactérias também usam a energia obtida da oxidação da amônia ou do nitrito como única fonte de energia. Bactérias nitrificantes e o processo de nitrificação fazem parte dos tratamentos biológicos aeróbios para remoção de nitrogênio.

O principal objetivo na operação de sistemas biológicos é o de criar condições que favorecem as reações bioquímicas desejáveis. Para alcançar essas condições, a manipulação de vários parâmetros operacionais precisa ser feita e a compreensão da atividade microbiana é essencial para melhorar o controle e o desempenho do processo. Segundo Paredes et al. (2007) os seguintes fatores têm efeito significativo no processo de nitrificação (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Efeitos da temperatura, pH e HNO_2 na nitrificação

Fator	Efeito
Temperatura	
T > 15°C	oxidantes de amônia crescem mais rápido que oxidantes de nitrito
T = 25°C	oxidantes de amônia competem fortemente com as oxidantes de nitrito
pH	
7,0 a 8,0	ótima faixa para nitrificação
7,9 a 8,2	ótima faixa para oxidantes de amônia
7,2 a 7,6	ótima faixa para oxidantes de nitrito
HNO_2 (mg.L⁻¹)	
0,2 a 2,8	inibição do processo de nitrificação

Fonte: modificado de Paredes et al (2007)

Metcalf & Eddy (2003) detalham três fatores essenciais para a estabilidade da nitrificação:

Relação C/N (carbono/nitrogênio): consideram que a habilidade dos processos de lodos ativados de nitrificar é dependente da relação DBO_5/NTK , sendo que, para valores superiores a cinco, classifica-se o processo como combinado de oxidação de carbono e nitrificação. Quando o valor dessa relação é inferior a três, o processo é considerado, predominantemente, de nitrificação. E quanto maior essa relação, menor é porcentagem de bactérias nitrificantes no sistema.

Oxigênio dissolvido (OD): as velocidades máximas de nitrificação ocorrem em concentrações de OD acima de 2,0 mg.L⁻¹. O processo consome 4,57 mg de oxigênio por mg de nitrogênio amoniacal oxidado. Park et al. (2008) mostraram que a concentração de OD para um processo de nitrificação estável é em torno de 5,0 mg.L⁻¹.

Alcalinidade: para cada mg.L⁻¹ de N-amoniacal removido, são consumidos 7,14 mg/L de alcalinidade de CaCO_3 . Deve-se, portanto, manter a alcalinidade do sistema em valor que assegure pH estável, de modo a favorecer a nitrificação.

3.2 Biofilmes

3.2.1 Generalidades

Biofilmes formam-se naturalmente em superfícies sólidas em contato com água não esterilizada e são definidos como comunidades de microrganismos imobilizados, conjuntamente, numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) de origem microbiana. Estes podem ser compostos de uma população que se desenvolveu de espécies únicas ou de uma comunidade derivada de múltiplas espécies microbianas, formando assim um sistema biológico com alto nível de organização onde bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais.

Davey (2000) enumera uma série de vantagens para células microbianas crescerem em um biofilme:

Proteção contra fatores ambientais: devido a matriz exapolimérica, o biofilme serve de abrigo e ambiente homeostático para as bactérias. Foi comprovado que o EPS pode absorver compostos orgânicos dissolvidos (WOLFAARDT et al., 1998), promovendo assim, uma forma de concentração de nutrientes essenciais e compostos metabólicos. A matriz polimérica também tem o potencial de prevenir fisicamente o acesso de alguns agentes antimicrobianos, agindo como trocador iônico e restringindo a difusão dos componentes do líquido circundante para o interior do biofilme. Também serve de proteção contra uma variedade de estressores ambientais como radiação UV, variações de pH, choques osmóticos e dessecação.

Disponibilidade de nutrientes e cooperação metabólica: o conjunto de canais permeáveis a água no interior do biofilme, rodeados por microcolônias, já foi comparado a um sistema circulatório primitivo. Eles promovem um meio efetivo de troca de nutrientes e metabólitos com a fase aquosa intersticial, aumentando a disponibilidade de nutrientes e a eliminação de metabólitos. A

arquitetura elaborada permite a cooperação metabólica e nichos são formados com esses sistemas bem organizados.

Aquisição de novas características genéticas: a conjugação, também denominada transferência horizontal de genes, é importante para a evolução e diversidade genética de comunidades microbiológicas naturais. A conjugação é o provável mecanismo usado por bactérias para a transferência de genes dentro da população ou entre populações distintas dentro do biofilme.

Muitos ambientes são influenciados por biofilmes. Sob a perspectiva humana, os efeitos variam de desejáveis, indesejáveis até prejudiciais, dependendo do local onde o biofilme está aderido e da comunidade microbiana que o constitui. Exemplos de efeitos desejáveis são as atividades de biofilmes acumulados em reatores para o tratamento de águas residuárias. Exemplos de efeitos não desejáveis são biofilmes acumulados em torres de resfriamento e outros equipamentos de troca de calor – esses biofilmes aumentam a resistência de transferência de calor. Exemplos de efeitos prejudiciais são biofilmes acumulados em equipamentos médicos e implantes protéticos (LEWANDOWSKI, 2007).

3.2.2 Processo de formação do biofilme

Microrganismos que crescem associados às comunidades de superfície denominadas biofilmes são fisiologicamente distintos daqueles que crescem livres no meio líquido. À medida que as células bacterianas se adaptam nessas comunidades, elas exibem traços genéticos que são diferentes daqueles expressados em crescimento planctônico (STEWART, 2008). Sauer et al. (2002) sugeriram que a formação do biofilme é um processo no qual as células passam constantemente por mudanças fenotípicas. Durante alguns estágios do desenvolvimento, quase 50% do proteoma pode ser produzido distintamente daquele comparado com as mesmas células na cultura planctônica.

A formação do biofilme inclui vários passos, porém um dos pré-requisitos é a aderência das células microbianas à superfície sólida (meio suporte). Vários fatores físico-químicos contribuem para esse processo de aderência, entre eles a hidrofobicidade da superfície sólida e da superfície celular, presença de polímeros extracelulares e carga elétrica da superfície bacteriana. Os polímeros extracelulares não são apenas importantes para o processo de aderência, mas também determinam a estrutura do biofilme. Os exopolímeros são constituintes da matriz polimérica, excretados pelas células microbianas e compreendem: polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS), lipídeos, entre outros. Além dos exopolímeros, a matriz do biofilme também apresenta restos celulares e produtos extracelulares de atividades hidrolíticas, assim como é capaz da adsorvência química e de partículas (LENS *et al.*, 2003).

A velocidade de formação do biofilme varia, dependendo do meio suporte e das células bacterianas que irão formá-lo, pois cada espécie bacteriana excreta um ou vários tipos de substâncias extracelulares específicas que irão interferir em sua estrutura. Sucessivas microcomunidades desenvolvem nichos dentro de determinadas camadas, à medida em que o biofilme aumenta de espessura, e este pode atingir estado de equilíbrio dinâmico, em que os processos de produção são contrabalanceados pelos processos que o reduzem e o removem. A conversão contínua de substrato produz excesso de biomassa e produtos metabólicos, que são arrastados para o fluido circundante. O biofilme pode ser removido de superfícies por uma das seguintes formas: predação, cisalhamento, abrasão e desprendimento (ARAUJO, 2001).

Diversas bactérias e fungos são importantes formadores de biofilmes. Algumas das principais bactérias são *Pseudomonas sp.*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Entre os fungos, as espécies do gênero *Candida*, como *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* são os principais patógenos formadores de biofilmes. *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo não patogênico, também serviu de estudo para um modelo de formação de biofilme (DUSANE, 2008).

Entre outras formas, o biofilme pode crescer em camadas achatadas ou em agregados descontínuos na superfície sólida. A superfície do biofilme não é

necessariamente plana, a rugosidade tem impacto na hidrodinâmica do fluxo, no transporte de massa do líquido circundante para o interior do biofilme e no desprendimento de biomassa por atrito (BISHOP, 2007).

Segundo Stoodley *et al* (2002) o filme bacteriano se desenvolve num processo de cinco passos (Figura 3.1): aderência das células a superfície (1); produção de EPS (2), o que resulta em aderência “irreversível”(3); maturação da arquitetura do biofilme (4) e dispersão de células individuais (5).

Figura 3.1. Desenvolvimento do biofilme segundo Stoodley et al. (2002)

A atividade metabólica das células, junto com o processo difusional, resulta em gradientes de concentrações de nutrientes, compostos sinalizantes e excreção de metabólitos. À medida que as bactérias respondem a esses gradientes, elas se adaptam às condições locais, que podem mudar à medida que o biofilme se desenvolve. Como resultado, o biofilme exibe considerável heterogeneidade estrutural, química e biológica.

3.2.3 Reatores baseados em biofilmes

Biofilmes têm sido empregados em reatores para tratamento de efluentes desde 1870, quando um leito de pedra foi usado como meio suporte em filtros de percolação. Atualmente, meios suportes feitos de plástico são os mais comumente usados, pois fornecem área superficial alta (acima de $240 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$ em alguns casos) para a aderência dos microrganismos. Sistemas de tratamento baseados em biofilmes têm muitas vantagens em relação aos sistemas tradicionais como, por exemplo, (O'REILLY et al., 2008):

- Baixo requerimento de energia;
- Operação simples e com menor manutenção de equipamentos;
- Unidades compactas devido ao uso da alta área superficial do biofilme;
- Taxas volumétricas de carregamento maiores;
- Permite a co-existência de microrganismos aeróbios e anóxicos e anaeróbios no mesmo ecossistema;
- Baixa sensibilidade e boa recuperação a choques de carregamento.

Esses sistemas promovem condições para a fixação de bactérias de crescimento lento, produzindo microambientes estratificados devido a gradientes de oxigênio, amônia, nitrito ou nitrato (EGLI, 2003). Biofilmes aeróbios têm sido usados para a remoção de nitrogênio devido ao tempo de retenção da biomassa suficientemente longo para alcançar nitrificação satisfatória e, também, porque o arraste das bactérias nitrificantes do sistema pode ser evitada em condições de baixa taxa de carregamento (KINDAICHI et al., 2004; SHOJI et al., 2008).

Park et al. (2008) usaram quatro reatores aeróbios de leito fixo, inoculados como lodo ativado de ETE e tratando água residuária sintética com concentrações médias de N-amoniaco de $26,8 \text{ mg.L}^{-1}$ e DBO de $67,3 \text{ mg.L}^{-1}$, para verificar o efeito de diferentes concentrações de OD (1; 3; 4; 5 e 7 mg.L^{-1}) no biofilme nitrificante e concluíram que maiores concentrações de OD (5 e 7 mg.L^{-1}) resultaram em aumento na população de AOB e NOB e diminuição da

população de bactérias heterotróficas. Ha & Ong (2007) mostraram que remoção de nitrato e nitrogênio total aumenta conforme é aumentada a taxa de recirculação em filtro biológico aerado, usando areia como meio suporte, tratando água residuária sintética e inoculado com lodo ativado de ETE municipal. Alcançaram até 75% de remoção de NTK com taxas de recirculação entre 200 e 300%. Whang et al. (2008) obtiveram remoção de nitrogênio entre 76 e 96% usando biorreator de membrana aeróbio para o tratamento de água residuária rica em compostos orgânicos de difícil degradação, como dimetil sulfoxido (DMSO), monoetanolamina (MEA) e tetra-metil amônia hidróxido (TMAH). E O'Reilly et al. (2008) usaram um reator de biofilme em bateladas seqüenciais na remoção de carbono e nitrogênio, em escala de bancada, piloto e real. Observaram 82% de eficiência de remoção de nitrogênio total (NT) na escala de bancada, pouco significativa na escala piloto e 40% na escala real.

3.3 Microssensores no estudo de biofilmes

Medições *in situ* de vários constituintes do meio aquoso e dentro de biofilmes fornecem informações para monitorar as condições ambientais em um local específico e para determinar o impacto de estressores ambientais. Geralmente, essas medições são feitas usando eletrodos químicos de vários tipos, incluindo aqueles para medir pH, oxigênio dissolvido, potencial de oxirredução e vários cátions e ânions. Entretanto, esses eletrodos são relativamente grandes, na ordem de 1 a 3 cm de diâmetro. Eles podem ser usados para monitorar a concentração do meio líquido, quando há volume suficiente, porém, são inapropriados para medição de pequenos volumes de líquidos ou em biofilmes. Além do mais, o tamanho desses eletrodos torna inviável fazer medições espaciais em distâncias muito pequenas, como é necessário no monitoramento de biofilmes (BISHOP, 2007).

Em estudos com biofilmes, microssensores são usados para medir concentrações de substâncias dissolvidas ao longo de sua espessura e no líquido próximo a sua superfície. Para tais medidas, dois tipos de fatores são quantificados: (i) aqueles que caracterizam a atividade microbiana no biofilme

(taxas de consumo de nutrientes) e (ii) aqueles que caracterizam a transferência de nutrientes das soluções (coeficiente de transporte de massa e difusividade) (LENS *et al.*, 2003). Muito da heterogeneidade na atividade biológica dentro do biofilme pode ser explicada pelo estudo em microescala da heterogeneidade química presente. Biofilmes contêm gradientes de concentrações de substratos e produtos metabólicos. Oxigênio é o mais estudado e o exemplo mais familiar; e perfis de concentrações de oxigênio no biofilme são medidos frequentemente usando microssensores (STEWART & FRANKLIN, 2008).

Aparentemente, os microssensores foram introduzidos no estudo da ecologia microbiana por Revsbech (1989), que os utilizou para levantar o perfil de O_2 em sedimentos e biofilmes. Após isso, microssensores importantes para a ecologia microbiana foram desenvolvidos, como os para determinação de NH_4^+ , NO_3^- , pH, SO_2 , S^{2-} , H_2S , N_2O , CH_4 e CO_2 . Os quatro últimos, desenvolvidos recentemente, indicam a dinâmica desse campo de estudo e sua aplicabilidade (DE BEER *et al.*, 1999).

Microeletrodos foram usados com sucesso para investigar a distribuição espacial de atividade microbiana em filmes biológicos (DE BEER, 1997; KUHLE, 1992 e ZHANG *et al.*, 1996) e em agregados microbianos de reatores de leito fluidificado (DE BEER, 1993; DE BEER, 1997 e LENZ *et al.*, 1993), tornando-se essenciais para esse tipo de pesquisa, pois permitem identificar os microambientes e quantificar as reações químicas locais a nível microscópico com grande resolução espacial, promovendo informações sobre os filmes biológicos que seriam difíceis obter de outra maneira (LENS *et al.*, 2003).

Hunter & Beveridge (2005) acoplaram um microeletrodo de oxigênio dissolvido a reatores de biodisco rotativo. Verificaram que a distribuição das concentrações de OD mudou de um alto grau de heterogeneidade próximo a superfície do biofilme até um baixo grau de heterogeneidade nas seções mais profundas do biofilme.

Microeletrodos também foram usados para determinar a resposta do biofilme ao estresse. Gillam *et al.* (2005) usaram pequenos canais abertos como reatores para o crescimento de biofilmes aderidos a partículas de areia, alimentados com substrato sintético e usando como inóculo uma cultura mista de microrganismos provenientes de solo e lodo ativado. Verificaram que as

células bacterianas liberavam potássio intracelular para o meio, sob condições de estresse em ambientes contaminados com 10 mg. L⁻¹ de cádmio. O potássio intracelular liberado foi detectado com um microsensor de potássio. Satoh et al. (2005), usando medições com microeletrodos de amônia e oxigênio dissolvido em amostras de biofilmes aeróbios de uma ETE municipal em Hachinohe, Japão, verificaram a inibição da respiração e nitrificação em camadas superiores do biofilme, após a exposição de 6 a 18 minutos a 2-clorofenol.

3.4 Sistemas para o estudo de biofilmes

O entendimento do fenômeno de aderência e mecanismos de formação do biofilme é feito com base no conhecimento da habilidade de aderência de diferentes microrganismos e na compreensão de como o desenvolvimento do biofilme é afetado pelo largo espectro de condições ambientais que influenciam a sua estrutura, composição e função (AZEVEDO et al., 2009).

Experimentos *in vitro* com condições controladas, junto com o desenvolvimento de vários sistemas para o crescimento de biofilmes, têm sido feitos desde a metade da década de 80 para tentar preencher as lacunas de informação desses processos. Após as primeiras comprovações da existência da comunicação (troca de metabólitos e conjugação) entre as células no interior do biofilme (NEALSON & HASTINGS, 1979; DWORKING & KAISER, 1985), estudos *in vitro* vêm sendo usados para a melhor caracterização desse fenômeno. Apesar desses verificarem a influência de um conjunto de fatores ambientais, condições fisiológicas ou mutacionais pré-determinadas, ainda não é claro como comparar a importância relativa dessas condições e/ou estudar as inter-relações entre elas. Isso ocorre principalmente porque a maioria dos sistemas empregados não é suficientemente versátil e/ou fácil de se operar, a fim de gerar grandes quantidades de dados reprodutíveis. Outra razão, é a dificuldade de se controlar todas as variáveis que influenciam na formação de biofilmes, especialmente quando envolvem consórcios microbianos. Azevedo et

al. (2009) listam uma série de sistemas usados no crescimento e estudo de biofilmes e suas respectivas vantagens e desvantagens (Tabela 3.2)

Tabela 3.2- Exemplos de sistemas para estudos de formação de biofilme

Sistema	Características	Principais vantagens	Principais desvantagens
Modified Robbins Device	Tubo com suportes (cupons) removíveis para o crescimento do biofilme	Condições hidrodinâmicas bem definidas	Pouco usado
Quimiostato de duas fases	Dois biorreatores submetidos às mesmas condições de cultivo, sendo que um serve de controle	Evita desperdícios quando operado em condições de cultura contínua. Ideal para o estudo de biofilmes formados por patógenos	Pouco usado
Célula de Fluxo	Canal aberto de base lisa por onde passa um fluxo e o biofilme cresce na base	Permite observação direta por microscopia sem alterar a estrutura do biofilme	Pouco usado
Fermentador de biofilme de espessura constante	Mesa rotativa com compartimentos de espessura limitada para o crescimento do biofilme	Gera biofilme com profundidades fixas. Tipicamente usados em biofilmes orais.	Pouco usado
Microtitre Plate	Microplaca de poliestireno com 96 compartimentos para o crescimento do biofilme	Largamente usado. Também permite a inserção de cupons para microscopia direta.	A observação microscópica direta é complicada. A quantificação apresenta baixa reprodutibilidade.
Calgary Device	Adaptação da micropalca que possui suportes dentro dos compartimentos para a aderência do biofilme	Largamente usado. Permite observação direta e quantificação do biofilme sob o microscópio.	Introduz uma superfície extra na Microtitre Plate. O biofilme é formado de “cabeça para baixo”
Biofilm Ring Test	Kit para estudo de substâncias formadoras do biofilme através da adição de partículas magnéticas ao meio	Largamente usado. Requer pouca manipulação após o inóculo inicial, aumentando a reprodutibilidade	Não foi completamente testado nem automatizado

Fonte: Adaptado de Azevedo et al. (2009)

Segundo Lens et al (2003), os reatores ou sistemas de bancadas empregados para o estudo de biofilmes são divididos em dois tipos: aqueles

que possuem cupons removíveis e aqueles que são usados principalmente para a observação microscópica *in situ*. Os últimos são comumente chamados de células de fluxo.

As células de fluxo permitem o escoamento de um substrato sobre uma superfície, na qual os microrganismos se fixam e crescem em estrutura típica de biofilme. Podem ser usadas para estudar o desenvolvimento, a dinâmica do desprendimento, distribuição de polissacarídeo extracelular e propriedades mecânicas dos biofilmes. Permitem também o estudo de como mudanças genéticas e ambientais podem afetar a sua estrutura. Há muitos tipos de células de fluxo, porém, o uso acoplado a sistemas de microscopia as restringiu a algumas geometrias específicas (LENS et al., 2003). Microscopia Confocal a Laser tem sido usada para monitorar biofilmes em células de fluxo, pois estas permitem a observação direta do biofilme, sob fluxo contínuo, sem a destruição de sua estrutura e preservação das comunidades (DAVEY et al, 2000).

Leu et al. (1995) estudaram como a influência de pequenas mudanças na velocidade superficial afetam o transporte de compostos nitrogenados em células de fluxo e demonstraram que quando a concentração de matéria orgânica é baixa ($DBO < 20 \text{ mg.L}^{-1}$), a mudança de fluxo laminar a turbulento tem maior impacto na conversão de nitrogênio. Quando o fluxo é alterado de laminar a turbulento ($v > 0,93 \text{ m.min}^{-1}$), a remoção de N-amoniacal diminui, a medida que a velocidade é aumentada.

Jackson et al. (2001) conseguiram alto grau de reprodutibilidade em biofilmes de 200 a 300 μm de espessura e quatro dias de idade, crescidos em células de fluxo com alimentadas com substrato sintético, temperatura média de 25 °C, inoculados com *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *K. pneumoniae*. Dusmore et al. (2006) estudaram a morfologia de células bacterianas provenientes de culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias redutoras de nitrito (BRN) em biofilmes aderidos a células de fluxo. Observaram que a adição de concentrações de nitrato de 80 mg.L^{-1} e 100 mg.L^{-1} ao substrato sintético ocasionavam mudanças na morfologia das células bacterianas. Após a adição de nitrato havia um predomínio maior de bacilos em comparação com as condições anteriores de redução de sulfato.

Antes de células de fluxo para crescimento de biofilmes tornarem-se disponíveis comercialmente, grupos de pesquisas individuais tiveram que fabricar seus próprios sistemas, o que resultou em muitas variações. Em parte, isso poder explicar a alta variabilidade e alguns dados conflitantes sobre conclusões de diferentes pesquisas relacionadas com estrutura e comportamento dos biofilmes (HEYDORN *et al.*, 2000, 2002). Após as células de fluxo tornarem-se disponíveis comercialmente, houve maior padronização nos estudos dos biofilmes (LENS *et al.*, 2003).

4 Material e Métodos

4.1 Considerações Gerais

Neste capítulo estão contidos o material e os métodos usados e a descrição dos procedimentos laboratoriais durante a fase experimental deste trabalho.

Inicialmente foi desenvolvido o substrato sintético com o objetivo de simular algumas características dos efluentes de reatores anaeróbios do tipo UASB para pós-tratamento, tais como: a relação carbono/nitrogênio (C/N), alcalinidade e pH. A relação DQO/NTK foi mantida em média em 2,25 pela padronização do substrato sintético e a relação alcalinidade/NTK foi mantida em média em 6,5.

Foram determinadas as faixas de variação das taxas de carregamento e velocidades superficiais a serem empregadas. As vazões de alimentação das células de fluxo foram definidas levando em conta a área de crescimento do biofilme ($0,015 \text{ m}^2$) e a taxa de carregamento máxima definida pela NBR 12.209 para Elaboração de Projetos Hidráulico-Sanitários de Estações de Tratamento de Esgoto da ABNT, que determina: taxa de carregamento $\leq 1,5 \text{ g N.m}^{-2}$ de biofilme. As vazões de recirculação foram definidas levando-se em conta a área transversal ($0,000375 \text{ m}^2$) e a faixa de variação típica de velocidades superficiais em reatores de filme fixo (de $0,7$ a 10 m.h^{-1}).

Após a definição das faixas de variação das taxas de carregamento e das velocidades superficiais, iniciou-se o período de coleta dos lodos de inóculo e a operação propriamente dita das células de fluxo.

Foram feitos dois pré-testes e três fases de operação (Tabelas 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1- Taxas de carregamento e velocidades superficiais dos pré-testes

Pré-testes	Taxa de Carregamento (g N.m⁻² biofilme.dia)	Velocidade Superficial (m.h⁻¹)
I	1,5	1
II	0,5	8

Tabela 4.2- Taxas de carregamento e velocidades superficiais das operações

Operações	Taxa de Carregamento (g N.m⁻² biofilme.dia)	Velocidade Superficial (m.h⁻¹)
		1
Fase I	0,5	4
		8
		1
Fase II	1,0	4
		8
		1
Fase III	0,25	4
		8

4.2 Substrato Sintético

Usando como base o substrato sintético simulando esgoto sanitário desenvolvido por Torres (1992) (Tabela 4.3) foi desenvolvido um substrato sintético com algumas características semelhantes às características dos efluentes de UASB do estudo feito por Campos et al. (2007) (Tabela 4.4).

Tabela 4.3- Composição do substrato sintético simulando esgoto sanitário

Fração Orgânica	Porcentagem da DQO	Composto Orgânico	
Proteínas	50%	Extrato de carne	
Carboidratos	40%	Sacarose	20%
		Amido Comercial	60%
		Celulose	20%
Lipídios	10%	Óleo de soja	

Fonte: Torres (1992)

Do substrato inicial desenvolvido por Torres (1992) foram mantidos os componentes sacarose e amido como fontes de carboidrato e os componente óleo de soja como fonte de lipídeo. Alguns parâmetros químicos como pH, alcalinidade total, DQO, NTK, N-amoniacal e sulfetos foram monitorados durante o desenvolvimento do substrato para que estes se adaptassem a faixa média encontrada nos efluentes dos reatores UASB obtidos no estudo feito por Campos (2007) no período de um ano na ETE de Piçarrão em Campinas-SP (Tabela 4.4).

Tabela 4.4- Resultados médios dos principais parâmetros físico-químicos de operação no período de Fevereiro/2006 até Janeiro/2007 levantados na ETE de Piçarrão-Campinas/SP.

Efluente do UASB de 3 módulos	
Variável	Resultado (média)
pH	7,3 – 7,8
Alcalinidade Total (mg. $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	271
P Total (mg P- $\text{PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$)	4,84
$\text{DBO}_{5,20}$ (mg. L^{-1})	72
DQO (mg. L^{-1})	184
N-amoniacal (mg NH_3 - N. L^{-1})	37,1
NTK (mg N. L^{-1})	39
NO_3^- - N (mg NO_3^- - N. L^{-1})	ND
NO_2^- - N (mg NO_2^- - N. L^{-1})	ND
Sulfetos (mg $\text{S}^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$)	3,34

Fonte: adaptado de Campos et al. (2007)

*ND: não detectado

A fim de simular algumas características do efluente anaeróbio de reator UASB para o pós-tratamento com biofilme nitrificante, substituiu-se a fonte de nitrogênio orgânica pela fonte de nitrogênio inorgânica presente no NH_4Cl e foi adicionado ácido acético, normalmente presente em efluentes de UASB. Foi também adicionada alcalinidade na forma de NaHCO_3 . O procedimento para preparo do substrato está descrito a seguir:

Foram medidas quantidades dos componentes orgânicos que permitissem compor um substrato sintético com DQO média de $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabela 4.5);

Foram medidas quantidades de NH_4Cl e NaHCO_3 necessárias para compor um substrato sintético com NTK médio de $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e alcalinidade a bicarbonato média de $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabela 4.5).

Tabela 4.5- Quantidades de componentes orgânicos e inorgânicos presentes no substrato

Composto Orgânico/Inorgânico	Quantidade (mg.L ⁻¹)
Sacarose	30
Amido	30
Óleo de soja	12,75*
NH ₄ Cl	125
NHCO ₃	445
Ácido acético	22,05

*quantidade da ordem de 1 gota

Todos os componentes foram misturados em béquer de vidro contendo 1L de água de abastecimento, sob agitação e aquecimento (40±5°C).

Além dos componentes citados, o substrato foi enriquecido com soluções de sais minerais segundo Torres (1996), com algumas modificações que visaram atingir as faixas encontradas no efluente de UASB (CAMPOS et al., 2007) (Tabela 4.6).

Tabela 4.6- Soluções de sais minerais acrescentadas ao substrato sintético

Sal	Concentração (g(100mL) ⁻¹)	Volume da solução estoque (mL.L ⁻¹)
SOLUÇÃO 1		
K ₂ HPO ₄	0,6	3,75
SOLUÇÃO 2		
KH ₂ PO ₄	0,6	17,35
NaCl	1,2	
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,16	
SOLUÇÃO 3		
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,0	5
SOLUÇÃO 4*		
Na ₂ S	0,78	1

Fonte: Adaptado de Torres (1992)

*Calculado estequiometricamente para simular valores de sulfetos presentes em efluente de UASB

4.3 Coleta e caracterização do lodo de inóculo

Foi escolhido o lodo de inóculo da ETE das Flores em Rio Claro-SP, devido a sua rica população de bactérias nitrificantes, já confirmada em trabalhos anteriores (DANIEL, 2005; IAMAMOTO, 2006). A coleta foi feita na entrada da recirculação do lodo adivindo do decantador secundário (Figura 4.1) e apresentou sempre valores de OD próximos a zero e pH em torno de 7,0.

Figura 4.1. Esquema da ETE das Flores mostrando ponto de coleta do lodo de inóculo

Foram efetuadas três coletas ao todo, a primeira para os pré-testes e a Fase I e as outras duas antes do início da Fase II e III, respectivamente. O lodo coletado era mantido sob aeração contínua, em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, pH entre 6,5 e 7,5, alcalinidade $> 80 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e alimentado com 0,03 a 0,06 Kg N-amoniaca/ KgSSV.dia. A caracterização do lodo foi feita mediante análise de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Sólidos Voláteis Totais (SVT), de acordo com procedimentos descritos pelo Standard Methods (2005). Também foram feitas a estimativa do número de bactérias nitrificantes pelo método do Número Mais Provável (NMP) adaptado para amostras líquidas por Gianotti (1994) e análises microscópicas.

4.4 Instalação experimental

Os reatores usados para o crescimento do biofilme foram de confecção própria do laboratório e foram construídos de forma a facilitar as análises

microscópicas e com microssensores. Estes são constituídos de um canal aberto de base lisa de policarbonato com 2,5 cm de largura, 4,0 cm de profundidade, 34,5 cm de comprimento e possuem volume útil de 150 mL (Figura 4.2).

Figura 4.2. Reator tipo célula de fluxo utilizado para o crescimento do biofilme e estudo com microssensores (medida em cm)

Foi usado como afluente o substrato sintético simulando efluente de UASB já descrito anteriormente. O substrato, em temperatura ambiente do laboratório ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), foi bombeado com vazão constante, para a entrada das células por bomba peristáltica Minipuls 3 da marca Gilson. Na saída do reator, parte do efluente era descartada e parte era recirculada, continuamente por bomba peristáltica Minipuls 3 da marca Gilson. A aeração foi feita mediante bomba típica para aeração de aquários pela entrada na tampa, que permitia que a pedra porosa atingisse até o fundo do líquido afluente. Nas entradas de ar foram instalados filtros Acrodisc com $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro da marca Nalgene.

O esquema da célula de fluxo acoplada ao sistema de aplicação de microssensores encontra-se na Figura 4.3.

Figura 4.3. Esquema do sistema experimental com uma célula de fluxo.

1-Picoamperímetro; 2-Computador; 3-*driver* do servo-motor; 4-compressor de ar (Big Air®-A420); 5- microscópio invertido (Olympus®-IX51) integrado com câmera digital (Samsung®-SDC-313); 6-célula de fluxo; 7-microsensor; 8-servo-motor e micromanipulador; 9-bomba peristáltica; 10-substrato sintético; 11-bomba peristáltica

As mangueiras de silicone usadas na alimentação e recirculação foram autoclavadas a 1 atm e 120°C por 15 minutos e as células de fluxo foram esterilizadas com água clorada 0,02% por duas horas. Após esse período, as células permaneceram com água destilada recirculando por no mínimo 6 horas para eliminar todos os resíduos de cloro do sistema. O lodo foi inoculado, recirculado por aproximadamente cinco horas e depois removido do sistema. Após o período de inóculo, iniciou-se a alimentação com substrato sintético.

Foram colocadas três células de fluxo em paralelo para as operações das Fases I, II e III (Figura 4.4). Estas foram alimentadas com o mesmo substrato sintético por uma única bomba peristáltica multicanal e com taxa de carregamento controlada. A recirculação contínua foi feita por bomba peristáltica individual para cada célula.

Figura 4.4. Foto da instalação experimental

4.5 Análises físico-químicas

O monitoramento dos reatores era realizado diariamente, por um período de cinco a nove dias, mediante análises físico-químicas com o objetivo de acompanhar a eficiência na remoção de nitrogênio pelo biofilme nitrificante.

As análises físico-químicas foram realizadas segundo os procedimentos do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) no Laboratório de Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP). A Tabela 4.7 mostra o tipo de análise realizada, a frequência e o método utilizado.

Tabela 4.7- Frequência das análises e métodos utilizados

Parâmetro	Pontos de amostragem	Frequência	Método
pH	entrada e saída	3 vezes/semana	Potenciométrico
OD	biofilme e meio líquido	diário	Microsensor
Alcalinidade	entrada e saída	3 vezes/semana	Titulométrico
DQO total	entrada e saída	semanal	Espectofotométrico
NTK	entrada e saída	3 vezes/semana	Espectofotométrico
Nitrito	entrada e saída	diário	Espectofotométrico
Nitrato	entrada e saída	diário	Espectofotométrico

4.6 Análises com microssensores

As atividades de construção, calibração e aplicação dos microssensores foram realizadas no Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Águas (LATAR) do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP como parte da dissertação da mestranda Beatriz Cruz Gonzalez, com participação essencial do técnico especializado Antonio Wagner Lamon, que possui treinamento no *Center for Biofilm Engineering* - CBE da Universidade de Montana/USA. As atividades de seleção dos equipamentos necessários para a confecção dos eletrodos, a montagem da sala para receber tais equipamentos e para servir de núcleo de estudo de biofilmes com microssensores foram executadas pelo referido técnico.

Foram desenvolvidos o microssensor amperométrico de oxigênio dissolvido e os microssensores potenciométricos de pH, amônia e nitrato. O microssensor para OD foi empregado anteriormente em outras pesquisas no SHS-EESC-USP (SIMAN, 2007). A descrição detalhada da confecção e calibração dos microssensores encontra-se em Gonzalez (2009). Neste trabalho serão apresentados apenas os perfis de OD, pertinente para a discussão dos resultados das análises físico-químicas e microbiológicas.

4.6.1 Construção e calibração do microssensor de OD

Os microeletrodos eletromecânicos de OD foram feitos com base nos estudos de Revsbech e Jorgensen (1986) e Revsbech (1989), entretanto o protocolo de construção deste foi modificado pelo técnico especializado Antônio Wagner Lamon.

Por serem microssensores amperométricos do “Tipo Clark”, estes foram constituídos de um eletrodo de referência de Ag/AgCl (anodo), um eletrodo de trabalho de fio de platina com bulbo de ouro (catodo), membrana de silicone permeável ao oxigênio e eletrólito interno, inseridos em um compartimento externo (Figura 4.5).

Figura 4.5. Fotografia microscópica (aumento de 100 X) do microsensor de OD

Para a calibração dos microsensores amperométricos de OD foram necessários apenas dois pontos, uma vez que a curva de calibração do mesmo é linear. Assim os microeletrodos foram introduzidos alternadamente em ambientes com água saturada com ar e com nitrogênio (LEWANDOWSKI; BEYENAL, 2003).

4.7 Monitoramento microbiológico

4.7.1 Introdução

As amostras para caracterização microbiológica foram coletadas com o uso de pipeta de Pauster da base das células de fluxo (biofilme aderido) e examinadas no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP) com auxílio da Dra. Eloisa Pozzi. Foram feitos ensaios de NMP para bactérias nitrificantes do biofilme aderido as células de fluxo ao final de cada operação.

4.7.2 NMP de Bactérias Nitrificantes

As amostras do lodo de inóculo e do biofilme aderido nas células de fluxo foram homogeneizadas, submetidas ao método de diluição em série e em seguida usadas no ensaio para estimativa de bactérias oxidantes de amônia e oxidantes de nitrito. O método empregado é o descrito por Focht & Joseph (1973), modificado Tiedje (1982) e adaptado para amostras líquidas (GIANOTTI, 1994).

4.7.2.1 Diluição em Série

Foram inoculados 2 mL de amostra nos tubos com 18 mL de água de diluição até a diluição 10^{-7} . O preparo da água de diluição e o procedimento de diluição em série estão descritos a seguir:

- **Água de diluição:**

Foram misturados 2 mL de solução de K_2HPO_4 e 0,5 mL de solução de KH_2PO_4 em béquer;

Foram adicionados 500 mL de Água Milli-Q;

Foram distribuídos 18 mL em tubos de ensaio com tampões de algodão;

Os tubos foram esterilizados em autoclave por 15 minutos sob pressão de 1 atm e temperatura de 120°C.

- **Procedimento:**

Sob ambiente de assepsia (próximo ao bico de Bunsen), foram feitas as diluições necessárias, seguindo o procedimento:

Foram adicionados 2 mL de amostra em um tubo de ensaio com 18 mL de água de diluição, que foi homogeneizado em vórtex e preparada a diluição 10^{-1} ;

Foram retirados 2 mL desse tubo e adicionado a outro tubo contendo água de diluição estéril, obtendo-se assim a diluição 10^{-2} . O procedimento foi repetido até a diluição 10^{-7} .

4.7.2.2 Bactérias Oxidantes de Amônia

Após a diluição em série, os tubos com as amostras de biofilme diluídas foram submetidos aos ensaios para estimativa de número de bactérias oxidantes de amônia. O preparo do meio de cultura, procedimento de inoculação, preparo das soluções-teste e leitura dos resultados estão descritos a seguir.

- **Preparo do meio de cultura:**

Foram adicionadas as soluções estoques listadas na Tabela 4.8, completando o volume com Água Milli-Q em béquer de vidro.

Foram adicionados 125 mg de NH_4Cl (concentração igual a do substrato sintético). O pH foi ajustado na faixa de 7,2 a 7,5 com Na_2CO_3 .

Tabela 4.8- Soluções estoque para o preparo do meio de cultura para as bactérias oxidantes de amônia

Composto químico	Concentração $\text{g}(100\text{mL})^{-1}$	Volume da solução estoque $\text{mL}(\text{Lmeio})^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,34	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,0	1,0
Azul de Bromotimol	0,04	1,0
KH_2PO_4	2,72	7,5
Ferro quelante		1,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,246	
EDTA dissódio	0,331	
Elementos traço		1,0
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01	
MnCl_2	0,02	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0002	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002	

Fonte: Adaptado de Mendonça (2002)

- **Procedimento:**

Foram adicionados 9 mL do meio de cultura em cada tubo de ensaio, repetindo esse procedimento 5 vezes para cada diluição;

Foram adicionadas quantidades mínimas de CaCO_3 em cada tubo, para tamponar a solução;

Os tubos foram fechados com tampões de algodão e esterilizados em autoclave, por 15 minutos, sob pressão de 1 atm e temperatura de 120°C.

- **Inoculação da amostra:**

Foi adicionado 1 mL da amostra previamente diluída aos tubos contendo meio de cultura estéril em ambiente asséptico;

O procedimento foi repetido para cada diluição (10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} e 10^{-7} para a amostra do lodo e 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} e 10^{-6} para as amostras de biofilme das células de fluxo);

Os tubos foram incubados a $(30 \pm 2)^\circ \text{C}$ por sete dias.

- **Soluções-teste:**

Solução 1: foi dissolvido 0,5 g de sulfanilamida em 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 2,4N. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração.

Solução 2: foi dissolvido 0,3 g de N-naftil-etilenodiamina hidrocloreto em 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,12N. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração.

- **Análise de resultados:**

Após o período de incubação, foram retiradas 5 mL das amostras diluídas nos tubos com meio específico e colocadas em tubos menores. Foram adicionados 1 gota da solução 1 e 1 gota da solução 2 nos tubos menores.

A coloração rosa escuro a vermelho indica a presença de nitrito na amostra (resultado positivo para presença de bactérias oxidantes de amônia). A ausência de cor é considerada resultado negativo para presença de bactérias oxidantes de amônia.

A estimativa da população de bactérias nitrificantes foi feita considerando-se a combinação das respostas positivas na tabela padrão de probabilidade, segundo Alexander (1982).

4.7.2.3 Bactérias Oxidantes de Nitrito

Após a diluição em série, os tubos com as amostras de biofilme diluídas foram submetidos aos ensaios para estimativa de número de bactérias oxidantes de nitrito. O preparo do meio de cultura, procedimento de inoculação, preparo das soluções-teste e leitura dos resultados estão descritos a seguir.

- **Preparo do meio de cultura:**

Foram adicionadas as soluções estoques listadas na Tabela 4.9, completando o volume com Água Milli-Q em béquer de vidro. O procedimento para distribuição do meio nos tubos está descrito no item 4.7.2.2.

Tabela 4.9- Soluções estoque para o preparo do meio de cultura para as bactérias oxidantes de nitrito

Solução Estoque	Concentração g(100mL)⁻¹	Volume da solução estoque mL(Lmeio)⁻¹
NaNO ₂	0,69	1,0
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,34	1,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	4,0	5,0
K ₂ HPO ₄	3,48	4,0
KH ₂ PO ₄	2,72	1,0
Ferro quelante		1,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,246	
EDTA dissódio	0,331	
Elementos traço		1,0
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,01	
MnCl ₂	0,02	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0002	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,002	

Fonte: Schimdt & Belser (1984)

- **Inoculação da amostra:**

Foi adicionado 1 mL da amostra previamente diluída aos tubos contendo meio de cultura estéril em ambiente asséptico.

O procedimento foi repetido para cada diluição (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para a amostra do lodo e 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} para as amostras de biofilme das células de fluxo). Os tubos foram incubados a $30 \pm 2^\circ \text{C}$ por quinze dias.

- **Soluções-teste:**

Solução 1: foi dissolvido 0,5 g de sulfanilamida em 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 2,4N. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração.

Solução 2: foi dissolvido 0,3 g de N-naftil-etilenodiamina hidrocloreto em 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,12N. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração.

- **Análise do resultado:**

Após o período de incubação, foram retiradas 5 mL das amostras diluídas nos tubos com meio específico e colocadas em tubos menores. Foram adicionados 1 gota da solução 1 e 1 gota da solução 2 nos tubos menores.

A ausência de cor indica a ausência de nitrito na amostra (resultado positivo para presença de bactérias oxidantes de nitrito). A coloração rosa escuro a vermelho é considerada resultado negativo para presença de bactérias oxidantes de nitrito.

A estimativa da população de bactérias nitrificantes oxidantes de nitrito foi feita considerando-se a combinação das respostas positivas na tabela padrão de probabilidade, segundo Alexander (1982).

4.7.3 Microscopia Óptica

Análises microscópicas foram feitas para a observação das condições do lodo de incóculo e da formação do biofilme nitrificante ao longo da operação do sistema. Foi usado o microscópio Olympus BX60 no Laboratório de

Processos Biológicos da EESC-USP, para fotografias com aumento de 1500 X do lodo de inóculo e de amostras do biofilme aderido às células de fluxo. Para as fotografias *in situ* do biofilme, com aumento de até 400 X, foi usado o microscópio invertido Olympus IX51 acoplado ao sistema, no Laboratório de Microsensores da EESC-USP.

5 Resultados e Discussão

5.1 Considerações Iniciais

Nesse capítulo serão apresentados os resultados e a discussão do monitoramento físico-químico e microbiológico dos sistemas nas fases iniciais de teste e nas fases I, II e III e de seus respectivos lodos de inóculos. As tabelas com os dados físico-químicos mostrados sob a forma de gráficos encontram-se em anexo.

5.2 Caracterização do lodo de inóculo

Após a coleta do lodo, feita antes do início de cada fase, foram feitos ensaios para a estimativa da comunidade nitrificante e série de sólidos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1- Características do lodo de inóculo das fases I, II e III

	Bactérias oxidantes de amônia	Bactérias oxidantes de nitrito				
	NMP(mgSSV) ⁻¹	NMP(mgSSV) ⁻¹	SSV mg(mL) ⁻¹	SSF mg(mL) ⁻¹	SST mg(mL) ⁻¹	SV/ST
FASE I	9,85E+03	7,07E+02	11,17	2,55	13,75	0,81
FASE II	2,02E+04	3,95E+02	10,89	3,35	14,24	0,76
FASE III	3,38E+03	7,21E+01	6,80	2,14	8,94	0,71

Também foram feitas análises microscópicas a fim de se observar a diversidade microbiana e as condições do lodo de inóculo. Nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 encontram-se as fotos de microscopia de contraste de fase e aumento de 200X e 1000X dos lodos de inóculo das fases I, II e III.

Os lodos de inóculo das Fases I, II e III apresentaram população de bactérias oxidantes de nitrito (da ordem de 10^1 a 10^2 NMP(mgSSV)⁻¹ inferior a população de bactérias oxidantes de amônia (da ordem de 10^3 a 10^4 NMP(mgSSV)⁻¹). As razões SV/ST maiores que 0,6, indicam elevada quantidade de matéria orgânica, característica favorável ao uso desses lodos em sistemas de tratamento biológico (MENDONÇA, 2002).

Figura 5.1. Imagem de microscopia de contraste de fase do lodo de inóculo da fase I

Figura 5.2. Imagens de microscopia de contraste de fase do lodo de inóculo da fase II

Figura 5.3. Imagens de microscopia de contraste de fase do lodo de inóculo da fase III

Todos os lodos de inóculo apresentavam boas condições, com a presença de protozoários ciliados: *Litonotus sp.* (Figura 5.1a), *Paramecium sp.* (Figura 5.2a) e *Aspidisca sp.* (Figura 5.3a), que são considerados indicadores de tratamentos eficientes (BERK & GUNDERSON, 1993). Também continham poucas bactérias filamentosas (responsáveis pelo fenômeno de entumescimento do lodo), e bacilos semelhantes à *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (Figuras 5.1b; 5.2b e 5.3b).

5.3 Acompanhamento microscópico do desenvolvimento do biofilme

Durante os pré-testes I e II foram feitas fotos de imagens microscópicas do biofilme aderido à base da célula de fluxo, com o objetivo de verificar a aderência do biofilme ao meio suporte e o desenvolvimento deste durante o tempo de operação da célula (Figuras 5.4; 5.5; 5.6 e 5.7) (aumento de 200x).

Figura 5.4. Fotomicrografia do biofilme com 24h de desenvolvimento

Figura 5.5. Fotomicrografia do biofilme com 29h de desenvolvimento

Nas Figuras 5.4 e 5.5 observa-se que com apenas cinco horas de diferença, o biofilme aderido na superfície da célula de fluxo tornou-se mais espesso e a comunidade microbiana tornou-se mais diversificada, com a presença de protozoários flagelados (indicados pelas setas pretas).

Figura 5.6. Fotomicrografia do biofilme com 2 dias de desenvolvimento

Figura 5.7. Fotomicrografia do biofilme com 3 dias de desenvolvimento

Nas Figuras 5.6 e 5.7 observa-se que com um dia de diferença no crescimento do biofilme aderido, este apresenta-se mais denso e com agregados maiores. Conclui-se, então, que o meio suporte de vidro é adequado para a aderência e desenvolvimento do biofilme.

5.4 Definição do tempo de operação do sistema

O tempo de operação do sistema foi definido com base nos perfis de OD feitos nos pré-testes I e II. Nos perfis a seguir, a superfície do biofilme situa-se na profundidade zero e os valores negativos de profundidade referem-se ao meio líquido.

• Pré-teste I

Nas Figuras 5.8 e 5.9 estão os perfis de OD do 1º ao 5º dias de operação do Pré-teste I.

Figura 5.8. Perfil de OD do biofilme no 1º, 2º, 3º e 4º dia de operação (Taxa= 1,5 g N m⁻² biofilme.dia, $V_{superf} = 1 \text{ m.h}^{-1}$, $T^{\circ} = (25 \pm 2) ^{\circ}\text{C}$)

Figura 5.9. Perfil de OD do biofilme no 5º dia de operação (Taxa= $1,5 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$, $v_{\text{superf}} = 1 \text{ m.h}^{-1}$, $T^\circ = (25 \pm 2)^\circ \text{C}$)

Observa-se nos perfis de OD das Figuras 5.8, que a espessura do biofilme aumenta de $2500 \mu\text{m}$ no 1º dia a $4500 \mu\text{m}$ no 3º dia de operação e decai a $3000 \mu\text{m}$ no 5º dia de operação, devido ao desprendimento do biofilme do meio suporte.

Na Figura 5.10 constam imagens de fotomicrografias, com 200 X de aumento, do biofilme aderido a base da célula de fluxo no 1º, 2º, 3º e 4º dias de operação.

Figura 5.10. Fotomicrografia do biofilme aderido do 1º, 2º, 3º e 4º dia de operação (Taxa= $1,5 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$, $v_{\text{superf}} = 1 \text{ m.h}^{-1}$, $T^\circ = (25 \pm 2)^\circ \text{C}$)

Aparentemente, devido a relativa alta taxa de carregamento empregada, o biofilme tornou-se espesso (Figura 5.10) e com baixas concentrações de OD (Figura 5.8) logo nos primeiros dias de operação e desprende-se do meio suporte no 3º dia (Figura 5.10), ocasionando assim concentrações altas de OD (na faixa de 6,0 a 7,0 mg.L⁻¹) até o 5º dia de operação pela manhã (Figura 5.9). No 5º dia de operação, foi verificado pelo segundo perfil de OD feito no dia (na parte da tarde) que o biofilme tornou a apresentar concentrações de OD mais baixas, o que indica que o ciclo de formação do biofilme recomeçou e ele tornou-se mais denso novamente. Segundo Araujo (2001) não se conhecem explicações claras para o desprendimento de grandes quantidades do biofilme, que pode ser devido a uma combinação de fatores particulares de cada sistema. O desprendimento provavelmente está relacionado com a ocorrência de atividade anaeróbia na região interna do biofilme aeróbio muito espesso; devido às limitações de transferência de oxigênio, camadas profundas tornam-se anaeróbias e produzem ácidos voláteis, baixando o pH e produzindo gases insolúveis, que encontram dificuldades para migrar para o exterior e enfraquecem a estrutura do biofilme.

• Pré-teste II

A taxa de carregamento aplicada neste caso foi menor que no Pré-teste I, a fim de evitar o desprendimento do biofilme da base da célula de fluxo. Nas Figuras 5.11 e 5.12 e 5.13 estão expostos os perfis de OD feitos no 1º ao 9º dia de operação.

Figura 5.11. Perfis de OD do 1º e 2º dia de operação do Pré-teste II (Taxa= 0,5 g N m⁻² biofilme.dia, v_{superf} = 8 m.h⁻¹, T°= (25±2) °C)

Figura 5.12. Perfis de OD do 3º e 4º dia de operação do Pré-teste II
(Taxa= $0,5 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$, $v_{\text{superf}} = 8 \text{ m.h}^{-1}$, $T^\circ = (25 \pm 2)^\circ \text{C}$)

Figura 5.13. Perfis de OD do 5º ao 9º dia de operação do Pré-teste II
(Taxa= $0,5 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$, $v_{\text{superf}} = 8 \text{ m.h}^{-1}$, $T^\circ = (25 \pm 2)^\circ \text{C}$)

Os perfis mostram concentrações decrescentes de OD no sentido da base do biofilme conforme esse vai se tornando mais espesso ao longo da operação, iniciando em concentrações próximas a 7 mg.L^{-1} (semelhantes as do meio líquido) nos primeiros dias de operação até concentrações próximas a 1 mg.L^{-1} no último dia de operação. Na Figura 5.13 estão apresentados valores de OD próximos a 1 mg.L^{-1} no 9º dia de operação do sistema. Como as bactérias nitrificantes são aeróbias e necessitam de OD para oxidar o nitrogênio amoniacal a nitrito e nitrato, definiu-se o tempo máximo de operação do sistema em nove dias.

Pode-se notar uma grande variação da espessura dos biofilmes entre os perfis. Nota-se que no 1º dia de operação o biofilme apresentou espessura de $750 \mu\text{m}$; no 3º dia, $300 \mu\text{m}$; no 6º dia, $1250 \mu\text{m}$ e no 8º dia, $1000 \mu\text{m}$. Essa variação é devida ao crescimento não uniforme desse sobre o meio suporte, formando agregados mais “grossos” e outros mais “finos”, onde eram inseridos os microsensores. No modelo heterogêneo “water-channel” proposto por Costerton et al. (1995), o biofilme é formado por uma série de aglomerados não uniformes, com formato de cones e cogumelos, penetrados por canais vazios que permitem o transporte de massa. Portanto, dependendo de onde o microsensor é inserido, em um aglomerado ou em um espaço vazio, verifica-se diferentes espessuras.

5.5 Remoção de Nitrogênio

Foram operadas 3 células de fluxo em paralelo durante três fases a fim de verificar as taxas de carregamento e velocidades superficiais mais adequadas para a remoção de nitrogênio pelo biofilme nitrificante. As Fases I, II e III foram operadas a temperatura ambiente média de $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$, aeração contínua, OD na faixa de $6,0$ a $7,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (vide Item 5.4) na fase líquida e relação DQO/NTK do afluente em média de 2,25.

5.5.1 Fase I

Nas Figuras 5.14, 5.15, 5.16 e 5.17 estão representadas as concentrações de NTK, nitrito, nitrato e alcalinidade durante a operação do sistema na Fase I.

Figura 5.14. Concentração de NTK nas amostras do afluente e dos efluentes das células de fluxo na Fase I, Taxa= $0,5 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$ e $T^\circ = (25 \pm 2)^\circ \text{C}$ (♦: 1 m.h^{-1} , ▲: 4 m.h^{-1} , ■: 8 m.h^{-1} , ●: afluente)

Na Figura 5.14 observa-se que houve aumento da concentração de NTK no início da operação do sistema, em relação a concentração do afluente, o que pode ser devido ao excesso de biomassa presente no inóculo e à fase de adaptação dos microrganismos ao meio suporte. Após o 3º dia de operação, a microbiota adaptada intensificou a remoção de NTK.

Figura 5.15. Concentração de nitrito nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase I, Taxa= 0,5 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (◆:1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

Figura 5.16. Concentração de nitrato nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase I, Taxa= 0,5 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (◆:1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

Conforme pode ser observado nas Figuras 5.14; 5.15 e 5.16, as concentrações de NTK diminuíram no decorrer da operação do sistema e houve produção de nitrato e nitrito, sendo que as concentrações de nitrito produzidas foram maiores que as de nitrato. O processo de nitrificação pode ter sido interrompido após a etapa de oxidação de amônia devido ao curto período

de operação do sistema, impossibilitando assim o crescimento adequado das bactérias oxidantes de nitrito, cujo tempo de replicação celular é maior do que as oxidantes de amônia. O menor tempo de replicação celular medido em laboratório foi de 7 horas para *Nitrosomonas* e 10 horas para *Nitrobacter* (BOCK et al., 1990). A remoção de nitrogênio também pode ser inferida em decorrência da queda na alcalinidade mostrada na Figura 5.17.

Figura 5.17. Concentração da alcalinidade nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase I, Taxa= 0,5 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (◆: 1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹, ●: afluente)

A eficiência do reator foi estimada considerando-se as formas de nitrogênio: nitrito, nitrato e NTK, no afluente e no efluente e alcalinidade consumida. Nas Figuras 5.18 e 5.19 estão apresentados os valores de eficiência de remoção de nitrogênio e consumo de alcalinidade ao longo do período de operação da Fase I.

Figura 5.18. Eficiência de Remoção de NTK do biofilme nitrificante das células de fluxo na Fase I, Taxa= 0,5 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (♦: 1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

Pode-se observar na Figura 5.18 que a remoção de NTK foi maior na célula com velocidade de 8 m.h⁻¹ no fim da operação do sistema (chegando a 72% no 7º dia de operação). Esse fato pode ser atribuído à maior velocidade superficial, a qual pode ter resultado em maior retenção celular das bactérias nitrificantes no sistema e maior taxa de transferência de massa do(s) substrato(s) no interior do biofilme. Han & Ong (2007) obtiveram, com 200 a 300% de taxa de recirculação, no mínimo 75% de remoção de NTK. Seus resultados mostraram que a remoção de NTK e de nitrato aumenta, a medida que aumenta a taxa de recirculação.

Figura 5.19. Consumo de alcalinidade nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase I Taxa= 0,5 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (♦: 1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

A alcalinidade média do afluente foi de 260 ± 10 mg CaCO₃. L⁻¹, proveniente do bicarbonato de potássio presente no meio de alimentação. Considerando que, no caso, o bicarbonato constitui a única fonte de carbono para incorporação celular, o consumo de alcalinidade indica o consumo de carbono inorgânico, o qual pode ser relacionado ao crescimento da biomassa nitrificante (KIELING, 2004).

5.5.2 Fase II

Nas Figuras 5.20; 5.21 e 5.22 apresentam-se os resultados referentes às concentrações de NTK, nitrito, e alcalinidade durante a operação do sistema na Fase II.

Figura 5.20. Concentração de NTK nas amostras do afluente e dos efluentes das células de fluxo na Fase II, Taxa= $1,0 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$ e $T^{\circ} = (25 \pm 2) ^{\circ}\text{C}$ ($\blacklozenge$: 1 m.h^{-1} , $\blacktriangle$: 4 m.h^{-1} , $\blacksquare$: 8 m.h^{-1} , $\bullet$: afluente).

Na Figura 5.20 nota-se que houve acúmulo de NTK na célula com velocidade de 8 m.h^{-1} e ligeiro aumento na célula com velocidade de 4 m.h^{-1} nos primeiros dias de operação. Após o período inicial de adaptação, as concentrações de NTK permaneceram próximas às concentrações do afluente e houve pouca produção de nitrito, chegando apenas a concentrações próximas de 2 mg. L^{-1} (Figura 5.21), o que indica pouca atividade nitrificante.

Figura 5.21. Concentração de nitrito nas amostras de efluentes das células de fluxo na fase II, Taxa= $1,0 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$ e $T^{\circ} = (25 \pm 2) ^{\circ}\text{C}$ ($\blacklozenge$: 1 m.h^{-1} , $\blacktriangle$: 4 m.h^{-1} , $\blacksquare$: 8 m.h^{-1}).

Figura 5.22. Concentração da alcalinidade nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase II, Taxa= 1,0 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (◆: 1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹, ●: afluente)

Não foi detectada a produção de nitrato nessa fase da operação. Segundo Villaverde *et al.* (2004), o acúmulo de nitrito ocorre principalmente durante a partida do reator, devido ao crescimento mais lento dos organismos oxidantes de nitrito, comparado ao crescimento das bactérias oxidantes de nitrogênio amoniacal.

Nas Figuras 5.23 e 5.24 encontra-se os valores de eficiência de remoção de nitrogênio e consumo de alcalinidade ao longo do período de operação.

Figura 5.23. Eficiência de Remoção de NTK no biofilme nitrificante das células de fluxo na Fase II, Taxa= 1,0 g N m⁻² biofilme.dia e T°= 25±2 °C (◆: 1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

Figura 5.24. Consumo de alcalinidade nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase II, Taxa= 1,0 g N m⁻² biofilme.dia e T°= 25±2 °C (♦: 1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

Apesar de ter havido consumo de alcalinidade, a remoção máxima de NTK chegou a apenas 51% na célula com velocidade de 1 m.h⁻¹, sendo menor ainda nas outras células com velocidades menores. Essa remoção deve ter ocorrido devido a conversão do nitrito, formado pela oxidação da amônia, diretamente a nitrogênio gasoso pelas bactérias desnitrificantes. Essa suposição pode ser feita devido ao baixo número de bactérias oxidantes de nitrito (≈ 100 células.mL⁻¹) presentes no biofilme das células de fluxo, comparado ao número de bactérias oxidantes de amônia ($\approx 10^4$ células.mL⁻¹). Parte do nitrogênio também pode ter sido removido pela incorporação à biomassa (TORRES, 2002) ou pelo fenômeno de *stripping*.

5.5.3 Fase III

Nas Figuras, 5.25; 5.26; 5.27 e 5.28 constam as variações das concentrações de NTK, nitrito, nitrato e alcalinidade durante a operação do sistema na Fase III.

Figura 5.25. Concentração de NTK nas amostras do afluente e dos efluentes das células de fluxo na, Fase III, Taxa= $0,25 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$ e $T^{\circ} = (25 \pm 2) ^{\circ}\text{C}$ ($\blacklozenge$: 1 m.h^{-1} , $\blacktriangle$: 4 m.h^{-1} , $\blacksquare$: 8 m.h^{-1} , $\bullet$: afluente)

As concentrações de NTK no efluente das células de fluxo permaneceram baixas desde o início da operação, comparadas com as do afluente. chegando a próximas de zero na célula com velocidade superficial de 1 m.h^{-1} (Figura 5.25).

Figura 5.26. Concentração de nitrito nas amostras de efluentes das células de fluxo na fase III, Taxa= $0,25 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$ e $T^{\circ} = (25 \pm 2) ^{\circ}\text{C}$ ($\blacklozenge$: 1 m.h^{-1} , $\blacktriangle$: 4 m.h^{-1} , $\blacksquare$: 8 m.h^{-1})

Figura 5.27. Concentração de nitrato nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase III, Taxa= 0,25 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (♦:1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

Houve produção de nitrito e de nitrato nas células desde o início da operação, confirmando assim a atividade nitrificante no biofilme, porém nem todo NTK consumido foi oxidado a nitrito ou nitrato. Uma parte do NTK presente no afluente pode ter sido assimilada pela biomassa ou oxidada a nitrito e nitrato e posteriormente levada a nitrogênio gasoso pelas bactérias desnitrificantes. Um dos fatores que pode ter influenciado o acúmulo de nitrito foi a ineficiência na transferência de oxigênio do meio líquido para interior do biofilme, levando o aparecimento de uma camada com baixas concentrações de OD, provocando o fenômeno de nitrificação e desnitrificação em um mesmo biofilme .

Figura 5.28. Concentração da alcalinidade nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase III, Taxa= 0,25 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (◆:1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹, ●: afluente)

Nas Figuras 5.29 e 5.30, estão os gráficos com os valores de eficiência de remoção de nitrogênio e consumo de alcalinidade ao longo do período de operação.

O consumo de alcalinidade diminui no final da operação, assim como a produção de nitrito (Figura 5.25), o que pode indicar diminuição na atividade das bactérias nitrificantes e talvez a competição de outro grupo de bactérias mais tolerantes as baixas concentrações de OD presentes.

Figura 5.29. Eficiência de Remoção de NTK do biofilme nitrificante das células de fluxo na Fase III, Taxa= 0,25 g N m⁻² biofilme.dia e T°= (25±2) °C (◆:1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

As eficiências de remoção de NTK mantiveram-se altas, entre 80 e 100% na célula com menor velocidade superficial. Iniciou em 60% na célula com velocidade superficial intermediária e aumentou, entre 80 e 90%, no decorrer da operação. Na célula com maior velocidade superficial, a eficiência de remoção de NTK começou em 60%, diminuiu para próximo a 20% e aumentou no final da operação, ficando em torno de 80%.

Figura 5.30. Consumo de alcalinidade nas amostras de efluentes das células de fluxo na Fase III, Taxa= 0,25 g N m⁻² biofilme.dia e T°= 25±2 °C (◆: 1 m.h⁻¹, ▲: 4 m.h⁻¹, ■: 8 m.h⁻¹)

O consumo de alcalinidade aumentou com o tempo de operação do sistema, apresentando apenas um leve declínio no fim da operação das células com velocidades superficiais de 4 e 8 m.h⁻¹.

5.6 Oxigênio Dissolvido (OD)

O monitoramento do OD foi feito mediante perfis de microsensores, medindo-se tanto as concentrações do meio líquido como as concentrações no interior do biofilme. Perfis de OD em biofilmes mostram tipicamente declínios nas concentrações à medida que o microeletrodo progride do fluido circundante até o interior do biofilme, chegando às camadas mais profundas. As menores concentrações de OD nas camadas mais profundas do biofilme podem ser

explicadas porque este é constantemente consumido pelas células nas camadas superiores do biofilme. O balanço dinâmico entre o consumo e a difusão determina a concentração local do oxigênio (STEWART & FRANKLIN, 2008).

Nos gráficos encontram-se os perfis de OD feitos no biofilme das três células de fluxo em cada dia da operação. As medições de OD eram feitas pelos microsensores até esses atingirem o fundo de cada célula, o que era indicado pela quebra da ponta do microsensor. Os perfis apresentam diferença de comprimento, pois os biofilmes aderidos apresentavam diferentes espessuras durante a medição, portanto o último dado medido em cada perfil significa necessariamente o término do biofilme, junto a base da célula de fluxo.

Nas Figuras 5.31, 5.32 e 5.33 estão representados os perfis de OD feitos no início e final da operação das células de fluxo das fases I, II e III.

Figura 5.31. Perfis de OD do início e final da operação da Fase I, Taxa= $0,5 \text{ g N m}^{-2}$ biofilme.dia e $T^\circ = (25 \pm 2)^\circ \text{C}$ (■: 1 m.h^{-1} , ▲: 4 m.h^{-1} , ◆: 8 m.h^{-1})

O perfil de OD do início da operação mostra que as concentrações de OD no biofilme das células um e três, com velocidades superficiais de 1 m.h^{-1} e 4 m.h^{-1} respectivamente, apresentaram concentrações altas de OD tanto no meio líquido como no interior do biofilme, o que pode ser devido a pouca espessura do biofilme, comparado com o da célula dois (velocidade superficial de 8 m.h^{-1}), a qual apresenta um gradiente de concentração de OD na faixa de $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ a $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Ao final da operação, todas as células apresentam concentrações de OD no interior do biofilme menores do que no início (de $1,0$ a $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$).

Figura 5.32. Perfis de OD do início e final da operação da Fase II, Taxa= $1,0 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$ e $T^\circ = (25 \pm 2)^\circ \text{C}$ (■: 1 m.h^{-1} , ▲: 4 m.h^{-1} , ◆: 8 m.h^{-1})

As concentrações de OD no início da operação encontram-se entre $6,0$ a $7,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no meio líquido e decrescem gradualmente à medida que o microsensor atinge camadas mais profundas do biofilme. As concentrações de OD chegam a valores próximos a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na célula 1, a $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na célula 2 e a $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ na célula 3. No final da operação, mesmo com as concentrações de OD permanecendo altas no líquido, no interior do biofilme, elas atingem valores próximos a 0 mg.L^{-1} nas células 1 e 3, e valores próximos a $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ na célula 2.

Figura 5.33. Perfis de OD do início e final da operação da Fase III, Taxa= $0,25 \text{ g N m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$ e $T^\circ = (25 \pm 2)^\circ \text{C}$ (■: 1 m.h^{-1} , ▲: 4 m.h^{-1} , ◆: 8 m.h^{-1})

Os perfis de OD do início da operação apresentam concentrações de OD próximas a $7,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na fase líquida e entre $5,0$ e $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no fundo do

biofilme. No final da operação, as concentrações de OD no fundo dos biofilmes das células 1 e 2 encontram-se próximas a $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$, porém na célula 3, as concentrações de OD permanecem altas, na faixa de 6,0 a 7,0, mesmo no interior do biofilme. Essa célula também apresentou elevado número de bactérias oxidantes de nitrito, porém o número de oxidantes de amônia permaneceu baixo (vide Item 5.8). Park et al. (2008), estudando a influência das concentrações de OD na população de bactérias oxidantes de amônia e de nitrito, verificaram que maiores concentrações de OD (na faixa de 5 mg.L^{-1}) resultam em maior número de bactérias oxidantes de nitrito porém essas concentrações de OD não influenciam diretamente o número de bactérias oxidantes de amônia, apenas a atividade dessas.

5.7 pH

As Tabelas 5.2; 5.3 e 5.4 apresentam os valores de pH medidos nas amostras do afluente e dos efluentes das células de fluxo ao longo das operações das Fases I, II e III.

Tabela 5.2- Valores de pH do afluente e dos efluentes das células na Fase I (Taxa= $0,5 \text{ g N.m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$)

Dia de Operação	célula 1 (1 m.h⁻¹)	célula 2 (8 m.h⁻¹)	célula 3 (4 m.h⁻¹)	afluente
1	7,2	7,3	7,4	7,1
3	7,8	7,9	7,8	7,8
5	7,0	6,9	7,1	7,0
7	6,9	6,9	7,0	7,2

Os valores de pH variaram na faixa de 7,0 a 7,8 para o afluente e de 6,9 a 7,8 para o efluente da célula 1, de 6,9 a 7,9 para o efluente da célula 2 e de 7,0 a 7,8 para o efluente da célula 3.

Tabela 5.3- Valores de pH do afluente e dos efluentes das células na Fase II ($Q_{\text{carreg}}=1,0 \text{ g N.m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$)

Dia de Operação	célula 1 (1 m.h⁻¹)	célula 2 (8 m.h⁻¹)	célula 3 (4 m.h⁻¹)	afluente
2	7,4	7,3	7,3	7,9
4	7,3	7,1	7,2	7,7
6	7,0	7,0	7,2	7,0

Os valores de pH variaram na faixa de 7,0 a 7,9 para o afluente e de 7,0 a 7,4 para o efluente da célula 1, de 7,0 a 7,3 para o efluente da célula 2 e de 7,2 a 7,3 para o efluente da célula 3.

Tabela 5.4- Valores de pH dos efluentes das células na Fase III ($Q_{\text{carreg}}=0,25 \text{ g N.m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$)

Dia de Operação	célula 1 (1 m.h⁻¹)	célula 2 (8 m.h⁻¹)	célula 3 (4 m.h⁻¹)	afluente
1	7,3	7,9	7,5	7,3
3	8,0	7,4	8,2	7,4
5	8,0	7,7	7,9	7,0
7	7,7	7,8	7,6	7,3
9	7,8	7,5	7,8	7,3

Os valores de pH variaram na faixa de 7,0 a 7,4 para o afluente e de 7,3 a 8,0 para o efluente da célula 1, de 7,4 a 7,9 para o efluente da célula 2 e de 7,5 a 8,2 para o efluente da célula 3.

O comportamento do pH, tanto no afluente como nos efluentes das células não sofreu variações bruscas a ponto de comprometer o processo de nitrificação, permanecendo dentro da faixa de pH “ótimo” de 7,0 a 9,0 para a nitrificação.

5.8 Monitoramento microbiológico

As estimativas do NMP das bactérias nitrificantes oxidantes de amônia e de nitrito são apresentadas nas Figuras 5.34 e 5.35.

Figura 5.34. Estimativa de bactérias nitrificantes oxidantes de amônia no lodo de inóculo e nas fases: ■ I (Taxa_{carreg} = 0,5), ■ II (Taxa_{carreg} = 1,0) e ■ III (Taxa_{carreg} = 0,25)

Observa-se que mesmo com maior número de bactérias oxidantes de amônia no lodo de inóculo, na Fase II, essas não se desenvolveram tão bem no biofilme das células de fluxo com velocidades superficiais de 1 e 8 m.h⁻¹. Esse fato pode ser devido à taxa de carregamento mais alta da Fase II (1,0 g N/m² biofilme.dia). O inóculo da Fase III apresentou número reduzido de bactérias oxidantes de amônia, porém esse número manteve-se estável nos biofilmes com velocidade superficial de 1 m.h⁻¹ e diminuiu nos de velocidades 4 e 8 m.h⁻¹. Resultado que está de acordo com as eficiência de remoção de NTK de cada célula, a qual atingiu próximo de 100% na célula com menor velocidade e 88% e 86% nas outras duas, respectivamente (vide item 5.5.3, Figura 5.29).

Figura 5.35. Estimativa de bactérias nitrificantes oxidantes de nitrito no lodo de inóculo e nas fases: ■ I (Taxa_{carreg}= 0,5), ■ II (Taxa_{carreg}=1,0) e ■ III (Taxa_{carreg}=0,25)

No caso da estimativa do número de bactérias oxidantes de nitrito, verificou-se que na Fase II, o crescimento foi baixo em todas as velocidades, o que pode ser comprovado pela ausência de produção de nitrato (vide Item 5.5.2). As bactérias oxidantes de nitrito tiveram crescimento considerável na célula com velocidade superficial de 4 m.h⁻¹ da Fase III, mesmo com número reduzido no inóculo. Uma possível explicação seriam as altas concentrações de OD detectadas no biofilme dessa célula pelo perfil (vide Item 5.6, Figura 5.33) mesmo no final da operação.

Verificou-se que os valores estimados das bactérias oxidantes de nitrito foram bem inferiores (da ordem de 10²) aos valores das bactérias oxidantes de amônia em todas as Fases (Figuras 5.34 e 5.35). Diversos estudos sobre a estimativa de bactérias nitrificantes tiveram resultados semelhantes (MENDONÇA, 2002; KIELING, 2004; DANIEL, 2005 e IAMAMOTO, 2006). Esses resultados podem ser devido ao fato de que a oxidação da amônia libera mais energia para o crescimento celular e a velocidade de crescimento de bactérias oxidantes de nitrito é menor do que a de oxidantes de amônia (a 35°C e TDH de 1 dia) (JETTEN et al., 2001)

As estimativas de bactérias nitrificantes oxidantes de nitrito de todas as amostras coletadas apresentavam valores muito baixos (chegando a ordem de 10² em vários casos). Esse fato foi comprovado pelas análises físico-químicas,

em que observou-se pouca produção de nitrato nas Fases I e III (vide item 5.5) ou em nenhuma produção, como ocorrido na Fase II.

5.9 Comparação das Fases I, II e III

Na Figura 5.36 apresentam-se de forma objetiva as eficiências das células de fluxo nas Fases I, II e III, de acordo com a taxa de carregamento e a velocidade superficial empregada.

Figura 5.36. Eficiências de remoção de NTK (porcentagem) em função da taxa de carregamento e velocidade superficial ($T^{\circ} = (25 \pm 2) ^{\circ}\text{C}$)

Observa-se na Figura 5.36, que as maiores eficiências de remoção de NTK foram obtidas com a menor taxa de carregamento ($0,25 \text{ g N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{biofilme} \cdot \text{dia}$), sendo que nesse caso, quanto menor a velocidade superficial, maior a taxa de remoção de NTK. No caso da taxa de carregamento intermediária de $0,5 \text{ g N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{biofilme} \cdot \text{dia}$, a velocidade superficial que apresentou melhor remoção de NTK foi a mais alta, de $8 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$. Opostamente, no sistema que foi operado com taxa de carregamento mais alta ($1,0 \text{ g N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{biofilme} \cdot \text{dia}$), a velocidade superficial que apresentou melhor remoção de NTK foi a mais baixa, de $1 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$.

biofilme.dia), a melhor eficiência de remoção foi observada com a menor velocidade superficial, de 1 m.h^{-1} .

A taxa de carregamento empregada que obteve melhor eficiência de remoção encontra-se abaixo das previstas na literatura para reatores de crescimento aderido usados para pós-tratamento com nitrificação terciária. MetCalf & Eddy (2003) propões a faixa de 0,5 a 2,5 g N-amoniaco. $\text{m}^{-2}.\text{dia}$ para filtros de percolação.

6 Conclusões

Com base nos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, pode-se concluir:

- i. Os reatores do tipo célula de fluxo mostraram-se eficientes para o estudo do desenvolvimento de biofilmes nitrificantes para tratamento de substrato sintético simulando efluente de UASB, permitindo o acompanhamento microscópico do crescimento dos mesmos no meio suporte; a retirada de amostras para análises microbiológicas e ofereceram possibilidades para o uso de microsensores;
- ii. Nas células de fluxo operadas com taxa de carregamento mais baixa ($0,25 \text{ g N.m}^{-2} \text{ biofilme.dia}$), foram obtidas as melhores eficiências de remoção de NTK, a qual representa valor menor que as taxas de carregamento empregadas na literatura para reatores de crescimento aderido usados na nitrificação terciária. Considerando as células de fluxo com taxa de carregamento mais baixa, a célula que apresentou remoção de NTK próxima a 100% foi àquela submetida a menor velocidade superficial (1 m.h^{-1}). Porém, esses sistemas tiveram maior produção de nitrito do que de nitrato, admitindo-se então concluir que poderiam ser usados na remoção de nitrogênio pela via curta. Além disso considerando-se o ambiente dentro do biofilme, com baixas concentrações de oxigênio, haveria condições para o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes;

- iii. Os microssensores de OD foram eficientes para as análises de perfis de OD no interior dos biofilmes nitrificantes, mostrando grandes variações, à medida que o biofilme se desenvolvia, nas concentrações de OD na fase líquida e no interior do biofilme;
- iv. O monitoramento microbiológico das células de fluxo no final da operação de cada fase mostrou que, apesar do biofilme apresentar maior população de bactérias oxidantes de amônia, estas podem não estar tão bem adaptadas as condições ambientais no interior do biofilme e podem apresentar baixa atividade nitrificante, como no caso da Fase III, em que a população de bactérias oxidantes estava em menor número (da ordem de 10^3 a 10^4 NMP.mL⁻¹) em comparação as Fases I e II (da ordem de 10^4 a 10^5) e, ainda assim, apresentaram maior eficiência de remoção de NTK.

7 Referências

ALEXANDER, M. (1982). Most probable number method for microbial populations. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. *Chemical and microbiological properties*. Wisconsin: American Society of Agronomy. p.815-830.

ARAÚJO, J.C. (1995). *Caracterização e evolução de biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético*. 158p. Dissertação (Mestrado) – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

_____. (2001). *Biofilmes anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando hibridação in situ com sondas fluorescentes*. 161p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1992). *NBR 12209*: Projeto de estações de tratamento de esgoto sanitário. Rio de Janeiro.

AZEVEDO N.F. et al. (2009). Time to "go large" on biofilm research: advantages of an omics approach. *Biotechnology Letters*, Kew, v.31, n.4, p.477-485, Apr.

BATHE, S. et al. (2004). High phylogenetic diversity of transconjugants carrying plasmid pJP4 in an activated sludge-derived microbial community. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.235, n.2, p.215–219, June.

BERK, G.S.; GUNDERSON, J.H. (1993). *Wastewater organisms: a color atlas*. Flórida: CRC Press.

BISHOP, P.L. (2007). The Role of biofilms in water reclamation and reuse. *Water Science & Technology*, London, v.55, n.1-2, p.19-26.

BOCK, E. et al. (1990). A New facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Archives of Microbiology*, Heidelberg, v.153, p.105–110, Jan.

BOTHE, H. et al. (2000). Molecular analysis of ammonia and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v.24, n.5, p.673-690, Dec.

CAMPOS, J.R. (1989). *Remoção de DQO e de nitrogênio em um sistema de três reatores biológicos de filme fixo em série*. 295p. Tese (Livre Docência) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1989.

CAMPOS, J.R. et al. (2007). A Wastewater treatment plant composed of UASB reactors, activated sludge with DAF and UV disinfection, in series. In: IWA SPECIALISED CONFERENCE ON DESIGN, OPERATION AND ECONOMICS OF LARGE WASTEWATER TREATMENT PLANTS, 10., 2007, Vienna. *Proceedings...* Vienna: [s.n.]. p.41-48.

DANIEL, L.M.C. (2005). *Remoção de nitrogênio via nitrito em reator em batelada seqüencial contendo biomassa imobilizada e aeração intermitente*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v.64, n.4, p.847-867, Dec.

DE BEER, D.; VAN DEN HEUVEL, J.C.; OTTENGRAF, S.P.P. (1993). Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.59, n.2, p.573-579, Feb.

DE BEER, D. et al. (1997). A Nitrite microsensor for profiling environmental biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.63, n.3, p.973-977, Mar.

DWORKING, M.; KAISER, D. (1985). Cell interactions in myxobacterial growth and development. *Science*, Washington, v.230, n.4721, p.18-24, Oct.

DUNSMORE, B. et al. (2006). Effects of nitrate treatment on a mixed species, oil field microbial biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v.33, n.6, p.454-462, June.

DUSANE, D.H. et al. (2008). Biofilm formation by a biotechnologically important tropical marine yeast isolate, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Water Science & Technology*, London, v.58, n.12, p.2467-2475.

EGLI, K. et al. (2003). Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.69, n.6, p.3213-3222, June.

FOCHT, D.D.; JOSEPH, H. (1973). An Improved methods for the enumeration of denitrifying bacteria. *Soil Science Society of America*, Madison, v.37, n.5, p.698-699, Sept.

GILLAM, D.E.; BISHOP, P.L.; LOVE, N.G. (2005). A Study of glutathione-gated potassium efflux in biofilms using potassium microelectrodes. *Environmental Engineering Science*, New Rochelle, v.22, n.4, p.489-495, July/Aug.

GIANOTTI, E.P. (1994). *Desnitrificação em uma lagoa marginal do Rio Mogi-Guaçu, Lagoa do Infernã (Estação Ecológica do Jataí – Luiz Antônio – SP)*. 298p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1994.

GODOY, T.G. (2007). *Biofiltro aerado submerso aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator UASB, sob condições hidráulicas desfavoráveis-estudo em escala real*. 177 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

GONZALEZ, B. C. (2009). *Construção de microssensores e sua aplicação para estudo de biofilme aplicado ao tratamento de água residuária*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

HA, J.H.; ONG, S.K. (2007). Nitrification and denitrification in partially aerated biological aerated filter (BAF) with dual size sand media. *Water Science & Technology*, London, v.55, n.1/2, p.9-17.

HEYDORN, A. et al. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, Reading, v.146, n.10, p.2395-2407, Oct.

_____. (2002). Statistical analyses of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, v.68, n.4, p.2008-2017, Apr.

HUNTER, R.C.; BEVERIDGE, T.J. (2005). High-resolution visualization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms by freeze-substitution transmission electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.187, n.22, p.7619-7630, Nov.

IAMAMOTO, Y.C. (2006). *Remoção de nitrogênio em reator em batelada seqüencial com biomassa suspensa tratando águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal*. 139p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

JACKSON, G. et al. (2001). Growing reproducible biofilms with respect to structure and viable cell counts. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v.47, n.1, p.1-10, Oct.

JETTEN, M.S.M. et al. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek: international journal of general molecular microbiology*, Deldrecht, v.71, n.1/2, p.75-93, Feb.

KIELING, D.D. (2004). *Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas*. 119 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

KINDAICHI, T.; ITO, T.; OKABE, S. (2004). Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.70, n.3, p.1641-1650, Mar.

KNAPP, C.W.; GRAHAM, D.W. (2007). Nitrite-oxidizing bacteria guild ecology associated with nitrification failure in a continuous-flow reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v.62, n.2, p.195-201, Nov.

KUHL, M.; JORGENSEN, B.B. (1992). Microsensor measure meets of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.58, n.4, p.1164-1174, Apr.

LAZAROVA, V.; MANEM, J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, New York, v.29, n.10, p.2227-2245, Oct.

LENS, P. et al. (2003). *Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology* – characteristics, analysis and control. London: IWA.

LEWANDOWSKI, Z.; BEYENAL, H. (2007). Introduction to biofilms and to biofilm research. In: _____. *Fundamentals of biofilm research*. London: CRC Press.

LEU, H.G.; OUYANG, C.F.; SU, J.L. (1995). Effects of flow velocity changes on nitrogen transport and conversion in an open channel flow. *Water Research*, New York, v.30, n.9, p.2065-2071, Sept.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (2004). *Microbiologia de Brock*. 10ªed. São Paulo: Pretice Hall.

METCALF; EDDY (2003). *Wastewater engineering treatment and reuse*. 4thed. Boston: McGraw-Hill.

MENDONÇA, L.C. (2002). *Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leite expandido*. 184p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

NEALSON, K.H.; HASTINGS, J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, Washington, v.43, n.4, p.495-518.

O'REILLY, E.; RODGERS, M.; ZHAN, X.M. (2008). Pumped flow biofilm reactors (PFBR) for treating municipal wastewater. *Water Science & Technology*, London, v.57, n.12, p.1857-1865.

PAREDES, D. et al. (2007). New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment-a review. *Engineering in Life Sciences*, Weinheim, v.7, n.1, p.13-25, Feb.

PARK, J.J. et al. (2008). Analysis of nitrifying bacterial communities in aerobic biofilm reactors with different DO conditions using molecular techniques. *Water Science & Technology*, London, v.57, n.12, p.1889-1899.

PENG, Y; ZHU, G.(2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.73, p.15-26, Oct.

REVSBECH, N.P. (1989). An Oxygen microelectrode with a guard cathode. *Limnology Oceanography*, Grafton, v.34, n.2, p.474-478, Mar.

SATOH, H. et al. (2005). Use of microelectrodes to investigate the effects of 2-chlorophenol on microbial activities in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.91, n.2, p.133-138, July.

SAUER, K. et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.184, n.4, p.1140-1154, Feb.

SHMIDT, E.L.; BELSER, L.W. (1984). Nitrifying bacteria. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. *Chemical and microbiological properties*. Wisconsin: American Society of Agronomy. p.1027-1042.

SHOJI, T.; OCHI, S.; OZAKI, M. (2008). Characterization of bacterial biofilm communities in tertiary treatment processes for wastewater reclamation and reuse. *Water Science & Technology*, London, v.58, n.5, p.1023-1030.

SIMAN, R.R. (2007). *Reator de leito expandido em escala plena com zonas anaeróbia e aeróbia sobrepostas: remoção conjunta de matéria orgânica e nutrientes e estudo do comportamento microbiológico do biofilme, por respirometria e microsensor de OD*. 254p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SINHA, B.; ANNACHHATRE, A.P. (2007). Partial nitrification – operational parameters and microorganisms involved. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, Berlin, v.6, n.4, p.285-313, Oct.

STANDARD methods for the examination of water and wastewater. (2005).

20thed. Washington: American public Health Association.

STOODLEY, P. et al. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.56, p.187-209, Oct.

STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, London, v.6, n.3, p.199-210, Mar.

TIEDJE, J.M. (1982). Denitrification. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. *Chemical and microbiological properties*. Wisconsin: American Society of Agronomy. p.815-830.

TORRES, P. (1992). *Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários*. 185 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de engenharia de São Carlos, universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

VILLAVERDE, S. (2004). Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, Berlim, v.3, n.2, p.171-183, June.

WOLFAARDT, G.M. et al. (1998). In Situ characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microbial Ecology*, New York, v.35, n.3, p.213-223, May.

WHANG, L.M. et al. (2008). Microbial ecology and performance of nitrifying bacteria in a aerobic membrane bioreactor treating thin-film transistor liquid crystal display wastewater. *Water Science & Technology*, London, v.58, n.12, p.2365-2371.

WUERTZ, S.; OKABE, S.; HAUSNER, M. (2004). Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. *Water Science & Technology*, London, v.49, n.11/12, p.327-336.

XAVIER, J.B. et al. (2004). Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, n.76, p.2-13, dez.

ZHANG, T.C.; BISHOP, P.L. (1996). Evaluation of substrate and pH effects in a nitrifying biofilms. *Water Environment Research*, Alexandria, v.68, n.7, p.1107-1115, Nov./Dec.

Apêndice

Apêndice A– Valores do monitoramento físico-químico e microbiológico da Fases I, II e III

Tabela A. 1- Valores das concentrações de NTK, NO_2^- e NO_3^- no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase I

Dia de Operação	Afluente*	Efluente célula 1 ($v_{\text{superf.}} = 1 \text{ m.h}^{-1}$)			Efluente célula 2 ($v_{\text{superf.}} = 8 \text{ m.h}^{-1}$)			Efluente célula 3 ($v_{\text{superf.}} = 4 \text{ m.h}^{-1}$)		
	NTK (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- (mg.L^{-1})
1	38,0	86,0	2,0	1,0	121,0	2,9	0,2	107,0	2,7	0,2
2	41,0	67,0	2,8	0,0	67,0	4,9	0,0	52,0	4,7	0,2
3	40,0	31,0	7,1	1,3	38,0	9,4	1,1	34,0	7,4	0,3
5	-	-	9,9	-	-	13,2	-	-	10,0	-
6	33,0	17,0	14,3	2,0	22,3	11,2	3,8	17,3	13,3	1,8
7	36,0	16,0	13,5	4,7	10,0	11,3	3,7	22,3	10,0	9,1

* O afluente não apresentou valores significativos de concentrações de NO_2^- e NO_3^-

-: Não medido

Tabela A. 2- Valores das concentrações de alcalinidade no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase I

Dia de Operação	Afluente	Efluente célula 1 ($v_{\text{superf.}} = 1 \text{ m.h}^{-1}$)	Efluente célula 2 ($v_{\text{superf.}} = 8 \text{ m.h}^{-1}$)	Efluente célula 3 ($v_{\text{superf.}} = 4 \text{ m.h}^{-1}$)
	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)
1	249	125	127	154
3	247	209	176	215
5	251	73	68	88
7	256	96	83	87

Tabela A. 3- Valores das concentrações de NTK, NO_2^- e NO_3^- no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase II

Dia de Operação	Afluente*	Efluente célula 1 ($v_{\text{superf.}} = 1 \text{ m.h}^{-1}$)			Efluente célula 2 ($v_{\text{superf.}} = 8 \text{ m.h}^{-1}$)			Efluente célula 3 ($v_{\text{superf.}} = 4 \text{ m.h}^{-1}$)		
	NTK (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- ** (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- ** (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- ** (mg.L^{-1})
2	35,0	17,1	0,1	-	88,3	0,3	-	39,0	0,1	-
3	-	-	0,1	-	-	0,4	-	-	0,1	-
5	38,0	41,3	0,1	-	22,9	0,5	-	39,0	0,5	-
6	41,0	37,8	1,0	-	24,0	0,8	-	26,3	1,1	-
7	37,0	30,9	1,9	-	32,0	1,5	-	33,2	1,9	-

* O afluente não apresentou valores significativos de concentrações de NO_2^- e NO_3^-

** Os efluentes não apresentaram valores significativos de concentrações de NO_3^-

-: Não medido ou não detectado

Tabela A. 4- Valores das concentrações de alcalinidade no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase II

Dia de Operação	Afluente	Efluente célula 1 ($v_{\text{superf.}} = 1 \text{ m.h}^{-1}$)	Efluente célula 2 ($v_{\text{superf.}} = 8 \text{ m.h}^{-1}$)	Efluente célula 3 ($v_{\text{superf.}} = 4 \text{ m.h}^{-1}$)
	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)
2	252,0	135,7	128,4	136,1
4	250,0	127,8	126,3	130,7
6	270,0	138,0	61,6	82,2

Tabela A. 5- Valores das concentrações de NTK, NO_2^- e NO_3^- no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase III

Dia de Operação	Afluente*	Efluente célula 1 ($v_{\text{superf.}} = 1 \text{ m.h}^{-1}$)			Efluente célula 2 ($v_{\text{superf.}} = 8 \text{ m.h}^{-1}$)			Efluente célula 3 ($v_{\text{superf.}} = 4 \text{ m.h}^{-1}$)		
	NTK (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- (mg.L^{-1})	NTK (mg.L^{-1})	NO_2^- (mg.L^{-1})	NO_3^- (mg.L^{-1})
1	38,0	-	1,0	0,6	16,0	2,2	3,9	16,0	3,6	2,0
3	34,0	3,4	6,4	-	25,3	9,5	1,4	5,7	6,4	1,3
6	40,0	5,7	23,0	-	5,7	28,0	-	5,7	26,4	-
7	37,0	6,8	15,9	5,2	5,7	20,0	11,2	4,5	24,0	4,8
9	36,0	-	15,5	-	5,7	10,9	-	6,8	22,7	-

* O afluente não apresentou valores significativos de concentrações de NO_2^- e NO_3^-

-: Não detectado

Tabela A. 6- Valores das concentrações de alcalinidade no afluente e nos efluentes das células de fluxo na Fase III

Dia de Operação	Afluente	Efluente célula 1 ($v_{\text{superf.}} = 1 \text{ m.h}^{-1}$)	Efluente célula 2 ($v_{\text{superf.}} = 8 \text{ m.h}^{-1}$)	Efluente célula 3 ($v_{\text{superf.}} = 4 \text{ m.h}^{-1}$)
	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	Alcalinidade (mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)
1	249	214	226	182
3	247	171	86	175
5	272	135	82	103
7	257	99	88	97
9	256	87	128	115

Tabela A. 7- Valores da estimativa da população de bactérias nitrificantes nas Fases I,II e III

	FASE I		FASE II		FASE III	
	Oxidantes de Amônia (NMP.mL ⁻¹)	Oxidantes de Nitrito (NMP.mL ⁻¹)	Oxidantes de Amônia (NMP.mL ⁻¹)	Oxidantes de Nitrito (NMP.mL ⁻¹)	Oxidantes de Amônia (NMP.mL ⁻¹)	Oxidantes de Nitrito (NMP.mL ⁻¹)
Lodo de inóculo	1,10E+05	7,90E+03	2,20E+05	4,30E+03	2,30E+04	4,90E+02
Célula 1 (v _{superf} = 1 m.h ⁻¹)	1,30E+05	1,30E+04	4,60E+04	2,30E+02	2,20E+04	9,50E+02
Célula 2 (v _{superf} = 8 m.h ⁻¹)	3,30E+04	5,60E+03	3,30E+04	2,30E+02	1,10E+04	1,80E+04
Célula 3 (v _{superf} = 4 m.h ⁻¹)	4,90E+04	1,20E+04	3,30E+04	7,90E+02	4,90E+03	3,30E+02