UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

RAFAEL BRITO DE MOURA

Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente.

VERSÃO CORRIGIDA

SÃO CARLOS, SP
2014

RAFAEL BRITO DE MOURA

Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente.

"Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento"

Orientador: Prof. Dr. Eugenio Foresti

SÃO CARLOS, SP
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

M929r Moura, Rafael Brito de
Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto
sanitário em reator de leito estruturado submetido à
aeração intermitente e recirculação do efluente /
Rafael Brito de Moura; orientador Eugenio Foresti. São
Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2014.

1. Remoção de matéria orgânica e nitrogênio. 2.
Reator de leito estruturado . 3. Aeração intermitente.
4. Nitrificação e desnitrificação simultânea. 5. Esgoto
sanitário. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **RAFAEL BRITO DE MOURA.**

Título da tese: "Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente".

Data da defesa: 10/10/2014

Comissão Julgadora:

Prof. Titular **Eugenio Foresti (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Dr. **Erich Kellner**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Prof. Dr. **Carlos Augusto de Lemos Chernicharo**
(Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)

Prof. Dr. **Marcelo Loureiro Garcia**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP – Rio Claro)

Profa. Dra. **Ana Cláudia Barana**
(Universidade de Ponta Grossa/UEPG)

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Resultado:

APROVADO

APROVADO

Aprovado

APROVADO

APROVADO

Dedico este trabalho à minha família

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela vida.

Aos meus pais, por todo o ensinamento transmitido. Por sempre ter confiado em mim e por me apoiar em diversas decisões em minha vida. Agradeço também por sempre terem sido exemplo a ser seguido.

Ao professor Eugenio Foresti, que é um grande exemplo tanto na área acadêmica quanto em sua vida pessoal. Agradeço muito a confiança depositada em mim desde o começo.

Ao meu irmão, pelo apoio e incentivo para que tudo isso se tornasse possível.

À minha esposa Lóren pela paciência e confiança em mim. Agradeço muito a Deus por Ele ter colocado você na minha vida. Agradeço também a seus pais pela confiança sempre depositada em mim.

À professora Márcia Damianovic pelos ensinamentos desde meu mestrado, passando pelo doutorado e continuando agora na minha vida acadêmica.

Aos professores Marcelo Zaiat e Maria Bernadete pelos ensinamentos dentro e fora das disciplinas cursadas.

Aos alunos de iniciação científica Thadeu e Rafael, pela ajuda na operação do reator nos períodos que eu não estive em São Carlos. Sou muito grato por tudo que vocês fizeram por mim.

À amiga Carla Diniz e ao amigo Dagoberto, que também foram peças fundamentais para que fosse possível o término do meu doutorado. Sem a ajuda de vocês, talvez eu não estivesse com esse trabalho finalizado. Ao meu amigo Tiago Martins pelas partidas de tênis e pelos incansáveis ensaios cinéticos realizados.

Aos amigos do LPB Eduardo (Dú), Carol, Mariana, Adriana, Theo, Bruna, Davi, Djalma, Lívia, Mara Rúbia, Paulo, Rachel, Felipe, Lênin, Daniel, Juliana e Fabrício. Agradeço também ao amigo compadre Tiago Palladino e a amiga comadre Priscila pelas horas de muita alegria que passamos juntos.

Às técnicas Carol, Elô, Janja e Isabel. Agradeço pelo auxílio em todas as análises.

Aos meus amigos de Poços de Caldas, Tiezzi, Maicon e Rogério, pela paciência ao me ouvir dizer centenas de vezes que eu precisava terminar o doutorado.

Ao meu primo Henrique, o qual dividia apartamento comigo, por ter me ajudado a resolver algumas integrais da vida.

RESUMO

MOURA, R. B. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente.** 2014, 130 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o desempenho de um reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI) na remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário. O reator apresentava um volume total de 11,6 L, com uma porosidade do leito de 52%. O leito estruturado era composto de 13 estruturas cilíndricas (diâmetro igual a 3 cm) de espuma de poliuretano, dispostas verticalmente no interior do reator. A alimentação do reator era feita continuamente com esgoto sanitário, sendo este proveniente de um interceptor de esgoto que passava próximo ao laboratório onde o sistema foi montado. O reator era provido de sistema de recirculação interna, com razão de recirculação igual a 3, valor este adotado após a realização de ensaios hidrodinâmicos. Foram testadas 4 condições operacionais diferentes, variando-se o tempo de detenção hidráulica (TDH) e os períodos de aeração e não aeração. Para cada condição operacional, foram feitos os seguintes estudos: avaliação da eficiência de remoção de matéria orgânica e nitrogênio, determinação da atividade nitrificante e desnitrificante, determinação do número mais provável (NMP) da comunidade nitrificante e desnitrificante, perfis temporais e análise da comunidade microbiana. O sistema apresentou elevada remoção de N-total, com valores médios de 80% para valores de TDH de 12 e 10 horas, sob 2 horas de aeração e 1 hora sem aeração. Com a diminuição do TDH para 8 horas, houve queda na eficiência do sistema para 70% (mantendo-se os períodos de aeração de 2 horas e não aeração de 1 hora). Alterando-se o período de aeração para 3 horas, mantendo-se em 1 hora o período sem aeração, o reator apresentou eficiência média de remoção de N-total de 79% com o TDH de 8 horas. A remoção de DQO foi elevada em todas as fases, com valores médios em torno de 90%. Os resultados da atividade nitrificante e desnitrificante foram condizentes com valores encontrados na literatura para sistemas que operam com remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio. Os perfis temporais mostraram que não houve variação nas formas de nitrogênio (N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^-) no efluente, apesar da operação sob a aeração intermitente devido ao grau de mistura imposto pela recirculação interna. A concentração de sólidos no efluente foi relativamente baixa quando comparada à concentração de efluentes de reatores de biomassa suspensa, com valor máximo de SSV igual a 108 mgSSV.L^{-1} . A presença do Metazoário *Aelosomas sp* no efluente do reator indica um possível consumo do lodo excedente no reator por esses microrganismos. As análises microbiológicas mostraram uma elevada abundância relativa de gêneros aeróbios facultativos, capazes de utilizar N-NO_3^- e N-NO_2^- como receptor de elétrons na ausência de oxigênio. Também se verificou a presença do gênero *Comamonas sp* em elevada abundância relativa. Esse gênero apresenta microrganismos capazes de realizar a nitrificação heterotrófica e a desnitrificação aeróbia. No entanto, os ensaios realizados não permitem inferir sobre a ocorrência desses processos. Desse modo, os processos convencionais de nitrificação e desnitrificação, tanto pela estratificação do biofilme devido à formação de gradiente de concentração de oxigênio dissolvido, quanto devido à aeração intermitente, certamente tiveram papel preponderante na remoção de nitrogênio. Os resultados obtidos permitem considerar o reator LEAI como uma alternativa tecnicamente viável para a remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio de esgotos sanitários.

Palavras-chave: Remoção de matéria orgânica e nitrogênio. Reator de leito estruturado. Aeração intermitente. Nitrificação e desnitrificação simultânea. Esgoto sanitário.

ABSTRACT

MOURA, R. B. **Simultaneous carbon and nitrogen removal from sewage in a structured bed biofilm reactor subjected to intermittent aeration and effluent recirculation**. 2014, 130 f. Thesis (Doctoral) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

This study aimed at evaluating the organic matter and nitrogen removal from sewage in a structured bed reactor subjected to intermittent aeration. The reactor had a total volume of 11.6 L and bed porosity of 52%. Thirteen polyurethane foam cylinders of 3 cm diameter and 60 cm height were fixed vertically inside the reactor using PVC rods. The reactor was continuously fed with sewage collected from a sanitary sewer passing near the laboratory where the system was assembled. The reactor was provided with internal recirculation system with a recirculation ratio at 3, a value adopted after conducting hydrodynamic tests. Four different operating conditions were tested, varying the hydraulic retention time (HRT) and aeration and non-aeration periods. Nitrogen and organic matter removal efficiencies, nitrifying and denitrifying activities, and the most probable number (MPN) of nitrifying and denitrifying communities were evaluated for each operational condition. The reactor presented a Total-N removal efficiency of 80%, at HRT of 12 hours and 10 hours and aerated and non-aerated periods of 2 hours and 1 hour, respectively. With decreasing the HRT to 8 hours, the Total-N removal efficiency decreased to 70% for the same aeration and non-aeration periods. After increasing the aerated period to 3 hours and keeping the non-aerated periods of 1 hour and HRT of 8 hours, the system attained the Total-N removal efficiency of 79%. COD removal efficiencies were about 90% in all operational condition. Nitrifying and denitrifying activities were similar to those found in the literature for systems presenting simultaneous nitrification and denitrification, and carbon removal. No variation in nitrogen forms (NO_3^- -N, NO_2^- -N and NH_4^+ -N) was observed during a cycle of intermittent aeration. The solids concentration in effluent was relatively low compared to the concentration of suspended-growth biomass reactors, with a maximum value of VSS of 108 mgVSS.L^{-1} . The presence of the metazoan *Aelosomas sp* in the effluent in all operational conditions indicated a possible use of the excess sludge in the reactor by these microorganisms. Microbiological analysis showed a high relative abundance of aerobic/facultative microorganisms, capable to use N-NO_3^- -N and NO_2^- -N as electron acceptor in the absence of oxygen. It was also verified the presence of the genus *Comamonas sp* with high relative abundance. This genus presents microorganisms able to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. However, the assays do not allow us to infer the occurrence of these processes. Thus, the conventional processes of nitrification and denitrification certainly played a preponderant role in nitrogen removal both by the stratification of the biofilm due to the formation of a concentration gradient of dissolved oxygen, as due to the intermittent aeration. The results allow considering the reactor as a viable technological alternative for the simultaneous removal of organic matter and nitrogen of sewage.

Keywords: Nitrogen and carbon removal. Intermittent aeration. Simultaneous nitrification and denitrification. Sewage. Structured bed biofilm reactor

Lista de Figuras

Figura 3.1 - Estados de oxidação do nitrogênio (WEF, 2010).....	7
Figura 3.2 - Estrutura no interior de um biofilme. Fonte: He <i>et al.</i> , (2009).	13
Figura 4.1 - Fluxograma do experimento.....	21
Figura 4.2 - Representação do reator de leito estruturado e aeração intermitente (LEAI).	23
Figura 4.3 - Esquema do sistema em escala de bancada. Fonte: adaptado de Moura <i>et al.</i> (2012).	23
Figura 4.4 - Reator montado com o sistema para manter a temperatura.	24
Figura 4.5 - Montagem da estrutura cilíndrica de espuma de poliuretano.....	26
Figura 4.6 - Método de retirada e corte da biomassa da espuma para os ensaios cinéticos.....	30
Figura 4.7 - Reatores em batelada preparados para início do ensaio cinético.	31
Figura 4.8 - Ilustração da leitura de NMP para bactérias nitrificantes.	35
Figura 4.9 - Parte interna e externa da espuma utilizada na caracterização microbiana durante a Fase II.....	36
Figura 5.1 - Resultados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos.	43
Figura 5.2 - Curvas referentes à distribuição do tempo de residência nos ensaios hidrodinâmicos para.....	44
Figura 5.3 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total na fase de adaptação.....	47
Figura 5.4 - Eficiência de remoção de N-total (■), concentração de N-total afluente (▲) e N-total efluente (●) durante todas as fases.	48
Figura 5.5 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a.....	49
Figura 5.6 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a.....	50
Figura 5.7 - Variação da concentração de NTK (◆), N-NO_3^- (■) e N-NO_2^- (▲) no efluente durante as Fases I-a e 50	50
Figura 5.8 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a.....	51
Figura 5.9 - Variação da concentração de NTK (◆), N-NO_3^- (■) e N-NO_2^- (▲) no efluente durante a Fase II.....	52
Figura 5.10 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a.....	53
Figura 5.11 - Variação da concentração de NTK (◆), N-NO_3^- (■) e N-NO_2^- (▲) no efluente durante a Fase III.....	53
Figura 5.12 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a.....	54
Figura 5.13 - Variação da concentração de NTK (◆), N-NO_3^- (■) e N-NO_2^- (▲) no efluente durante a Fase IV.	55

Figura 5.14 - Box-plot da eficiência de remoção de N-total em cada fase.	58
Figura 5.15 - Eficiência de remoção de DQO (■), concentração de DQO afluente (▲) e DQO efluente (●) durante todas as fases.	60
Figura 5.16 - Box-plot da eficiência de remoção de DQO em cada fase.	62
Figura 5.17 - Perfis dos ensaios cinéticos. (1) Ensaio nitrificante via N- NH_4^+ - Fase I-a; (2) Ensaio nitrificante via N- NO_2^- - Fase I-a; (3) Ensaio desnitrificante - Fase I-a; (4) Ensaio nitrificante via N- NH_4^+ - Fase II; (5) Ensaio nitrificante via N- NO_2^- - Fase II; (6) Ensaio desnitrificante - Fase II; (7) Ensaio nitrificante via N- NH_4^+ - Fase III; (8) Ensaio nitrificante via N- NO_2^- - Fase III; (9) Ensaio desnitrificante - Fase III; (10) Ensaio nitrificante via N- NH_4^+ - Fase IV; (11) Ensaio nitrificante via N- NO_2^- - Fase IV; (12) Ensaio desnitrificante - Fase IV; N- NH_4^+ (▲), N- NO_2^- (◆) e N- NO_3^- (■).	68
Figura 5.18 - Perfis temporais durante a Fase I -a, Fase II, Fase III e Fase IV. N- NH_4^+ (▲), N- NO_2^- (◆), N- NO_3^- (■) e OD (●).	72
Figura 5.19 - Microscopia realizada do Metazoário <i>Aelosoma sp</i> presente no efluente do reator.	75
Figura 5.20 - Relação entre concentração de N- NH_4^+ efluente e a alcalinidade efluente durante a operação do reator.	77
Figura 5.21 - Curva de rarefação definidas para nível de similaridade de 97% nas amostras referentes a Fase I-a, IV, espuma interna e espuma externa.	80
Figura 5.22 - Abundância relativa de filos com similaridade de 97% nas Fases I-a e IV.	82
Figura 5.23 - Abundância relativa de filos com similaridade de 97% nas espuma externa e interna.	83
Figura 5.24 - Abundância relativa das classes com similaridade de 97% nas Fases I-a e IV.	85
Figura 5.25 - Abundância relativa das classes com similaridade de 97% na espuma interna e externa.	85
Figura 5.26 - Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra de biomassa da Fase I-a.	86
Figura 5.27 - Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra de biomassa da Fase IV.	89
Figura 5.28 - Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra de biomassa na parte interna da espuma.	92
Figura 5.29 - Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra de biomassa na parte externa da espuma.	94

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 - Característica do esgoto sanitário.	25
Tabela 4.2 - Característica da espuma de poliuretano (Adaptado NOCKO, 2008).	26
Tabela 4.3 - Análises físico-químicas que foram realizadas.	27
Tabela 4.4 - Soluções traço e de macronutrientes adicionados nos ensaios cinéticos.	32
Tabela 4.5 - Meios de cultura utilizados nos ensaios de bactérias nitrificantes.	34
Tabela 5.1 - Vazão em cada condição operacional.	46
Tabela 5.2 - Concentração média dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção de nitrogênio total em cada fase.	55
Tabela 5.3 - Comparação entre as eficiências médias de remoção de N-total para cada fase.	59
Tabela 5.4 - Concentração média de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção de DQO nas fases.	61
Tabela 5.5 - Comparação entre as eficiências médias de remoção de DQO para cada fase.	63
Tabela 5.6 - Concentração média afluente e efluente de $P-PO_4^{-3}$	63
Tabela 5.7 - Parâmetros cinéticos em cada fase de operação.	66
Tabela 5.8 - Resultados do ensaio de número mais provável em todas as fases.	69
Tabela 5.9 - Valores de sólidos nas fases estudadas. ST - sólidos totais, STV - sólidos totais voláteis, STF - sólidos totais fixos, SST - sólidos suspensos totais, SSV - sólidos suspensos voláteis, SSF - sólidos suspensos fixos.	73
Tabela 5.10 - Concentração e período de descarte de lodo do reator. ST - sólidos totais, STV - sólidos totais voláteis, STF - sólidos totais fixos.	74
Tabela 5.11 - Valores médios de pH e alcalinidade em cada fase.	76
Tabela 5.12 - Balanço de massa referente ao consumo e geração de alcalinidade no meio em cada fase.	77
Tabela 5.13 - Quantidade de sequências, UTOs e UTOs analisadas em cada amostra.	78
Tabela 5.14 - Índices de diversidade alfa entre as amostras determinados no nível de 97% de similaridade.	79
Tabela 5.15 - Abundância relativa em cada fase (similaridade de 97%).	81
Tabela 5.16 - Total de gêneros classificados em cada amostra e total de sequências não classificadas (similaridade de 97%).	81
Tabela 5.17 - Abundância relativa dos filos (97% similaridade).	84
Tabela 5.18 - Características dos gêneros com maior abundância relativa na amostra de biomassa da Fase I-a.	87

Tabela 5.19 - Características dos gêneros com maior abundância relativa na amostra de biomassa da Fase IV.	90
Tabela 5.20 - Características dos gêneros com maior abundância relativa na amostra de biomassa da espuma na parte interna.	93
Tabela 5.21 - Características dos gêneros com maior abundância relativa na amostra de biomassa da espuma na parte externa.	95

Lista de abreviações e siglas

ANAMMOX - Anaerobic ammonia oxidation
CANON - Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite
DBO - Demanda biológica de oxigênio
DQO - Demanda química de oxigênio
FIA - Flow injection analysis
LEAI - Leito estruturado e aeração intermitente
LPB - Laboratório de Processos Biológicos
NDS - Nitrificação e desnitrificação simultânea
NMP - Número mais provável
 N-NH_4^+ - Nitrogênio na forma de amônia ou íon amônio
 N-NO_2^- - Nitrogênio na forma de nitrito
 N-NO_3^- - Nitrogênio na forma de nitrato
 NO_x - Soma de nitrogênio na forma de nitrito e nitrato
OD - Oxigênio dissolvido
pH - Potencial hidrogeniônico
SHARON - Single reactor system for high ammonia removal over nitrite
SSF - Sólidos suspensos fixos
SST - Sólidos suspensos totais
SSV - Sólidos suspensos voláteis
ST - Sólidos totais
STF - Sólidos totais fixos
STV - Sólidos totais voláteis
TDH - Tempo de detenção hidráulica
UASB - Upflow anaerobic sludge blanket
USP - Universidade de São Paulo
UTO - Unidade taxonômica operacional

Sumário

1	Introdução	1
2	Objetivos.....	5
3	Revisão bibliográfica	7
3.1	Sistemas para remoção biológica de nitrogênio	7
3.1.1	Nitrificação e desnitrificação convencional	7
3.1.2	Tecnologias relacionadas à desnitrificação autotrófica	11
3.1.3	Nitrificação e Desnitrificação Simultânea	13
3.2	Oxigênio dissolvido e aeração intermitente	16
3.3	Sistemas com leito fixo	18
3.4	Sistemas modernos aplicados para a remoção de nitrogênio e matéria orgânica de esgoto sanitário.....	19
4	Material e métodos	21
4.1	Estrutura do experimento	21
4.2	Reator em escala de bancada.....	22
4.3	Esgoto sanitário	25
4.4	Material suporte.....	25
4.5	Inóculo.....	26
4.6	Análises físico-químicas.....	26
4.7	Ensaio hidrodinâmicos.....	28
4.8	Ensaio cinéticos	29
4.8.1	Ensaio de nitrificação via N-NH_4^+ e N-NO_2^-	31
4.8.2	Ensaio de desnitrificação	33
4.9	Quantificação dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes - NMP.....	33
4.10	Perfis temporais.....	35
4.11	Avaliação da diversidade filogenética da comunidade microbiana	36
4.12	Procedimento experimental.....	38
4.12.1	Fase de adaptação da biomassa.....	38
4.12.2	Fase I.....	38
4.12.3	Fase II.....	39
4.12.4	Fase III	39
4.12.5	Fase IV	40

4.12.6	Monitoramento do reator	40
5	Resultados e discussão.....	43
5.1	Escolha da vazão de recirculação - ensaios hidrodinâmicos	43
5.2	Remoção de nitrogênio.....	45
5.2.1	Fases de operação.....	46
5.2.2	Análise estatística.....	57
5.3	Remoção de DQO	59
5.3.1	Fases de operação.....	59
5.3.2	Análise estatística.....	62
5.4	Remoção de fósforo.....	63
5.5	Ensaio cinéticos	65
5.6	Número mais provável (NMP).....	69
5.7	Perfis temporais	71
5.8	Análise dos sólidos e descarte de lodo	73
5.9	pH e Alcalinidade.....	76
5.10	Análise da comunidade microbiana	78
5.10.1	Índices de diversidade.....	79
5.10.2	Caracterização da diversidade microbiana.....	81
5.11	Considerações sobre o reator com leito estruturado e aeração intermitente (LEAI).....	96
6	Conclusões.....	99
7	Bibliografia	103

1 Introdução

Apesar de a sociedade ser dependente da água para a sobrevivência e para o desenvolvimento econômico, tanto as águas superficiais quanto as subterrâneas têm sua qualidade deteriorada em decorrência das atividades antrópicas. A diversificação dos usos múltiplos, o despejo de resíduos líquidos e sólidos em rios, lagos e represas e a destruição das áreas alagadas e das matas galeria têm produzido contínua e sistemática deterioração e perdas extremamente elevadas em quantidade e qualidade da água (TUNDISI, 2003).

Nos últimos 25 anos houve grande quantidade de recursos investidos na elaboração e construção de sistemas de tratamento de águas residuárias, visando diminuir a carga de poluentes lançados nos corpos d'água. Apesar disso, muitos desses sistemas não atingem níveis admissíveis de emissão de certos poluentes, necessitando algumas adaptações ou modificações para o aumento de seu desempenho, principalmente na remoção de nutrientes.

O lançamento de efluentes contendo concentrações elevadas de nutrientes pode causar vários danos ao ambiente aquático e à saúde humana. No aspecto ambiental, pode-se levar à eutrofização dos corpos d'água, favorecendo o crescimento de fitoplâncton e de macrófitas aquáticas que causam a depleção do oxigênio dissolvido (OD) do corpo receptor, mudança na qualidade das águas, alteração da diversidade de espécies, mudanças de pH, floração de cianobactérias, produção de toxinas, entre outros (EPA, 1993; CALIJURI *et al.*, 2006). Quando se trata da saúde humana, a concentração elevada de nitrato nas águas de abastecimento está associada a doenças como metahemoglobinemia e à ocorrência de câncer no estômago (EPA, 1993; ALMASRI, 2007).

No Brasil, os sistemas convencionais de tratamento de águas residuárias não apresentam boa eficiência na remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo. Sistemas compostos por lagoas de estabilização, lodos ativados convencionais e reatores anaeróbios de manta de lodo (UASB), que são tecnologias amplamente utilizadas no país, apresentam um bom desempenho quanto à remoção

de matéria orgânica. Entretanto, eles não promovem a eliminação de nitrogênio, tornando-se necessária a implantação de sistemas de pós-tratamento para remoção desse nutriente.

O processo convencional de remoção biológica de nitrogênio ocorre em duas etapas distintas, denominadas nitrificação e desnitrificação. Na maior parte dos processos atualmente existentes, essa remoção acontece em unidades independentes daquela que promove a remoção de matéria orgânica, elevando custos de construção, operação e manutenção desses sistemas.

Uma das formas de minimizar esses custos é por meio do desenvolvimento de sistemas de tratamentos compactos que integram os processos de remoção de nitrogênio e matéria orgânica em uma mesma unidade. Vários estudos já foram realizados buscando a remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogênio em um único reator. Entretanto, esses reatores nem sempre apresentaram elevada eficiência de remoção de nitrogênio, havendo a necessidade de realizar estudos mais aprofundados com foco no desenvolvimento de sistemas mais eficientes.

Reatores que operam com biomassa imobilizada tem sido alvo de pesquisas que envolvem a remoção de nitrogênio de águas residuárias. Estes sistemas trazem como principal vantagem a manutenção dos microrganismos no reator, sem que haja necessidade de instalações de separação e retorno de lodo para que se aumente o tempo de retenção celular, sendo que a operação a tempos de retenção celular elevados pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos responsáveis pela nitrificação (WIJFFELS e TRAMPER, 1995). Por outro lado, estes reatores podem apresentar problemas relacionados ao escoamento do meio líquido no seu interior, como a colmatção no meio, havendo a necessidade de se desenvolver novas alternativas de configurações para sistemas com biomassa imobilizada.

A utilização de reatores de leito estruturado nas pesquisas realizadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos - USP vem se mostrando uma excelente alternativa para sistemas que utilizam biomassa imobilizada. Esses sistemas promovem

uma distribuição regular do material suporte no reator, evitando a colmatção do meio que prejudica principalmente a hidrodinâmica do sistema (MOCKAITIS *et al.*, 2011).

Moura *et al.* (2012) trabalharam com um reator em escala de bancada de leito estruturado, operando com aeração intermitente e recirculação de efluente para a remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogênio. Utilizando água residuária sintética com características semelhantes a esgoto sanitário, o sistema apresentou eficiências elevadas na remoção de matéria orgânica e nitrogênio. Entretanto, é de grande importância realizar estudos do comportamento desse reator quando submetido a esgoto sanitário real, uma vez que este efluente apresenta características físico-químicas singulares.

Com a operação desse sistema utilizando esgoto sanitário como afluente, torna-se possível obter parâmetros construtivos e operacionais mais próximos da realidade, que permitam aplicar essa nova tecnologia em reatores em escala maior, inovador no que diz respeito à sua concepção, compacto e eficiente para a remoção de matéria orgânica e nitrogênio.

2 Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa foi verificar a aplicabilidade do reator de leito estruturado, com aeração intermitente e recirculação do efluente, para a remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogênio no tratamento de esgoto sanitário. Para atingir esse objetivo geral, variaram-se os parâmetros operacionais razão de recirculação, tempo de detenção hidráulica (TDH) e duração dos períodos de aeração e não aeração, buscando atingir os seguintes objetivos específicos:

- Identificar, entre os valores testados, da vazão de recirculação mínima para obtenção de mistura completa no reator;
- Determinação das condições operacionais do reator que resultam as maiores eficiências de remoção de nitrogênio e de matéria orgânica;
- Avaliação dos parâmetros cinéticos de nitrificação e desnitrificação em cada condição operacional estudada;
- Avaliação quantitativa dos microrganismos oxidantes de amônia e nitrito e de microrganismos desnitrificantes, em cada condição operacional;
- Avaliação da dinâmica das formas de nitrogênio no interior dos reatores com base nos resultados dos perfis temporais de concentração desses compostos para cada condição operacional testada;
- Avaliação da diversidade microbiana no reator.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Sistemas para remoção biológica de nitrogênio

3.1.1 Nitrificação e desnitrificação convencional

Em sistemas convencionais, a remoção biológica de nitrogênio de águas residuárias ocorre pelo processo de nitrificação e desnitrificação. Em processos convencionais, a nitrificação ocorre estritamente sob condições aeróbias, sendo o nitrogênio amoniacal oxidado a nitrato. Já a desnitrificação ocorre com ausência de oxigênio, onde o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso. Essas séries de reações de oxidação e redução constituem o ciclo do nitrogênio (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Estados de oxidação do nitrogênio (WEF, 2010).

A nitrificação é realizada em duas etapas, envolvendo dois grupos diferentes de bactérias quimioautotróficas. O primeiro grupo oxida o nitrogênio amoniacal até nitrito por um grupo de bactérias oxidadoras de amônia. Estes são microrganismos Gram-negativos, membros das subclasses β ou γ das Proteobactérias, sendo *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio* os gêneros mais relatados (KOOPS *et al.*, 2006).

A estequiometria das etapas da nitrificação já está bem estabelecida. Assumindo coeficiente de produção celular de 0,2 mg (definida em função da DQO) por mg de N-NH_4^+ oxidado. A equação dessa estequiometria é dada pela equação 3.1 (WEF, 2010).

O segundo grupo de microrganismos são os que oxidam o nitrito até nitrato. Estes também são microrganismos Gram-negativos e podem pertencer às subclasses α , β e γ das Proteobactérias. Os gêneros mais conhecidos destes microrganismos são *Nitrobacter*, *Nitrococcus* e *Nitrospina* (ABELIOVICH, 2006).

Assumindo que a taxa de produção de biomassa formada é de 0,1 mg (definida em função da DQO) por mg de N-NO_3^- produzido e um consumo de amônia somente devido o crescimento celular, a estequiometria do processo de nitratação é descrito pela equação 3.2 (WEF, 2010).

De modo simplificado, pode-se escrever o processo da seguinte forma:

De acordo com as equações anteriores, há um consumo de 3,43 mg de oxigênio para oxidar 1 mg de N-NH_4^+ e 1,14 mg de oxigênio para oxidar 1 mg de N-NO_2^- , demandando um total de 4,57 mg de oxigênio para oxidar amônia a nitrato.

Vários fatores internos e externos, como temperatura, pH e OD, podem influenciar no processo de nitrificação. A faixa de temperatura em que é possível a ocorrência de nitrificação varia entre 4° C e 45°C (EPA, 1993), sendo a faixa entre 28-36°C a temperatura ideal para o processo (SHARMA e AHLERT, 1977). Com relação ao pH, a nitrificação tende a ser favorecida em ambientes alcalinos, sendo a faixa ideal entre 7,0 e 8,0. Quando esta faixa não é obedecida, pode haver uma queda significativa na velocidade de nitrificação (SHARMA e AHLERT, 1977; EPA, 1993; METCALF e EDDY, 2003).

A concentração de OD também influencia significativamente na nitrificação. Os valores ideais descritos pela literatura estão entre 2 e 3 mg.L^{-1} , sendo que concentrações inferiores a 1 mg.L^{-1} podem diminuir em 50% a taxa de nitrificação (METCALF e EDDY, 2003; YUAN e GAO, 2010).

Já na desnitrificação ocorre a redução do nitrato a nitrito e, posteriormente, do nitrito a nitrogênio gasoso. Neste processo, o nitrito e o nitrato se tornam receptores de elétrons para a respiração microbiana, sendo importante a ausência de OD no meio.

O processo de desnitrificação é realizado por microrganismos heterotróficos e autotróficos, sendo a desnitrificação heterotrófica mais largamente empregada. Na desnitrificação heterotrófica, os microrganismos utilizam uma fonte de carbono orgânica como doadores de elétrons, sendo esta fonte endógena (provenientes da própria água residuária ou do lodo) ou exógena (adicionada externamente) para a redução do N-NO_2^- e N-NO_3^- à N_2 gasoso (METCALF e EDDY, 2003). A sequência do processo pode ser visualizada na Equação 3.5.

Existe uma vasta quantidade de microrganismos que são capazes de realizar a desnitrificação, sendo a maioria bactérias. Algumas arqueias também são capazes de realizar esse processo, assim como alguns fungos filamentosos. Com poucas exceções, os microrganismos desnitrificantes também são capazes de respirar utilizando oxigênio como receptor final de elétrons. Somente com a ausência de oxigênio no meio é que esses microrganismos utilizam nitrito e nitrato como receptor final de elétrons. Dentre os gêneros de bactérias envolvidas, podem ser citadas as *Archromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Proteus* e *Pseudomonas* (SHAPLEIGH, 2006).

Na estequiometria do processo de desnitrificação heterotrófica, assumindo-se o metanol como fonte de doadores de elétrons e coeficiente de produção celular de 0,6 g de biomassa formada (definida em função da DQO) por grama de metanol consumido, tem-se (WEF, 2010):

Como em todo sistema biológico, a temperatura, pH e OD são fatores fundamentais que influenciam na desnitrificação. A desnitrificação pode ocorrer em temperaturas entre 10 e 30 °C. Com relação ao pH, a faixa indicada para o processo varia entre 6,5 e 8,0. A concentração de OD recomendada para a desnitrificação deve ser inferior a 1 mg.L⁻¹, sendo que concentrações superiores podem inibir o processo (SURAMPALLI *et al.*, 1997; METCALF e EDDY, 2003).

A alcalinidade é um parâmetro que varia significativamente nos processos de nitrificação e desnitrificação. A nitrificação consome 7,14 mg de alcalinidade por mg de N-NH₄ oxidado (em função do CaCO₃), enquanto que a desnitrificação gera 3,57 mg de alcalinidade por mg de N-NO₃⁻ reduzido (em função do CaCO₃). Com isso, o consumo de alcalinidade, durante a etapa de

nitrificação, pode levar a uma redução do pH do meio líquido que, conseqüentemente, pode afetar os processos biológicos no reator (WEF, 2010).

Sistemas convencionais que promovem a remoção de nitrogênio são compostos de duas ou mais unidades, sendo a unidade nitrificante separada da unidade desnitrificante. A unidade nitrificante possui sistema de aeração e normalmente apresenta baixa concentração de matéria orgânica em seu afluente. A unidade desnitrificante é um reator sem aeração, com ou sem a adição de uma fonte externa de matéria orgânica para a desnitrificação (METCALF e EDDY, 2003). Em vista da complexidade dos sistemas convencionais, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas visando à diminuição dos custos de implantação e operação de sistemas que visam a remoção de nitrogênio.

A remoção de nitrogênio por via curta é uma alternativa para reduzir gastos associados à operação desses sistemas. Neste caso, o reator opera com baixo tempo de retenção celular, desfavorecendo o desenvolvimento dos microrganismos nitratantes, gerando nitrito como produto da nitrificação. Este nitrito é reduzido a nitrogênio gasoso pelo processo de desnitrificação heterotrófica. Comparando com o sistema convencional, a remoção de nitrogênio por via curta necessita de menos doadores de elétrons para a desnitrificação, diminuindo custos relacionados com a adição de fonte externa de carbono. Além disso, este sistema gera menos gastos com aeração, pois não é necessário oxidar o nitrogênio amoniacal até nitrato (VILLAYERDE, 2004; DANIEL *et al.*, 2009).

3.1.2 Tecnologias relacionadas à desnitrificação autotrófica

Apesar de a técnica mais empregada atualmente para a remoção de nitrogênio ser a nitrificação autotrófica (ambiente aeróbio) seguida da desnitrificação heterotrófica (ambiente anóxico) - denominado processo convencional -, esta pode se tornar desvantajosa quando

comparada com novas tecnologias, como sistemas que utilizam desnitrificação autotrófica, nitrificação por via curta ou mesmo sistemas com nitrificação e desnitrificação simultâneas.

A remoção biológica de nitrogênio pode ocorrer via processo ANAMMOX (*Anaerobic Ammonia Oxidation*). Neste processo, a amônia presente no meio líquido é oxidada utilizando nitrito como receptor final de elétrons. O produto desta reação é nitrogênio gasoso (90%) e um residual de nitrato (10%), promovendo a remoção de nitrogênio do meio (MULDER *et al.*, 1995; STROUS *et al.*, 1997). Esta tecnologia tem como principal vantagem a não necessidade da adição de uma fonte de carbono exógena para a redução do nitrito.

Para que o processo ANAMMOX possa ocorrer, é necessário que a água residuária apresente uma parcela de nitrogênio amoniacal (50%) e nitrogênio na forma de nitrito (50%). Para gerar um efluente com essas características, pode-se utilizar um sistema denominado SHARON (*Single reactor for High activity Ammonia Removal Over Nitrite*), que tem como função oxidar o nitrogênio amoniacal até nitrito, atendendo a proporção necessária para posterior encaminhamento do efluente a um reator com processo ANAMMOX (HELLINGA *et al.*, 1998).

A fim de reduzir custos do processo de desnitrificação autotrófica, foi elaborada uma nova concepção de sistema, composto por apenas um reator, denominado CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite*). Operando sob concentrações reduzidas de oxigênio dissolvido, este sistema oxida uma parcela do nitrogênio amoniacal a nitrito, sendo este nitrito utilizado como receptor de elétrons para a oxidação autotrófica da amônia (processo ANAMMOX), gerando nitrogênio gasoso (KHIN e ANNACHHATRE, 2004; AHN, 2006).

Dependendo do tipo de água residuária, a desnitrificação autotrófica pode ocorrer utilizando outros doadores de elétrons, como compostos reduzidos de enxofre. Assim, o nitrato também pode ser reduzido a nitrogênio gasoso utilizando sulfeto como doador de elétrons (MANCONI *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2013).

3.1.3 Nitrificação e Desnitrificação Simultânea

Com intuito de promover a remoção de nitrogênio em uma única unidade de tratamento, várias pesquisas são desenvolvidas visando à obtenção de reatores e/ou modelos operacionais que promovam a nitrificação e a desnitrificação em um único reator, sendo este fenômeno denominado nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS). Esses sistemas tornam-se vantajosos quando comparados a sistemas convencionais, pois reduzem os custos operacionais e custos de construção, uma vez que não são necessárias unidades independentes (aeróbias e anóxicas) para a ocorrência da nitrificação e desnitrificação (MUNCH *et al.*, 1996; POCHANA e KELLER, 1999).

Existem dois fenômenos para explicar a ocorrência da NDS em um sistema. O primeiro fenômeno é físico, segundo o qual, em um sistema com NDS, há um gradiente de OD no biofilme de um reator. Devido a esse gradiente, haveria um maior desenvolvimento dos microrganismos nitrificantes na parte externa do biofilme, onde a concentração de OD é maior, e um maior desenvolvimento de microrganismos desnitrificantes na parte interna do biofilme, onde a concentração de OD tende a zero (MUNCH *et al.*, 1996). A Figura 3.2 mostra a representação desse fenômeno.

Figura 3.2 - Estrutura no interior de um biofilme. Fonte: He *et al.*, (2009).

Gonzalez *et al.* (2011) realizaram um estudo com uma célula de fluxo a fim de verificar, por meio de microsensores, a variação de OD, amônia e NO_x no interior de um biofilme. Os autores concluíram que a concentração de OD chega próximo de zero em uma profundidade de 3 mm no biofilme, sendo a concentração de OD no meio líquido entre 5 e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Concluíram também que houve a oxidação do N-NH_4^+ devido à presença de OD no interior do biofilme, gerando uma queda na concentração de OD e de N-NH_4^+ , aumentando a concentração de NO_x . Com isso, as regiões mais internas do biofilme favorecem o desenvolvimento de microrganismos desnitrificantes devido a ausência de OD e presença de NO_x .

No trabalho realizado por Lim *et al.* (2011), testou-se várias dimensões de material suporte feito de cubos de espuma de poliuretano para verificar a influência na NDS. Os autores concluíram que cubos com dimensões menores favorecem o processo de nitrificação e cubos com dimensões maiores favorecem a desnitrificação. Ou seja, observou-se a criação de um microambiente anóxico no interior do biofilme, sendo este microambiente favorecido ou desfavorecido em função da dimensão do material suporte. Além disso, cubos com dimensões menores apresentam maior área superficial específica, aumentando a área total a ser coberta por microrganismos nitrificantes, favorecendo a nitrificação.

Outro fenômeno que pode explicar a NDS é o biológico. A explicação biológica da NDS está em contraste com a concepção tradicional da engenharia sobre o processo de nitrificação e desnitrificação. Pesquisadores tem mostrado que alguns microrganismos possuem a habilidade de nitrificar heterotroficamente e desnitrificar em ambiente aeróbio (MUNCH *et al.*, 1996; GUPTA e GUPTA, 1999; CHEN *et al.*, 2011).

Gupta e Gupta (1999) introduziram uma cultura pura de uma bactéria capaz de nitrificar heterotroficamente e desnitrificar aerobicamente (*Thiosphaera pantotropha*). Operando com um sistema de biodiscos rotativos, os autores verificaram um aumento na eficiência de nitrificação e de remoção de nitrogênio total com o aumento da carga orgânica aplicada no sistema. No trabalho de

Chen *et al.* (2011), foram isolados três gêneros de bactérias capazes de nitrificar heterotroficamente e desnitrificar aerobicamente, sendo elas as *Agrobacterium sp.*, *Achromobacter sp.* e *Comamonas sp.* A biomassa utilizada foi proveniente de um biorreator aeróbio tratando lixiviado.

Todavia, o fenômeno físico e o fenômeno biológico tendem a ocorrer concomitantemente nos reatores. Holman e Wareham (2005) investigaram o processo NDS em um reator em batelada alterando alguns parâmetros, como carga orgânica, OD e concentração de N-NH_4^+ . Os autores concluíram que não é possível afirmar que ocorra apenas um dos fenômenos relacionados à NDS, sendo tanto o fenômeno físico, quanto o biológico, responsáveis pela remoção de nitrogênio.

Existem três principais fatores que influenciam diretamente na eficiência de um sistema com NDS. Pochana e Keller (1999) concluíram que uma fonte de matéria orgânica facilmente biodegradável pode aumentar a eficiência da desnitrificação. Concluíram também que existe uma tendência de aumento da remoção de nitrogênio total em sistemas com flocos de lodo maiores. Além disso, o aumento da concentração de OD pode afetar negativamente o processo de NDS.

Utilizando um biorreator de membrana, He *et al.* (2009) concluíram que outros fatores como a relação alimento/microrganismos (F/M), a relação carbono/nitrogênio (C/N) e o pH também podem influenciar o processo de NDS. Em reator alimentado com efluente sintético, sendo amido e sacarose as fontes de carbono, verificou-se que com o aumento da relação F/M de 0,086 para 0,423 $\text{kgDQO.kgSSV.d}^{-1}$, houve um aumento de 30,3% para 89,9% na eficiência de remoção de nitrogênio total. Este aumento ocorreu devido à maior eficiência de desnitrificação no reator. A melhor relação de C/N encontrado pelos autores foi igual a 21 e a faixa de pH ideal foi entre 7,1 e 7,3.

Atualmente, são estudadas novas tecnologias visando a remoção de nitrogênio por NDS, como desnitrificação por via curta, sistemas com aeração intermitente, utilização de biomassa imobilizada, entre outros (CANTO *et al.*, 2008; NOCKO, 2008; LIU *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2012). Sendo assim, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos modelos de reatores e

novas técnicas operacionais são de grande relevância, tendo em vista as vantagens que este tipo de sistema apresenta sob os sistemas convencionais.

3.2 Oxigênio dissolvido e aeração intermitente

Em sistemas que visam à remoção de nitrogênio, a presença de OD no meio líquido é fundamental para que ocorra o processo de nitrificação. As bactérias nitrificantes utilizam este oxigênio como receptor final de elétrons, gerando energia para a manutenção e crescimento celular. Entretanto, no processo de desnitrificação, a presença de oxigênio desfavorece o processo, uma vez que os microrganismos não utilizarão o nitrato como receptor final de elétrons. Sendo assim, o controle da concentração de OD no meio é fundamental para proporcionar condições favoráveis para os processos envolvidos na remoção de nitrogênio em um único reator.

Uma das formas de promover a ocorrência de condições aeradas e não aeradas é submeter o reator à aeração intermitente. A adição de um período sem aeração em sistemas aeróbios oferece algumas vantagens, como uma maior eficiência na remoção de nitrogênio, economia de energia devido menor período de aeração e menores produções de lodo (CHEN *et al.*, 2000). Além disso, a adição de períodos não aerados promove uma menor oxidação aeróbia da matéria orgânica no reator, podendo gerar uma fonte interna de doadores de elétrons para a desnitrificação, não havendo a necessidade de se adicionar doadores de elétrons externos.

De acordo com Yoo *et al.* (1999), o processo de desnitrificação pode ocorrer no início da fase aeróbia, quando a concentração de OD é inferior a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Com concentrações de OD superiores a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, a nitrificação torna-se mais ativa. A desnitrificação voltará a ser ativa novamente quando a aeração for desligada e a concentração de OD no meio líquido diminuir.

A fim de comparar a eficiência de remoção de nitrogênio em sistemas com aeração contínua e aeração intermitente, Osada *et al.* (1991) utilizaram reatores em batelada e observaram que a eficiência de remoção de nitrogênio total aumentou de 58,6% para 96,9% com a aplicação de

aeração intermitente (1 hora aerada e 1 hora não aerada, em bateladas de 24 horas). Os autores também observaram que não houve diferença na remoção de matéria orgânica no reator com aeração contínua comparado com o reator com aeração intermitente. Em ambos os casos, a eficiência de remoção de DBO foi superior a 90%.

A aplicação de períodos aerados e sem aeração, ou a utilização de baixa concentração de OD em sistemas de tratamento de efluentes, oferecem vantagens na remoção de nitrogênio. Além disso, estes períodos sem aeração não alteram a eficiência de remoção de matéria orgânica (OSADA *et al.*, 1991; YUAN e GAO, 2010; LIU e DONG, 2011; MOURA *et al.*, 2012).

Yuan e Gao (2010) investigaram o efeito da concentração de OD em um reator em batelada operando com grânulo aeróbio. Os autores concluíram que a eficiência de nitrificação foi de 98% com o sistema operando tanto com concentração de OD igual a 1 mg.L⁻¹ (ciclo de 240 minutos) quanto com OD igual a 4,5 mg.L⁻¹ (ciclo de 125 minutos), indicando que a nitrificação não foi prejudicada nessa faixa de concentração de OD. Porém, com concentrações de OD superiores a 1 mg.L⁻¹, a eficiência de desnitrificação caiu significativamente, diminuindo de 95% com OD igual a 1 mg.L⁻¹ para 56% com OD igual a 4,5 mg.L⁻¹. Já com relação à remoção de matéria orgânica, a eficiência de remoção de DQO foi, em média, de 90% tanto para OD de 1 mg.L⁻¹ quanto para 4,5 mg.L⁻¹.

Segundo Hanaki *et al.* (1990), elevadas concentrações de OD não influenciam o processo de oxidação da amônia e do nitrito. Mas, quando a concentração de OD é limitada (0,5 mg.L⁻¹), as bactérias oxidadoras de nitrito sofrem influência negativa, enquanto as oxidadoras de amônia não sofrem tanta influência. Isso pode ocasionar o acúmulo de nitrito em sistemas que trabalham com nitrificação em baixas concentrações de OD.

A utilização de sistemas com microaeração já vem sendo testada visando à remoção de nitrogênio em um único sistema. No trabalho de Liu e Dong (2011), verificou-se a remoção de nitrogênio em um sistema operando com microaeração. Os autores concluíram que a remoção de

nitrogênio total aumentou de 51% para 82% com o aumento da taxa de aeração de $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para $0,20 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Ou seja, a nitrificação foi prejudicada pela baixa taxa de aeração no sistema. Por outro lado, a remoção de matéria orgânica não sofreu grande influência devido às diferentes taxas de oxigênio aplicadas no reator.

Atualmente, existem várias pesquisas investigando a remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogênio em diferentes modelos de reatores (LIU *et al.*, 2010; YING *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2012).

3.3 Sistemas com leito fixo

A utilização de reatores com biomassa aderida a um material suporte oferece algumas vantagens, como a obtenção de tempo de retenção celular elevado, mesmo em sistemas com TDH baixos, levando a um maior desempenho e estabilidade dos reatores.

Em sistemas que visam à remoção de nitrogênio, pelo fato de os microrganismos nitrificantes apresentarem uma taxa de crescimento baixa quando comparados com microrganismos heterotróficos, a imobilização da biomassa é um método eficiente para reter microrganismos que possuem crescimento mais lento em reatores contínuos (WIJFFELS e TRAMPER, 1995; ROSTRON *et al.*, 2001).

Yamagiwa *et al.* (1995) compararam a remoção de nitrogênio em um sistema operando com biomassa suspensa e com biomassa aderida. Segundo os pesquisadores, a eficiência de remoção de nitrogênio aumentou de 56% para 85% quando se adicionou o material suporte. Os autores também concluíram que a etapa de nitrificação foi limitante no sistema operando com biomassa suspensa, gerando a baixa remoção de nitrogênio.

A utilização de espuma de poliuretano tem sido empregada em reatores como suporte para o crescimento da biomassa, apresentando algumas vantagens quando comparadas a outros materiais. Nocko (2008) comparou a utilização de anéis de plástico e cubos de espuma de poliuretano em um

reator de leito móvel visando à remoção de nitrogênio. A autora concluiu que a utilização de espuma como material suporte resultou em melhor desempenho do reator quando comparado aos anéis de plástico.

A espuma de poliuretano também já foi utilizada por outros pesquisadores, mostrando-se um bom material suporte para crescimento da biomassa em reatores nitrificantes e desnitrificantes (LIM *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2012). Lim *et al.* (2011) investigaram a influência do volume de cubos de espuma na eficiência de remoção de nitrogênio em um reator de leito móvel. Os autores concluíram que cubos de 8 mL (2 x 2 x 2 cm) apresentaram maior eficiência na remoção de nitrogênio devido à ocorrência de nitrificação e desnitrificação simultânea. Moura *et al.* (2012) obtiveram uma eficiência de remoção de nitrogênio total de 82% com um reator de leito estruturado, formado por cilindros de espuma de poliuretano (3 cm de diâmetro) e submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente.

A adoção de novas configurações e novas condições operacionais é de grande importância no desenvolvimento de inovações tecnológicas que visem aumentar a eficiência de remoção de matéria orgânica e nitrogênio em sistemas de tratamento de efluentes. Com isso, o desenvolvimento deste trabalho está condizente com as necessidades atuais, onde se busca obter efluentes com cargas poluidoras mais baixas, diminuindo os impactos ambientais decorrentes de seu lançamento em corpos de água.

3.4 Sistemas modernos aplicados para a remoção de nitrogênio e matéria orgânica de esgoto sanitário

Um sistema que tem sido utilizado em vários países visando à remoção de nitrogênio de esgoto sanitário é o sistema *Bardenpho*. Trata-se de uma variante dos sistemas de lodos ativados convencionais e são projetados para remover, além da matéria orgânica, os macronutrientes nitrogênio, por meio de processos sequenciais de nitrificação e desnitrificação e fósforo, com o descarte de lodo (MOTA e VON SPERLING, 2009).

Pesquisas mais recente mostram uma tendência em se utilizar apenas um reator para promover a remoção de nitrogênio e matéria orgânica de esgoto sanitário (CHOWDHURY *et al.*, 2009; NETTO e ZAIAT, 2012; MOURA *et al.*, 2012).

Chowdhury *et al.* (2009) desenvolveram um reator denominado "Liquid-solid Circulating Fluidized-Bed (LSCFB)" para promover a remoção de matéria orgânica e nitrogênio em um único reator. Operando em bancada, este sistema apresentou uma eficiência de remoção de DQO e nitrogênio total de 94% e 80% respectivamente. Devido aos excelentes resultados, os autores aumentaram a escala do reator, elevando a capacidade do sistema de 48 para 5000 litros por dia de vazão afluente. No reator piloto, observou-se uma eficiência de 92% e 89% para DQO e nitrogênio total respectivamente.

Operando um reator compartimentado em fase anaeróbia e aeróbia, em escala de bancada (volume total de 6,8 L), com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano e com recirculação da fase líquida, Netto e Zaiat (2012) obtiveram uma eficiência de remoção de DQO superior a 90% e uma eficiência entre 65% e 75% de nitrogênio total, com uma razão de recirculação da fase aeróbia para a fase anaeróbia de 0,5 a 1,5 respectivamente. Com o aumento de escala (2,75 m³), houve uma queda na eficiência, com valores de 92% e 55% para DQO e nitrogênio total respectivamente, com uma razão de recirculação igual a 3. Segundo os autores, a menor eficiência do sistema piloto ocorreu por problemas no comportamento hidrodinâmico no reator.

No trabalho realizado por Moura *et al.* (2012), utilizou-se um reator de leito estruturado, com aeração intermitente e recirculação do efluente, para a remoção de matéria orgânica e nitrogênio de um efluente sintético com características físico-químicas semelhantes ao esgoto sanitário. Verificou-se uma eficiência de 89% e 82% na remoção de DQO e nitrogênio total, respectivamente. Como conclusão, os autores reportaram sobre a importância da continuação dos estudos com este modelo de reator em escala maior, utilizando-se esgoto sanitário ao invés de efluente sintético.

4 Material e métodos

4.1 Estrutura do experimento

Para melhor explicar a estrutura do experimento, a Figura 4.1 ilustra uma visão geral de todas as etapas experimentais testadas. Na figura, R é a razão de recirculação.

Figura 4.1 - Fluxograma do experimento.

Como já foi mencionado, o objetivo principal desta pesquisa foi verificar o desempenho de uma nova configuração de reator na remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário. De acordo com o trabalho de Moura *et al.* (2012), verificou-se uma eficiência elevada na remoção de matéria orgânica e nitrogênio com a aplicação deste modelo de reator tratando efluente sintético com características semelhantes às de esgoto sanitário. Entretanto, como a composição do esgoto sanitário real é muito mais complexa do que o efluente sintético, decidiu-se estudar a aplicação deste reator para o tratamento de esgoto sanitário real.

Inicialmente, foram realizados ensaios hidrodinâmicos a fim de se obter a razão de recirculação mínima necessária para garantir um escoamento no reator mais próximo de mistura completa. Este estudo preliminar permitiu entender o efeito da recirculação no grau de mistura do reator. Além disso, obtendo-se a recirculação mínima necessária, é possível minimizar custos na operação e manutenção deste sistema.

Com a determinação da razão de recirculação, iniciou-se o estudo de avaliação da eficiência do sistema para a remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogênio em um único reator. Após um período de adaptação da biomassa à nova água residuária, iniciaram-se os testes de eficiência, variando, a princípio, o TDH. A primeira condição operacional testada foi semelhante à melhor condição obtida por Moura *et al.* (2012). Após um período longo de operação, verificou-se a estabilidade do sistema e decidiu-se diminuir o TDH com a finalidade de aperfeiçoar o processo.

Além dos testes de eficiência do sistema, foram realizados ensaios cinéticos, análises microbiológicas do número mais provável (NMP) dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes e perfis temporais do reator. Estas análises complementares visaram permitir o maior entendimento dos processos que ocorrem no interior do reator.

Também foi realizada uma caracterização filogenética da biomassa em cada condição operacional testada a fim de se verificar possíveis alterações na característica da biomassa com as alterações das condições experimentais. Com isso, foi possível inferir relações entre comportamento do reator com as características da comunidade microbiana em cada condição operacional.

4.2 Reator em escala de bancada

O reator utilizado foi construído em acrílico, de formato cilíndrico, com diâmetro interno de 14,5 cm e 80 cm de altura, totalizando um volume de aproximadamente 11,6 L. A porosidade inicial do leito foi de 52%, gerando um volume útil de aproximadamente 6,1 L. As Figuras 4.2 e 4.3 representam esquematicamente o sistema.

Figura 4.2 - Representação do reator de leito estruturado e aeração intermitente (LEAI).

Figura 4.3 - Esquema do sistema em escala de bancada. Fonte: adaptado de Moura *et al.* (2012).

A alimentação do sistema foi feita de forma contínua, com entrada localizada na base do reator, representada por A1 (fluxo ascendente). A saída do efluente tratado (A3) está situada na zona superior do reator, a 70 cm da base. Uma saída para recirculação do efluente foi instalada a 65 cm da base do reator (A4). Além do ponto de alimentação, a zona inferior do reator foi provida de uma entrada independente para a recirculação, representada pelo ponto A2. As saídas A5, A6, A7 e A8 foram utilizadas para eventual coleta de amostra e descarte de biomassa do interior do reator.

Para a alimentação do reator e recirculação do efluente, foram utilizadas bombas dosadoras da marca Proeminente Conceptplus (alimentação) e Proeminente Contact (recirculação). A temperatura do sistema foi mantida 30°C. O reator foi enrolado com uma mangueira formando uma espiral, na qual circulava água a 30°C (aquecida por um banho Maria Marcon MA 18416). A Figura 4.4 ilustra o reator e o sistema instalado para manter a temperatura.

Figura 4.4 - Reator montado com o sistema para manter a temperatura.

Para promover aeração no sistema, foi utilizado um aerador de aquário, da marca Regent 8500, provido de um difusor de bolhas (A9) localizado junto ao fundo do reator e conectado à mangueira de saída do ar.

4.3 Esgoto sanitário

A água residuária utilizada neste estudo abastece a área de tratamento de esgoto do Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos–EESC/USP da Universidade de São Paulo em São Carlos. Trata-se de esgoto sanitário que passa pela Área 2 do Campus Universitário proveniente prioritariamente dos bairros circunvizinhos à Universidade, da cidade de São Carlos. As características médias do esgoto bruto coletado durante todo o período experimental estão representadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Característica do esgoto sanitário.

Características do esgoto sanitário	
Componentes	Concentração (mg.L⁻¹)
DQO	493 ± 154
Alcalinidade (como CaCO ₃)	177,4 ± 41,5
pH	7,0 ± 0,2
NTK	45 ± 13
N-NH ₄ ⁺	31,9 ± 10,6
N-NO ₂ ⁻	0,4 ± 0,8
N-NO ₃ ⁻	0,5 ± 1,3
P-PO ₄ ⁻³	4,0 ± 2,1
Sólidos totais	574,0 ± 130,6

4.4 Material suporte

O reator foi preenchido com material suporte composto por espuma de poliuretano. Essa espuma foi modelada em formato cilíndrico, com diâmetro médio de 3 cm e 70 cm de comprimento. Foram inseridos 13 cilindros de espuma de poliuretano no reator, sendo que cada cilindro teve suas extremidades fixadas na base e no topo do reator, podendo ser visualizado no Corte C-C da Figura 4.3. A Figura 4.5 e a Tabela 4.2 mostram as espumas fixadas nas hastes e as características físicas da espuma de poliuretano respectivamente.

Tabela 4.2 - Característica da espuma de poliuretano (Adaptado NOCKO, 2008).

Espuma de Poliuretano	
Forma	Cilíndrica
Densidade (g.L ⁻¹)	22
Porosidade da espuma (%)	92
Dimensões	Diâmetro = 3 cm; Altura = 70 cm

Figura 4.5 - Montagem da estrutura cilíndrica de espuma de poliuretano.

4.5 Inóculo

Para a inoculação do reator, foi utilizado lodo biológico proveniente de um reator de lodos ativados, rico em bactérias nitrificantes, situado na Fábrica de Motores da Volkswagen, localizada em São Carlos, SP. Esse lodo tem sido amplamente utilizado na inoculação de reatores aeróbios no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos – EESC/USP. O lodo foi imobilizado nas estruturas cilíndricas de espuma de poliuretano de acordo com a metodologia proposta por Zaiat *et al.* (1994).

4.6 Análises físico-químicas

As análises realizadas e os métodos utilizados durante o experimento estão apresentados na Tabela 4.3. Todas as análises foram executadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2012), com exceção às análises de N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e P-PO_4^{3-} . A análise de nitrogênio amoniacal foi feita pelo método de injeção de fluxo (FIA) e cromatografia de íons, enquanto que as análises de nitrito, nitrato e fosfato foram realizadas somente por cromatografia de íons.

A alcalinidade foi determinada segundo a metodologia descrita por Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley *et al.* (1986).

Tabela 4.3 - Análises físico-químicas que foram realizadas.

Parâmetro/Unidade	Metodologia	
	Nome	Número
pH	Potenciométrico	4500-H+ B
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	Titulométrico	Dillalo e Alberstson (1961) modificada por Ripley <i>et al.</i> (1986)
NTK	Método Semi-micro- Kjeldahl	4500-Norg C
N-NH ₄ ⁺ (mgN.L ⁻¹)	Método do Fenato (FIA) e Cromatografia iônica	4500-NH3 C
N-NO ₂ ⁻ (mg N.L ⁻¹)	Cromatografia iônica	
N-NO ₃ ⁻ (mg N.L ⁻¹)	Cromatografia iônica	
P-PO ₄ ⁻³ (mg.L ⁻¹)	Cromatografia iônica	
ST (mg.L ⁻¹)	Sólidos Totais	2540 G
SST (mg.L ⁻¹)	Sólidos Suspensos Totais	2540 D
SSV (mg.L ⁻¹)	Sólidos Fixos e Voláteis	2540 E
DQO	Colorimétrico	5220 D

Segue um detalhamento dos métodos de análise de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato:

N-NH₄⁺ - Amônia (FIA)

A amostra é injetada no fluxo e é carregada por uma solução alcalina, uma solução mista (ácido salicílico, citrato de sódio e nitroprussiado) e hipoclorito. Esta reação, de Berthelot, forma um complexo azul de indofenol, sendo esta cor medida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 690 nm. O valor da absorbância é proporcional à quantidade de amônia na amostra, sendo necessário traçar uma curva com os padrões conhecidos.

N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ e P-PO₄³⁻ - Amônia, nitrito, nitrato e fosfato (cromatografia de íons)

As análises de amônia da Fase III e Fase IV foram realizadas em um cromatógrafo de íons Dionex (modelo ICS 5000), equipado com um detector de condutividade e uma coluna IonPac CG12A Cation-Exchange Column, operando à temperatura de 30°C e com fase móvel composta de uma solução de ácido sulfúrico (40 mM), com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

Os íons amônio, nitrito e nitrato foram analisados por cromatografia iônica, foi equipado com um detector de condutividade e uma coluna IonPac® AS11HC Anion-Exchange Column, operando à temperatura de 30°C. A fase móvel foi composta de uma solução de carbonato de cálcio (4,5 mM) e bicarbonato de cálcio (0,8 mM), com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

4.7 Ensaios hidrodinâmicos

A fim de verificar a vazão de recirculação mínima necessária para garantir escoamento com características próximas à mistura completa, realizaram-se ensaios hidrodinâmicos antes de se iniciar a operação do reator. Para os ensaios, foram utilizados tempos de detenção hidráulica (TDH) de 6 horas e 12 horas. Para cada TDH, fizeram-se ensaios com razões de recirculação R=0, R=1, R=2, R=3 e R=4.

Para o ensaio, o reator foi alimentado com água proveniente do sistema público de abastecimento de água. Adotou-se dextrana azul como traçador por ter sido um dos melhores traçadores indicados por Jimenez *et al.* (1988). Adicionou-se 50 ml de dextrana azul com concentração de 2 g.L⁻¹ (ensaios com TDH de 6 horas) e 4 g.L⁻¹ (ensaios com TDH de 12 horas). A adição do traçador no reator foi realizada na forma de pulso, segundo descrito em Levenspiel (2000). As amostras do efluente foram analisadas a cada 5 minutos. Uma bomba Gilsom Miniplus de 4 canais levava a amostra do topo do reator para o espectrofotômetro (comprimento de onda de

650 nm) continuamente, onde era feita a leitura e esta era armazenada em um computador equipado com o software FemWin 670.

Deste modo, obtiveram-se os dados da concentração de dextrana azul, por meio de uma curva padrão de calibração no espectrofotômetro, permitindo a obtenção da curva C (concentração x tempo). A partir desta curva, obteve-se o TDH médio real pela seguinte fórmula:

$$\theta_h = \frac{\sum_0^{tf} t.C(t).\Delta t}{\sum_0^{tf} C(t).\Delta t} \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde θ_h é o TDH médio, C é a concentração de dextrana e t é o tempo.

Após o cálculo do TDH médio, a variância (δ^2) é calculada com a seguinte equação:

$$\delta^2 = \frac{\sum_0^{tf} (t-\theta_h)^2.C(t).\Delta t}{\sum_0^{tf} C(t).\Delta t} \quad (\text{Equação 4.2})$$

Com o valor da variância, calculou-se a variância adimensional (δ_θ^2) (Equação 4.3) e utilizou-se o modelo de tanques de mistura completa para calcular o número de reatores em série (N), de acordo com a Equação 4.4 (LEVENSPIEL, 2000):

$$\delta_\theta^2 = \frac{\delta^2}{\theta_h^2} \quad (\text{Equação 4.3})$$

$$N = \frac{1}{\delta_\theta^2} \quad (\text{Equação 4.4})$$

4.8 Ensaios cinéticos

Para verificar a velocidade de nitrificação e desnitrificação em cada fase testada, realizaram-se ensaios cinéticos com a biomassa do reator. O momento escolhido para a realização destes ensaios foi quando se verificou uma boa estabilidade do reator, ou seja, o sistema se apresentava em estado estacionário.

Para cada ensaio, foram retirados 9 cm de espuma de um dos 13 cilindros de espuma de poliuretano do leito estruturado do reator. Esta espuma retirada foi dividida em 3 partes iguais de 3 cm, sendo cada pedaço deste utilizado em cada ensaio. Os pedaços de 3 cm de espuma foram divididos em cilindros de 1 cm de altura, sendo cada cilindro deste foi dividido em 4 partes iguais. Estas partes foram inseridas no reator para a realização do ensaio. A Figura 4.6 ilustra o modo em que foi realizada a retirada e utilização da biomassa. Após cada ensaio, as hastes de espuma utilizadas eram repostas no reator.

Figura 4.6 - Método de retirada e corte da biomassa da espuma para os ensaios cinéticos.

Para a realização deste ensaio, foram utilizados reatores em batelada (frascos de Duran ® de 250 mL), com volume total líquido de 200 mL (Figura 4.7). A modelagem cinética foi baseada no consumo dos compostos nitrogenados, por meio de perfis temporais, obtendo-se uma curva de decaimento do substrato com o tempo. O ensaio de nitrificação foi dividido em ensaio de oxidação de N-NH_4^+ e ensaio de oxidação de N-NO_2^- , enquanto que, no ensaio desnitrificante, mediu-se o decaimento de N-NO_3^- . Todos estes ensaios foram feitos em triplicata.

Figura 4.7 - Reatores em batelada preparados para início do ensaio cinético.

Determinou-se a função de velocidades de nitrificação e desnitrificação com a seguinte equação:

$$(-r_{N'}) = \frac{dC_{N'}}{dt} = k \cdot f(C_{N'}) \quad (\text{Equação 4.5})$$

Onde:

$r_{N'}$ = velocidade específica de consumo de nitrogênio ($\text{mgN.L}^{-1}.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

$C_{N'}$ = concentração de N por unidade de massa de SSV no tempo t ($\text{mgN.L}^{-1}.\text{gSSV}^{-1}$);

k = constante de velocidade dependente da ordem da reação e do modelo cinético ($\text{mgN.L}^{-1}.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ou h^{-1});

$f(C_{N'})$ = função a ser avaliada, dependente da concentração de nitrogênio;

t = tempo (horas)

4.8.1 Ensaio de nitrificação via N-NH_4^+ e N-NO_2^-

O meio utilizado para o ensaio de nitrificação via N-NH_4^+ foi um meio sintético com concentração de N-NH_4^+ igual a 30 mg.L^{-1} adicionando-se NH_4Cl . No ensaio de nitrificação via N-NO_2^- , foi adicionado NaNO_2 , obtendo-se uma concentração de 20 mg.L^{-1} de N-NO_2^- . Em ambos os meios, foram adicionadas soluções de micronutrientes e macronutrientes, conforme utilizado por Van de Graaf *et al.* (1996) e adaptado por Martins (2012). Foi adicionado 1 mL da Solução Traço I

por litro de meio, 1 mL da Solução Traço II por litro de meio e 5 mL da Solução de Macronutrientes por litro de meio. As características destas soluções estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Soluções traço e de macronutrientes adicionados nos ensaios cinéticos.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1000 mL de água
Solução Traço I	
EDTA	5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	9,17 g
Solução Traço II	
EDTA	15 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,43 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,99 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,22
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,19 g
Na ₂ SeO ₃	0,09 g
H ₃ BO ₃	0,014 g
Solução de Macronutrientes	
CaCl ₂	36 g
MgSO ₄	60 g

Para garantir alcalinidade suficiente para a nitrificação, os frascos receberam 2 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio em 1 L nos meios sintéticos. Esta quantidade de bicarbonato encontra-se em excesso para não ser um limitante no processo. Além disso, a adição de bicarbonato garantiu que o meio sintético se mantivesse na faixa de pH neutro.

Os reatores em bateladas foram submetidos à aeração com o auxílio de um aerador de aquário provido de pedras porosas para promover a difusão de ar no meio líquido. Também se utilizou um *shaker* a 120 rpm para promover agitação dos reatores. Todo o ensaio foi realizado em uma câmara a 30 °C

4.8.2 Ensaio de desnitrificação

No ensaio desnitrificante, preparou-se um meio com NaNO_3 , obtendo-se uma concentração de 30 mg.L^{-1} de N-NO_3^- . Também foi adicionado, neste meio, 1 mL das soluções traço I, II e 10 mL da solução de macronutrientes, conforme apresentado na Tabela 4.4.

Para servir de fonte de doadores de elétrons, adicionou-se acetato de sódio na concentração de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, mantendo-se a relação de C/N aproximadamente igual a 10. Esta relação garante em excesso a quantidade de doadores de elétrons para o processo de desnitrificação. Também foi adicionado 2 g.L^{-1} de bicarbonato de sódio a fim de se manter o pH na faixa neutra.

Antes do início do ensaio, fluxionou-se N_2 gasoso por 5 minutos no meio líquido para diminuir a concentração de OD no meio. Os reatores foram colocados em um *shaker* a 120 rpm a fim de manter o sistema sob agitação. A temperatura do ensaio foi mantida a 30°C .

4.9 Quantificação dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes - NMP

As quantificações dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes foram realizadas por meio da técnica de diluição seriada. Uma amostra de espuma (10 cm aproximadamente) foi retirada do reator ao término de cada condição operacional e, a partir destas amostras, foram estimados os valores de número mais provável. A biomassa foi retirada da espuma com o auxílio de um bastão de vidro. Realizou-se a compressão desta espuma com o bastão para o desprendimento da biomassa da espuma, utilizando-se água ultrapura para auxiliar na lavagem da espuma. Após a extração, centrifugou-se esta biomassa por 5 minutos a 5000 rpm, totalizando 10 ml de lodo centrifugado (pellet). Para as diluições seriadas, foram utilizadas amostras provenientes deste volume de lodo centrifugado.

A quantificação dos microrganismos nitrificantes foi feita considerando-se os dois principais grupos de microrganismos que participam do processo: as bactérias oxidadoras de amônia e as bactérias oxidadoras de nitrito. A metodologia foi baseada em Spínola (2009), que empregou o

método de Focht e Joseph (1973), modificado por Tiedje (1982) e adaptado para amostras líquidas (GIANOTTI, 1994). A Tabela 4.5 mostra os meios de cultura utilizados em cada ensaio.

Tabela 4.5 - Meios de cultura utilizados nos ensaios de bactérias nitrificantes.

Constituintes químicos	Concentração da solução estoque (g.L ⁻¹)	Volume requerido para 1 L de meio (mL.L ⁻¹)	
		Oxidadoras de amônia	Oxidadoras de nitrito
Sais			
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,34	1,0	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,0	1,0	5,0
KH ₂ PO ₄	2,72	7,5	1,0
Azul de bromotimol	0,04	1,0	-
K ₂ HPO ₄	3,48	-	4,0
NaNO ₂	0,69	-	1,0
Ferro quelante			
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,246	1,0	1,0
EDTA dissódico	0,331	1,0	1,0
Elementos traço			
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,01	1,0	1,0
MnCl ₂	0,02	1,0	1,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0002	1,0	1,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01	1,0	1,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,002	1,0	1,0

Para o ensaio das bactérias oxidadoras de nitrito, o nitrito foi adicionado na forma de NaNO₂, conforme apresentado na Tabela 4.5. Já no preparo do meio de cultivo das bactérias oxidadoras de amônia, foi adicionado 125 mg.L⁻¹ de NH₄Cl como fonte de nitrogênio amoniacal.

Com o meio de cultivo preparado, o mesmo foi distribuído igualmente (4,5 mL) em tubos de ensaio, fechados com tampas de borrachas (as tampas foram encaixadas no tubo de modo a permitir a entrada de oxigênio). Todos os tubos foram autoclavados por 20 minutos, 1 atm a 120 °C. Após a inoculação e a diluição em série (em quintuplicatas), os tubos foram incubados a 30°C, sem agitação, por 7 dias para as bactérias oxidadoras de amônia e 15 dias para as bactérias oxidadoras de nitrito.

A quantificação dos microrganismos desnitrificantes foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tiedje (1982). O meio utilizado foi um meio de cultivo genérico (*Nutrient Broth*), no qual se adicionou nitrato a uma concentração de 500 mg.L⁻¹. Adicionou-se 8,0 g de *Nutrient Broth* e 0,685 g de NaNO₃ para um volume de 1 de água ultra-purificada. Nos tubos de ensaio, foram adicionados 4,5 mL do meio de cultivo e os tubos foram completamente fechados

com tampas de borracha. Após isso, os tubos foram autoclavados (20 minutos, 1 atm e 120 °C) e em seguida foi feita a diluição em série (também em quintuplicatas). Os tubos foram incubados a 30 °C por 30 dias.

A incubação dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes foram feitas sem agitação. A Figura 4.8 mostra os tubos utilizados nos ensaios.

Figura 4.8 - Ilustração da leitura de NMP para bactérias nitrificantes.

4.10 Perfis temporais

A fim de verificar se o sistema apresentava nitrificação e desnitrificação simultâneas, foram feitas análises de perfil temporal do efluente do reator em cada condição operacional testada. Esta análise teve como foco observar a variação da concentração de N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- em um ciclo completo de aeração e não aeração, tornando-se possível constatar ou não a presença de picos de concentração de alguma dessas formas de nitrogênio.

As amostras foram coletadas a cada 30 minutos. O primeiro ponto foi no início da fase de aeração e o último ponto foi no término da fase sem aeração. A concentração de OD também foi verificada a cada coleta de amostra.

4.11 Avaliação da diversidade filogenética da comunidade microbiana

Ao término de cada fase operacional do reator, foi extraída uma amostra da biomassa da espuma de poliuretano para análise da comunidade microbiana. Essas amostras foram retiradas aleatoriamente em uma das hastes de espuma do reator. Também foi coletada durante a Fase II uma amostra da parte interna e da parte externa da espuma de uma haste (a parte externa foi fixada entre 0 e 1,0 cm de profundidade e a parte interna em 1,0 e 1,5 cm, correspondendo ao raio total da espuma) para verificar possíveis alterações na comunidade microbiana em diferentes regiões da espuma. A Figura 4.9 apresenta esta separação entre parte interna e externa da espuma.

Figura 4.9 - Parte interna e externa da espuma utilizada na caracterização microbiana durante a Fase II.

Após a retirada da biomassa, estas foram lavadas com tampão fosfato e armazenadas a -20°C após centrifugação (4°C , 10 minutos a 3000 rpm). A extração do DNA das amostras foi feita após o término da operação do reator. A técnica utilizada para extração foi baseada no protocolo de Griffiths *et al.* (2000) modificado, usando fenol tamponado com Tris e clorofórmio.

Após a extração do DNA, este foi desidratado em etanol 95% e enviado para a empresa de biotecnologia *GenOne Biotechnologies* com sede na cidade do Rio de Janeiro. A concentração mínima de DNA enviado foi de $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e pureza OD260/280 de no mínimo 1,8.

O sequenciamento foi realizado por meio da plataforma Ion Torrent, com o CHIP 318 V2 modo 400 bp. Os primers utilizados foram 577F ($5'$ - AYTGGGYDTAAAGNG- $3'$) e 924R ($5'$ -

CCGTCAATTCMTTTRAGT-3') para amplificar a região V4 do DNA extraído, gerando fragmentos de 347 bp em média.

As sequências obtidas foram processadas no *Ribosomal Database Project (RDP) Pyrosequencing Pipeline* (<http://pyro.cme.msu.edu/index.jsp>) (COLE *et al.*, 2009). No processamento inicial, foram removidos os homopolímeros maiores que 6, bases ambíguas, sequencias com coeficiente de qualidade menor que 20 e sequencias inferiores a 200 pares de bases. Também foi feito a remoção de chimeras usando o programa DECIPHER (<http://decipher.cee.wisc.edu/index.html>) (WRIGHT *et al.*, 2012).

Para o alinhamento das sequencias, utilizou-se a ferramenta *secondary structure aware Infernal aligner*. A determinação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) foi por meio da ferramenta *RDP mcClust complete linkage clustering* e *complete linkage clustering* (<http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/cluster/form.spr>). Dessa forma, as sequencias foram agrupadas com porcentagem de similaridade de 97 %. Para a classificação taxonômica, as OTUs que apresentaram sequências únicas (*singleton*) foram removidas, como recomendado por Dickie (2010). Enquanto que para a análise dos índices de diversidade as singletons não foram removidas.

Em relação a classificação taxonômica foi utilizado apenas as sequências representativas de cada OTU. Os limites de confiança adotados foram de 50 % para gênero que resulta em uma porcentagem de 94,5 % de sequências corretamente classificadas para esse nível taxonômico para a região V4 do gene rRNA 16S.

Em seguida, foram determinados os índices de diversidade Alfa (Chao1, Shannon, Simpson e Dominância). A alfa-diversidade está relacionada com a diversidade dentro de uma amostra (intra-amostral) e permite responder quantas espécies estão presentes (riqueza) e como elas estão distribuídas (uniformidade). A alfa-diversidade está dividida em índices de diversidade que avaliam tanto a riqueza como a abundância relativa de cada espécie. Para tanto, foram utilizados os

resultados gerados na determinação de OTUs (97 % de similaridade) incluindo as OTUs com sequências únicas (*singletons*).

Com o intuito de disponibilizar as sequências em um banco de dados internacional, todos os dados gerados, em seu estado bruto, foram depositados no *European Nucleotide Archive*.

4.12 Procedimento experimental

4.12.1 Fase de adaptação da biomassa

Após a inoculação do lodo no material suporte e a fixação do material suporte no reator, foi dada a partida no sistema. Inicialmente, optou-se por operar o sistema com aeração contínua até que se atingisse completa nitrificação do efluente. O TDH desta etapa foi de 12 horas e a razão de recirculação adotada foi de 3 vezes (devido aos resultados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos). Esta condição inicial teve como objetivo favorecer o desenvolvimento e adaptação dos microrganismos inoculados no reator com a nova água residuária, ou seja, com esgoto sanitário. Além disso, esta fase de adaptação visou promover o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela nitrificação, que apresentam uma velocidade de crescimento menor que os demais organismos. Finalizou-se esta fase no momento em que se obteve a completa nitrificação do nitrogênio amoniacal.

4.12.2 Fase I

Após esse período de adaptação, adotaram-se inicialmente os valores de TDH e período de aeração e não aeração de acordo com os melhores resultados obtidos por Moura *et al.* (2012), que operou este modelo de reator alimentado com esgoto sintético. O TDH desta fase foi de 12 horas e os períodos de aeração e não aeração foram de 2 horas e 1 hora, respectivamente. A concentração de OD foi mantida na faixa entre 2,5 e 3,5 mg.L⁻¹, valor recomendado por Luostarinen *et al.* (2006) e Nocko (2008) .

Esta condição foi mantida por 163 dias, tendo sido possível verificar a estabilidade e comportamento do reator por um longo período de tempo. Antes do término desta fase, foram realizados ensaios cinéticos, ensaios microbiológicos de NMP, perfis temporais e análises de biologia molecular da biomassa do reator, conforme as metodologias descritas nos itens 4.8, 4.9 e 4.10 e 4.11 respectivamente.

Durante esta fase, foi feito um descarte de lodo após 138 dias de operação. Retirou-se 1 litro de lodo do fundo do reator e foi feita análise da série de sólidos.

4.12.3 Fase II

Esta fase foi mantida por um período de 165 dias. O TDH nesta etapa foi de 10 horas, com os tempos de aeração e não aeração mantidos em 2 horas e 1 hora, respectivamente, e a razão de recirculação mantida em 3. A concentração de OD ficou entre 2,5 e 3,5 mg.L⁻¹. Também foram realizados os ensaios microbiológicos de NMP, os ensaios cinéticos, perfil temporal e análises de biologia molecular.

Durante esta condição, foi realizado um descarte de lodo com 24 dias de operação. Foi retirado 1 litro de lodo da base do reator e realizada análise da série de sólidos deste lodo.

4.12.4 Fase III

Nesta fase, o TDH do sistema foi de 8 horas, sendo mantidas as condições relacionadas aos períodos de aeração e não aeração e razão de recirculação das fases anteriores. Também foram realizados ensaios cinéticos e microbiológicos (NMP) com a biomassa do reator, perfis temporais e análise de biologia molecular. Entretanto, como será apresentado na parte de resultados, houve problemas na amostra enviada para análise de biologia molecular, não sendo possível obter resultados de taxonomia e índices de diversidade nesta etapa.

Diferentemente das etapas anteriores, não se verificou a necessidade de descarte de biomassa do reator durante esta etapa. A Fase III teve uma duração de 101 dias.

4.12.5 Fase IV

Durante a fase IV, que teve duração de 131 dias, foi mantido o TDH de 8 horas, como na fase anterior. Por outro lado, houve alteração dos períodos de aeração e não aeração, sendo o reator submetido a ciclos de 3 horas de aeração, seguido de 1 hora sem aeração. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida na faixa entre 2,5 a 3,5 mg.L⁻¹ e a razão de recirculação também foi mantida em 3.

Análises da microbiologia por meio de NMP, ensaios cinéticos, perfis temporais e análise de biologia molecular novamente foram feitas ao término desta fase de operação.

4.12.6 Monitoramento do reator

Para cada condição operacional, foram realizadas amostragens do afluente e do efluente para analisar as concentrações de NTK, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ e N-NO₃⁻. A partir desses dados, foi possível avaliar a variação das concentrações desses compostos no meio líquido, assim como calcular a eficiência de remoção de nitrogênio total para cada condição operacional testada. As coletas de amostras do sistema para análise de NTK, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ e N-NO₃⁻ foram realizadas de duas a três vezes por semana.

A eficiência de oxidação de NTK e a eficiência de remoção de nitrogênio foram determinadas da seguinte forma:

$$Ef.Ox.NTK = \frac{[NTK]_{af} - [NTK]_{ef}}{[NTK]_{af}} \times 100, \quad (\text{Equação 4.6})$$

Sendo:

$Ef.Ox.NTK$ = eficiência de oxidação do NTK;

$[NTK]_{af}$ = concentração de NTK afluente;

$[NTK]_{ef}$ = concentração de NTK efluente

$$Ef.Rem.N = \frac{([NTK] + [N-NO_2] + [N-NO_3])_{af} - ([NTK] + [N-NO_2] + [N-NO_3])_{ef}}{([NTK] + [N-NO_2] + [N-NO_3])_{af}} \times 100, \quad (\text{Equação 4.7})$$

Sendo:

$Ef.Rem.N$ = eficiência de remoção de nitrogênio total,

$([NTK] + [N-NO_2] + [N-NO_3])_{af}$ = soma da concentração de NTK, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ afluente;

$([NTK] + [N-NO_2] + [N-NO_3])_{ef}$ = soma da concentração de NTK, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ efluente.

Os valores de fosfato, DQO, pH e alcalinidade foram monitorados de duas a três vezes por semana a fim de verificar o comportamento desses parâmetros para cada condição operacional testada. A série de sólidos do afluente e do efluente foi realizada quinzenalmente.

5 Resultados e discussão

5.1 Escolha da vazão de recirculação - ensaios hidrodinâmicos

A primeira etapa do experimento teve como objetivo escolher a menor vazão de recirculação que garantisse que o escoamento no reator fosse mais próximo de um reator de mistura completa. Este ensaio foi realizado sem aeração, ou seja, não foi medida a influência da aeração sob o comportamento hidrodinâmico do reator.

Os resultados obtidos neste experimento estão apresentados na Figura 5.1

Figura 5.1 - Resultados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos.

As curvas de distribuição do tempo de residência (DTR) obtidas pelos ensaios hidrodinâmicos realizados estão apresentadas na Figura 5.2.

Figura 5.2 - Curvas referentes à distribuição do tempo de residência nos ensaios hidrodinâmicos para TDH de 6h (●) e 12h (▲).

Conforme pode ser visualizado na Figura 5.1, com o aumento da razão de recirculação, há uma diminuição no número de reatores em série, indicando um escoamento mais próximo de um escoamento de mistura completa. Pode ser visto também que, a partir de uma razão de recirculação igual a 3, há pouca variação no número de reatores em série. Com isso, não seria viável aumentar muito a razão de recirculação, pois não haveria influência significativa no número de reatores em série.

Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos, fixou-se uma razão de recirculação igual a 3, garantindo-se então um escoamento mais próximo de um reator de mistura completa. Moura *et al.* (2012) utilizaram uma razão de recirculação igual a 5 na operação do mesmo tipo de reator, porém operando com esgoto sintético. Com o resultado deste ensaio, foi possível verificar que com a razão de recirculação igual a 3 já é suficiente para garantir que o sistema se aproxime a 2 reatores de mistura completa, diminuindo então gastos com energia para bombeamento.

No item 5.7 são apresentados os resultados dos perfis temporais do reator, corroborando que o regime de escoamento do sistema é semelhante ao de mistura completa.

5.2 Remoção de nitrogênio

Neste item, são apresentados todos os resultados referentes à remoção de nitrogênio durante as fases testadas. Vale ressaltar que as fases apresentadas são sequenciais, ou seja, não houve reinoculação do reator entre as fases.

Durante as fases testadas neste trabalho, além das análises físico-químicas apresentadas anteriormente, foram monitoradas as vazões de alimentação a fim de verificar o TDH real no sistema. Esta medida visou eliminar possíveis problemas devidos a alterações na vazão da bomba, que poderia influenciar diretamente na estabilidade e na eficiência do sistema. Os resultados destas medições estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Vazão em cada condição operacional.

Condições operacionais	Vazão média (L.h⁻¹)	TDH médio (h)
Fase de adaptação	0,47 ± 0,07	13,1
Fase I	0,50 ± 0,04	12,2
Fase II	0,60 ± 0,07	10,1
Fase III	0,75 ± 0,05	8,1
Fase IV	0,72 ± 0,05	8,5

Como pode ser observado, houve pequena variação na vazão em cada fase estudada, indicando que o sistema não apresentou variações em sua eficiência devido possíveis alterações significativas na vazão afluenta.

Outro procedimento importante foi o monitoramento da temperatura do reator. Em média, a temperatura do reator manteve-se em 30 °C durante todo o período experimental. Entretanto, como será visto nos itens posteriores, houve um momento em que o sistema que mantinha a temperatura sofreu um problema, causando a diminuição da temperatura do reator para 10 °C, o que prejudicou o desempenho do processo.

5.2.1 Fases de operação

A primeira condição operacional do reator foi a fase de adaptação. Após 13 dias, observou-se que 74% NTK presente no afluenta havia sido oxidado, gerando um efluente com uma concentração média elevada de N-NO₃⁻ (18,2 mg.L⁻¹). A Figura 5.3 apresenta os valores médios da concentração de nitrogênio durante essa fase.

Figura 5.3 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total na fase de adaptação.

A eficiência de remoção de N-total nesta fase foi baixa, apresentando o valor médio de 38%. Esta baixa eficiência está associada à elevada concentração de N-NO_3^- no efluente e a uma parcela de N-NH_4^+ que não foi oxidada. Como o sistema não estava sendo operado sob aeração intermitente, o ambiente estritamente aeróbio pode ter prejudicado a ação dos microrganismos desnitrificantes, gerando este acúmulo de N-NO_3^- no efluente.

Após 13 dias operando na fase de adaptação, mesmo sem atingir 100% de nitrificação, decidiu-se começar a Fase I, dando início à aeração intermitente no sistema. O motivo que levou ao término da fase de adaptação foi a queda da alcalinidade e consequentemente a queda do pH do sistema devido o processo de nitrificação. Como não havia a geração de alcalinidade do sistema pela desnitrificação, o mesmo apresentou alcalinidade igual a zero no 13º dia de operação, com valor de pH abaixo de 6. Com isso, decidiu-se iniciar a primeira fase com aeração intermitente.

A Figura 5.4 mostra a concentração de N-total afluente, N-total efluente e a eficiência de remoção de N-total durante todas as fases de operação do sistema.

Figura 5.4 - Eficiência de remoção de N-total (■), concentração de N-total afluente (▲) e N-total efluente (●) durante todas as fases.

Analisando a Figura 5.4, pode-se verificar que houve uma subdivisão da Fase I, sendo denominadas de Fase I-a e Fase I-b. Esta subdivisão ocorreu devido a um problema operacional no reator, no 61º dia de operação. Neste dia, houve uma queda na temperatura do sistema para 10 °C devido a danos no sistema de aquecimento do reator.

Depois de verificado o dano no sistema que mantinha o reator à temperatura de 30°C, o mesmo passou a operar à temperatura ambiente até o conserto do equipamento, que durou do 61º ao 74º dias de operação (Fase I-b). Neste período, é possível visualizar na Figura 5.4 uma baixa eficiência na remoção de N-total pelo fato de a biomassa não estar adaptada a esta nova temperatura de operação.

Essa baixa eficiência está diretamente relacionada a um aumento da concentração de N- NH_4^+ no efluente (Figura 5.6), que caracteriza uma queda na eficiência de nitrificação do sistema. A taxa máxima de crescimento das *Nitrosomonas* pode variar de 0,3 a 1,2 d⁻¹ quando a temperatura do sistema varia entre 10 °C e 30 °C, respectivamente (EPA, 1993). Ou seja, essa queda de temperatura afetou significativamente a estabilidade e eficiência do sistema, que apresentou eficiências de remoção de N-total de 80±10% e 54±13% para as Fases I-a e I-b, respectivamente.

As Figuras 5.4 e 5.5 mostram as concentrações dos compostos nitrogenados no afluente e efluente durante as Fases I- a e I-b.

Figura 5.5 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N- NH_4^+ , N- NO_2^- , N- NO_3^- e N-total durante a Fase I-a.

Figura 5.6 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a Fase I-b.

A concentração média de N-total efluente na Fase I-a foi de $9,4 \pm 4,2 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo a concentração de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- iguais a $4,9 \pm 4,6 \text{ mg.L}^{-1}$, $4,1 \pm 4,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,7 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e $3,8 \pm 3,1 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Na Fase I-b, as concentrações de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- foram de $12,1 \pm 9,2 \text{ mg.L}^{-1}$, $11,9 \pm 9,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,7 \pm 0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e $4,5 \pm 5,9 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, apresentando concentração média de N-total igual a $17,3 \pm 5,9 \text{ mg.L}^{-1}$. A Figura 5.6 mostra a variação da concentração de NTK, N-NO_2^- e N-NO_3^- no efluente durante as Fases I-a e I-b.

Figura 5.7 - Variação da concentração de NTK (♦), N-NO_3^- (■) e N-NO_2^- (▲) no efluente durante as Fases I-a e I-b.

Com a diminuição do TDH para 10 horas (Fase II), a eficiência de remoção de N-total permaneceu elevada, com valor médio de $80 \pm 17\%$. A Figura 5.8 apresenta as concentrações de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total do afluente e do efluente durante esta fase.

Figura 5.8 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a Fase II.

As concentrações médias de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- no efluente foram iguais a $4,0 \pm 4,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $3,8 \pm 3,7 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,3 \pm 0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $3,9 \pm 5,1 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, resultando em uma concentração de N-total média igual a $8,1 \pm 5,6 \text{ mg.L}^{-1}$.

Analisando a Figura 5.4, é possível verificar um aumento na concentração de N-total efluente por volta do 200°, 270° e 320° dias de operação. Estes aumentos pontuais ocorreram devido a problemas no sistema de aeração do reator. O dispositivo difusor de bolhas utilizado perdia sua capacidade inicial de difusão em decorrência do entupimento de seus poros. Com isso, ocorria aumento da perda de carga e consequente diminuição da vazão de ar fornecida para o sistema. Como não havia monitoramento e controle *online* concentração de O.D., verificava-se a necessidade da troca do dispositivo de difusão de bolhas no instante que a concentração de N-NH_4^+ no efluente aumentava. A Figura 5.9 ilustra a variação temporal da concentração de NTK, N-NO_2^- e N-NO_3^- no efluente durante a Fase II.

Figura 5.9 - Variação da concentração de NTK (♦), N-NO₃⁻ (■) e N-NO₂⁻ (▲) no efluente durante a Fase II.

Após a troca do difusor de bolhas, controlava-se a vazão de ar do aerador a fim de manter a concentração de O.D. entre 2,5 e 3,5 mg.L⁻¹. Entretanto, como este controle era feito manualmente e a estabilização da concentração de O.D. no reator demandava alguns dias para ocorrer, pode ser observado na Figura 5.9 que também ocorreram picos na concentração de N-NO₃⁻, correspondendo aos períodos em que, após a troca do difusor de bolhas, a vazão de ar era muito elevada, mantendo-se uma concentração de O.D. maior do que o estabelecido, gerando N-NO₃⁻ no efluente final em decorrência da queda na eficiência de desnitrificação.

Na Fase III, com TDH de 8 horas, o sistema apresentou queda na eficiência de remoção de N-total, com um valor médio de 70±15%. As concentrações de NTK, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ e N-NO₃⁻ estão apresentados na Figura 5.10.

Figura 5.10 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a Fase III.

Nesta fase, a concentração média de N-total no efluente foi igual a $10,9 \pm 4,8 \text{ mg.L}^{-1}$, superior às demais fases testadas. Deste total, as concentrações de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- foram de $7,9 \pm 5,3 \text{ mg.L}^{-1}$, $4,7 \pm 5,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,5 \pm 0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,4 \pm 2,2 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Pode-se notar que houve uma maior concentração de nitrogênio na forma de NTK e uma menor concentração de N-NO_3^- , quando comparado com as Fases I-a e II. A variação desses compostos pode ser visualizada na Figura 5.11.

Figura 5.11 - Variação da concentração de NTK (♦), N-NO_3^- (■) e N-NO_2^- (▲) no efluente durante a Fase III.

Como pode ser observado na Figura 5.11, houve períodos em que o sistema apresentou baixa concentração de NTK, N-NO_2^- e N-NO_3^- no efluente. Entretanto, verificou-se uma grande

instabilidade do reator, principalmente referente ao processo de nitrificação. Tendo como foco o aumento na eficiência do sistema, foi decidido alterar o período de aeração, passando de 2 horas para 3 horas, com intuito de aumentar a eficiência de nitrificação do sistema, uma vez que, durante a Fase III, houve uma maior concentração de NTK no efluente. O tempo sem aeração foi mantido em 1 hora.

Com isso, manteve-se o TDH de 8 horas e alterou-se o período de aeração (Fase IV). Nesta fase, houve uma melhora na eficiência do sistema, que apresentou eficiência de remoção de N-total igual a $79 \pm 13\%$. A Figura 5.12 mostra as concentrações das formas de nitrogênio no afluente e no efluente.

Figura 5.12 - Concentração média afluente e efluente de NTK, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e N-total durante a Fase IV.

A concentração média de N-total no efluente foi de $9,5 \pm 5,8 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo que as concentrações de NTK, N-NO_2^- e N-NO_3^- foram iguais a $4,6 \pm 6,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,7 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e $4,5 \pm 3,7 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos encontrados na Fase I-a e Fase II. A variação da concentração desses componentes pode ser visualizada na Figura 5.13.

Figura 5.13 - Variação da concentração de NTK (◆), N-NO_3^- (■) e N-NO_2^- (▲) no efluente durante a Fase IV.

A concentração de NTK aumentou bruscamente por volta do 510º dia de operação. Neste período, ocorreu o mesmo problema referente ao difusor de bolhas, havendo a necessidade da troca deste difusor e reestabilização do sistema.

A Tabela 5.2 mostra um resumo das concentrações médias dos compostos nitrogenados e a eficiência de remoção de N-total durante todas as fases estudadas.

Tabela 5.2 - Concentração média dos compostos nitrogenados e eficiência de remoção de nitrogênio total em cada fase.

Condições operacionais	Concentração (mg.L^{-1})									
	Afluente					Efluente				
	NTK	NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-	N_{total}	NTK	NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-	N_{total}
F. adapt.	43,1±9,5	40,0±12,4	0,2±0,1	0,3±0,1	43,6±9,7	10,5±3,3	10,1±4,6	0,9±1,4	14,6±11,1	26,0±7,1
Fase I-a	48,1±11,4	34,9±11,0	0,4±0,8	0,4±0,9	48,9±11,3	4,9±4,6	4,1±4,1	0,7±0,7	3,8±3,1	9,4±4,2
Fase I-b	38,6±10,7	30,1±11,1	---	0,1±0,2	38,7±10,7	12,1±9,2	11,9±9,5	0,7±0,9	4,5±5,9	17,3±5,9
Fase II	42,4±11,9	30,4±8,1	0,3±0,5	0,8±1,8	43,5±11,8	4,0±4,1	3,8±3,7	0,3±0,4	3,9±5,1	8,2±5,6
Fase III	37,3±10,4	27,8±8,0	0,2±0,4	0,2±0,7	37,7±10,5	7,9±5,3	4,7±5,1	0,5±0,4	2,5±2,2	10,9±4,8
Fase IV	41,1±14,9	29,4±11,3	0,2±0,4	0,4±1,1	41,7±15,0	4,6±6,5	4,5±13,9	0,7±1,3	4,5±3,7	9,8±5,8

As concentrações referentes à NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^- se referem a concentração de nitrogênio na forma dos íons apresentados

--- não detectado

Após a alteração do TDH de 12 horas (Fase I-a) para 10 horas (Fase II) e posteriormente para 8 horas (Fase IV), o sistema manteve-se eficiente, mostrando uma ótima remoção de N-total. Moura *et al.* (2012), utilizando o mesmo modelo de reator tratando esgoto sintético, observaram queda na eficiência de remoção de nitrogênio quando o TDH do sistema diminuiu de 12 horas para 10 horas. O autor concluiu que, com o aumento da vazão, ocorreu aumento da carga diária de

matéria orgânica no sistema, que pode ter promovido um maior desenvolvimento dos microrganismos heterotróficos aeróbios, prejudicando a atuação das bactérias nitrificantes. Com isso, houve queda na eficiência de remoção de N-total.

Esta queda na eficiência de remoção de nitrogênio não foi observada neste experimento com a diminuição do TDH. Uma hipótese para esta diferença seria algumas diferenças nas características do esgoto sanitário real e do sintético. No esgoto real, existe uma parcela da DBO biodegradável que é rapidamente consumida e uma parcela que é lentamente consumida (METCALF e EDDY, 2003). No esgoto sintético, a maior parte da DBO está na forma de compostos de rápida degradação, como a sacarose. Com isso, a diminuição do TDH no sistema operando com esgoto real pode ter gerado carga orgânica aplicada dos compostos que são biodegradados rapidamente em menor concentração do que as aplicadas ao reator alimentado com substrato sintético. Esta carga menor pode não ter influenciado significativamente no desenvolvimento dos microrganismos nitrificantes, mantendo-se sua atividade e consequentemente a eficiência do sistema.

Esses resultados mostram uma eficiência satisfatória de remoção de nitrogênio quando comparada com pesquisas atuais sobre o processo simultâneo de nitrificação e desnitrificação. Liu e Dong (2011) trabalharam com um reator com grânulos aeróbios e sob microaeração, alimentado com esgoto sanitário doméstico, e obtiveram eficiência de 80% na remoção de nitrogênio total com o reator operando com um TDH de 8 horas e 10 horas.

Utilizando um reator com 4 compartimentos, cada compartimento dividido em um ambiente aeróbio e outro anóxico, Wang *et al.* (2012) obtiveram eficiência de remoção de nitrogênio entre 81 e 90%. Este reator foi alimentado em cada um dos compartimentos com esgoto real, com TDH de 8 horas. A concentração de OD nos compartimentos aeróbios ficou entre 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹.

Moura *et al.* (2012) trabalharam com um reator de leito estruturado, submetido a aeração intermitente e recirculação do efluente, e obtiveram uma eficiência total de 82% na remoção de N-total com um TDH de 12 horas.

Barana *et al.* (2013) utilizaram um reator de leito estruturado e aeração intermitente para a remoção de matéria orgânica e nitrogênio do efluente de um reator anaeróbio de um abatedouro de aves. Operando com período de 1 hora de aeração seguido de 2 horas sem aeração, o sistema alcançou uma eficiência de remoção N-total de 62%, com um TDH de 24 horas.

No trabalho de Santos (2014), operando um reator LEAI alimentado com efluente sintético (relação C/N igual a 2,9), foram obtidas eficiências de remoção de N-total de 84,6%, com períodos de aeração e não aeração iguais a 2 horas e 1 hora respectivamente. A razão de recirculação utilizada foi igual a 5 e o TDH igual a 12 horas.

Os resultados obtidos neste trabalho se mostraram satisfatórios com relação à remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário, alcançando valores semelhantes a trabalhos recentes visando a remoção conjunta desses poluentes em uma única unidade.

5.2.2 Análise estatística

A Figura 5.14 mostra um *Box-plot* de distribuição dos resultados de eficiência de remoção de N-total para todas as fases testadas. O *Box-plot* é uma ferramenta estatística que possibilita a visualização da distribuição dos pontos amostrados, apresentado no *Box* a mediana (50%), o primeiro quartil (25%) e o terceiro quartil (75%). Também são discriminados os valores de máximo e mínimo da distribuição. Para esse tipo de representação, afirma-se que, quanto maior a altura do *Box* interior, maior será a variação dos resultados, consequentemente, maior será o desvio padrão.

Figura 5.14 - Box-plot da eficiência de remoção de N-total em cada fase.

A Figura 5.14 mostra uma boa estabilidade do sistema durante a Fase I-a, Fase II e Fase IV, atingindo uma eficiência média por volta de 80%. Também pode ser visualizado, durante as Fases I-a e II, que o valor da mediana é superior ao da média, indicando que a maior parte dos resultados de eficiência foram superiores ao valor médio encontrado. Como houve alguns resultados de eficiência discrepantes, a média acabou sendo influenciada por esses valores, resultando em um valor médio menor que a mediana.

Para verificar se existe diferença estatística entre os valores médios de eficiência de remoção em cada fase, aplicou-se o teste de Kruskal Wallis com o auxílio do *software Microsoft Excel 2007*. O resumo dos resultados encontrados está apresentado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Comparação entre as eficiências médias de remoção de N-total para cada fase.

Fatores Comparados	Diferença
Fase I-a - Fase I-b	Sim
Fase I-a - Fase II	Não
Fase I-a - Fase III	Não
Fase I-a - Fase IV	Não
Fase I-b - Fase II	Sim
Fase I-b - Fase III	Não
Fase I-b - Fase IV	Sim
Fase II - Fase III	Sim
Fase II - Fase IV	Não
Fase III - Fase IV	Não

Como pode ser observado, considerando um grau de incerteza de 5%, não se observou diferença estatística da eficiência de remoção de N-total nas Fases I-a, II, e IV. Apesar da menor eficiência encontrada na Fase III, este valor não é estatisticamente diferente quando comparado com as eficiências das Fases I-a e IV, sendo esta eficiência menor apenas quando comparado com a Fase II.

A remoção de N-total na Fase I-b foi estatisticamente menor do que as Fases I-a, II e IV, não havendo diferença estatística somente quando comparado com a eficiência da Fase III. Ou seja, pode-se concluir que as fases menos eficientes foram as Fases I-b e III.

5.3 Remoção de DQO

5.3.1 Fases de operação

A Figura 5.15 mostra a variação da concentração de DQO durante as fases de operação.

Figura 5.15 - Eficiência de remoção de DQO (■), concentração de DQO afluenta (▲) e DQO efluente (●) durante todas as fases.

Os valores de DQO médios no afluente, no efluente, e a eficiência de remoção total estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Concentração média de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção de DQO nas fases.

Fases	DQO afluente (mg.L ⁻¹)	DQO efluente (mg.L ⁻¹)	Eficiência (%)
F. Adaptação	415 ± 40	37 ± 18	91 ± 5
Fase I-a	549 ± 148	34 ± 14	93 ± 4
Fase I-b	371 ± 100	53 ± 23	86 ± 5
Fase II	492 ± 172	44 ± 28	90 ± 6
Fase III	455 ± 124	45 ± 23	90 ± 5
Fase IV	398 ± 135	37 ± 24	90 ± 6

É possível verificar a elevada eficiência de remoção de DQO em todas as condições operacionais testadas, que atingiu valores iguais ou superiores a 90%. Na Fase I-b, na qual houve a queda da temperatura do reator, a eficiência de remoção de DQO apresentou uma ligeira queda, com valor médio de 86 ± 5%.

Este resultado está de acordo com o obtido no trabalho de Moura *et al.* (2012), que obtiveram eficiências entre 85% e 90% de remoção de DQO com o TDH variando entre 12 e 8 horas. Os autores trabalharam com o mesmo tipo de reator e com períodos de 2 horas de aeração seguidos de 1 hora sem aeração, alimentando-o com esgoto sanitário sintético.

Barana *et al.* (2013) utilizaram um reator de leito estruturado e aeração intermitente na remoção de matéria orgânica e nitrogênio do efluente proveniente de um reator UASB que tratava os efluentes de um abatedouro de aves. Variando os períodos de aeração e não aeração, o sistema apresentou boa estabilidade na remoção de DQO, com uma eficiência superior a 88% durante todo o período de operação do sistema.

Santos (2014) operou um reator LEAI com diferentes relações C/N e em todas as condições testadas foram obtidas eficiências média de remoção de DQO iguais a 90%.

A variação na concentração de DQO do afluente foi devida às variações sazonais das características do esgoto sanitário. Como esgoto sanitário era desviado diretamente de um coletor de

esgoto, havia flutuações em sua composição durante todo o dia, refletindo diretamente na DQO do afluente do reator. Por outro lado, a concentração efluente de DQO sempre se manteve baixa, mostrando que, apesar das variações da concentração do afluente, o sistema se manteve estável, com remoção elevada de DQO.

5.3.2 Análise estatística

Do mesmo modo que foi feito para a remoção de nitrogênio, utilizou-se o gráfico do estilo *Box-plot* para mostrar os valores médios de eficiência e a estabilidade de cada fase. Esse gráfico está apresentado na Figura 5.16.

Figura 5.16 - Box-plot da eficiência de remoção de DQO em cada fase.

Como pode ser visualizado, em todas as fases testadas, o reator apresentou uma boa estabilidade na remoção de DQO, resultando em *Box* com pequenas alturas. Com a queda na temperatura durante a Fase II-b, o sistema apresentou menor eficiência. Entretanto, a estabilidade

também foi mantida nesta fase. A maior eficiência, juntamente com maior estabilidade, foi encontrada na Fase I-a, alcançando valor médio igual a $93 \pm 4 \%$.

Para verificar se houve diferença estatística entre as eficiências de cada fase, foi aplicado o teste estatístico de Kruskal Wallis com o auxílio do *software Microsoft Excel 2007*. O resumo dos resultados está apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Comparação entre as eficiências médias de remoção de DQO para cada fase.

Fatores Comparados	Diferença
Fase I-a - Fase I-b	Sim
Fase I-a - Fase II	Não
Fase I-a - Fase III	Não
Fase I-a - Fase IV	Não
Fase I-b - Fase II	Não
Fase I-b - Fase III	Não
Fase I-b - Fase IV	Não
Fase II - Fase III	Não
Fase II - Fase IV	Não
Fase III - Fase IV	Não

Como pode ser visto, admitindo um erro de 5%, é possível afirmar que houve diferença estatística na eficiência de remoção de DQO somente entre a Fase I-a e Fase I-b. Entre as demais fases, não é possível afirmar qual foi mais eficiente, uma vez que o teste diz que a eficiência média de remoção de DQO são iguais.

5.4 Remoção de fósforo

Durante todas as fases, foram determinadas as concentrações de fósforo afluente e efluente no reator. Os valores médios de concentração estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Concentração média afluente e efluente de P-PO_4^{-3} .

Fases	P-PO_4^{-3} Afluente (mg.L^{-1})	P-PO_4^{-3} Efluente (mg.L^{-1})
Fase I-a	$5,1 \pm 1,5$	$3,8 \pm 1,5$
Fase II	$3,8 \pm 2,1$	$2,6 \pm 1,7$
Fase III	$2,7 \pm 1,0$	$1,3 \pm 1,1$
Fase IV	$2,8 \pm 0,7$	$3,9 \pm 2,2$

Como pode ser observado, não houve uma variação significativa na concentração de fósforo afluente e efluente, indicando que o sistema não foi eficiente na remoção deste composto. Pode ser visualizado também concentrações médias efluentes maiores que as concentrações médias afluente.

Para que ocorra a remoção de fósforo em sistemas biológicos, é necessária uma etapa anaeróbia seguida de uma etapa aeróbia. Na etapa anaeróbia, os organismos acumuladores de fósforo armazenam ácidos voláteis, como polihidroxibutirato (PHB) e polihidroxivalerato (PHV), liberando fosfato para o meio líquido devido à quebra das moléculas de polifostato, que estavam armazenadas nestes organismos, para a obtenção de energia. Já na etapa aeróbia, estes microrganismos metabolizam a reserva interna de PHA e PHV, sendo a energia proveniente desta oxidação utilizada para acumular fósforo, que estava presente no meio líquido, na forma de polifosfato, sendo este armazenado em excesso por estes microrganismos. Sendo assim, o fósforo é efetivamente removido quando essa massa de microrganismos que acumularam fósforo é retirada do sistema (VAN LOODSDRECHT *et al.*, 1997; WEF, 2010).

Como o reator em estudo apresentava períodos aerados e não aerados, é provável que ocorresse a liberação de fósforo para o meio líquido nos períodos em o reator se encontrava sem aeração, gerando uma concentração de fosfato efluente maior que a concentração afluente. Já nos períodos com aeração, este fosfato era acumulado no interior dos organismos acumuladores de fósforo, havendo a queda na concentração de fosfato no efluente. Como a coleta das amostras do afluente e efluente do reator eram feitas em horários variados, os valores médios encontrados e seu respectivo desvio padrão mostram que o reator não apresentou remoção significativa deste nutriente.

5.5 Ensaios cinéticos

Tanto no ensaio de nitrificação, quanto no ensaio de desnitrificação, observou-se que os dados obtidos ajustam-se a modelo de reação de ordem zero, na qual a velocidade da reação não é afetada pela concentração dos substratos. A Equação 5.1 mostra equação para ordem zero.

$$(-r_{N'}) = \frac{dC_{N'}}{dt} = k_0 \quad (\text{Equação 5.1})$$

Em que:

k_0 = constante cinética específica de ordem zero (mgN.gSSV⁻¹.h⁻¹)

Integrando-se a Equação 4.6 para a concentração inicial de nitrogênio ($C_{N0'}$) no tempo inicial t_0 até a concentração $C_{N'}$ no tempo t , obtém-se a expressão que indica a variação da concentração específica de nitrogênio linearmente com o tempo (Equação 5.2).

$$C_{N'} = C_{N0'} - k_0 \cdot (t - t_0) \quad (\text{Equação 5.2})$$

No ensaio cinético de desnitrificação para a Fase I, observou-se a formação de N-NO₂⁻ como intermediário, caracterizando o modelo como cinética em série (Equação 5.3).

Com isso, foram determinadas as velocidades específicas de consumo de N-NO₃⁻ (k_1) e de consumo de N-NO₂⁻ (k_2). Nos demais ensaios, não houve acúmulo de nitrito, obtendo-se somente uma velocidade de desnitrificação. Para todas as fases, o comportamento da reação foi semelhante ao de reações de ordem zero.

A Tabela 5.7 mostra os resultados médios obtidos em cada ensaio cinético realizado nas Fases I-a, II, III e IV.

Tabela 5.7 - Parâmetros cinéticos em cada fase de operação.

Fases	Velocidade de nitrificação		Velocidade de desnitrificação	
	via N-NH_4^+ ($\text{mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	via N-NO_2^- ($\text{mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	k_1 ($\text{mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	k_2 ($\text{mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Fase I-a	$1,8 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,9$	$4,3 \pm 0,6$
Fase II	$2,2 \pm 0,2$	$7,2 \pm 1,1$		$3,8 \pm 1,3$
Fase III	$2,7 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$		$7,3 \pm 2,0$
Fase IV	$1,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$		$3,6 \pm 0,2$

Observa-se que a velocidade de nitrificação via N-NH_4^+ foi semelhante em todas as fases. As velocidades de nitrificação via N-NO_2^- também são semelhantes entre si em todas as fases, com exceção da Fase II, que apresentou a maior velocidade de nitrificação via N-NO_2^- .

As velocidades de nitrificação via N-NO_2^- foram um pouco superiores às velocidades de nitrificação via N-NH_4^+ (com exceção da Fase III, cujos valores foram muito próximos), indicando uma maior atividade dos microrganismos oxidadores de nitrito. Sabe-se que a velocidade máxima específica de crescimento dos microrganismos oxidadores de nitrito é superior à velocidade máxima específica dos microrganismos oxidadores de amônia. Com isso, a oxidação de amônia a nitrito torna-se a etapa limitante no processo de nitrificação (EPA, 1993; WEF, 2010). Esse fato também pode ser observado na Figura 5.17 (gráficos 1, 4, 7 e 10), em que não se observa o acúmulo de nitrito nos ensaios de nitrificação via N-NH_4^+ .

As velocidades de desnitrificação foram semelhantes durante as Fases I-a, II e IV. Na Fase I-a, como pode ser visualizado na Figura 5.17 (3), houve um acúmulo de nitrito durante o ensaio cinético, tornando-se possível obter a velocidade de desnitrificação até nitrito e de nitrito até N_2 (k_1 e k_2 respectivamente). Entretanto, esse comportamento não ocorreu durante as demais fases, nos quais houve geração de quantidade mínima de nitrito durante o ensaio de desnitrificação. Por esse motivo, não foi possível obter as velocidades de desnitrificação até nitrito e de nitrito até N_2 .

Moura (2011) obteve valores médios de velocidade de nitrificação via amônia e via nitrito de $1,4 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $1,5 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. A biomassa foi obtida com o reator

operando com um TDH de 12 horas, alimentado com esgoto sanitário sintético e com períodos de aeração de 2 horas e não aeração 1 hora. A velocidade de desnitrificação também foi determinada, com velocidades de desnitrificação até nitrito e de nitrito a N_2 , sendo $3,7 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $2,6 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Naquele caso, ocorreu um pequeno acúmulo de nitrito na desnitrificação.

Os resultados obtidos neste trabalho, durante todas as fases estudadas, se assemelham aos obtidos por Moura (2011), que utilizou um reator visando à remoção conjunta de nitrogênio e matéria orgânica. Chu e Wang (2011) também utilizaram um reator de leito móvel visando à nitrificação e desnitrificação em um único reator. Os autores obtiveram velocidades de nitrificação via $N\text{-NH}_4^+$ e velocidade de desnitrificação iguais a $3,6 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $13 \text{ mgN-NO}_3^-.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Santos (2014) trabalhou com um reator de leito estruturado e aeração intermitente operando com efluente sintético sob diferentes relações de C/N. As velocidades de nitrificação via amônia, via nitrito e a velocidade de desnitrificação foram iguais a $5,48 \text{ mgN-NH}_4^+.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $4,97 \text{ mgN-NO}_2^-.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $6,59 \text{ mgN-NO}_3^-.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivamente. Como esse sistema também removia simultaneamente matéria orgânica e nitrogênio, os resultados cinéticos obtidos foram semelhantes aos deste estudo.

Por outro lado, quando se comparam as velocidades obtidas neste reator com as velocidades de nitrificação e nitratação obtidas em reatores estritamente nitrificantes, observa-se uma grande diferença, uma vez que as velocidades encontradas em sistemas com nitrificação e desnitrificação simultânea juntamente com a remoção de matéria orgânica são bem inferiores.

Figura 5.17 - Perfis dos ensaios cinéticos. (1) Ensaio nitrificante via N- NH_4^+ - Fase I-a; (2) Ensaio nitrificante via N- NO_2^- - Fase I-a; (3) Ensaio desnitrificante - Fase I-a; (4) Ensaio nitrificante via N- NH_4^+ - Fase II; (5) Ensaio nitrificante via N- NO_2^- - Fase II; (6) Ensaio desnitrificante - Fase II; (7) Ensaio nitrificante via N- NH_4^+ - Fase III; (8) Ensaio nitrificante via N- NO_2^- - Fase III; (9) Ensaio desnitrificante - Fase III; (10) Ensaio nitrificante via N- NH_4^+ - Fase IV; (11) Ensaio nitrificante via N- NO_2^- - Fase IV; (12) Ensaio desnitrificante - Fase IV; N- NH_4^+ (▲), N- NO_2^- (◆) e N- NO_3^- (■).

Isso ocorre porque há competição entre os microrganismos nitrificantes e os heterotróficos aeróbios. Como o afluente possuía matéria orgânica, os microrganismos heterotróficos competem pelo oxigênio com os nitrificantes, gerando um menor desenvolvimento da comunidade nitrificante e, conseqüentemente, diminuindo a atividade nitrificante do sistema. Villaverde *et al.* (1997) obtiveram velocidades entre $15 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $50 \text{ mgN.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ operando um filtro submerso estritamente nitrificante, valores estes superiores ao encontrado neste trabalho.

Com relação à desnitrificação, as velocidades obtidas neste experimento também foram inferiores aos resultados encontrados na literatura em pesquisas com reatores especificamente

desnitrificantes. Reyes-Avila *et al.*(2004) obtiveram velocidades de desnitrificação de 12,5 mgN.gSSV⁻¹.h⁻¹ em ensaios com reatores em batelada, utilizando acetato como fonte de doadores de elétrons.

Neste caso, vale a mesma explicação dada anteriormente. Como o reator em estudo não era estritamente desnitrificante (possuía períodos aeróbios, por exemplo), havia uma competição entre os microrganismos anóxicos e aeróbios, gerando um menor desenvolvimento da comunidade desnitrificante quando comparados a sistemas especificamente desnitrificantes.

Além disso, também existe um "erro" ao se calcular a velocidade específica tanto de nitrificação quanto de desnitrificação. Ao dividir o coeficiente da reta obtido no ensaio cinético pela massa de SSV presente em cada ensaio, está se assumindo que a população de microrganismos da biomassa é estritamente nitrificante ou desnitrificante. Entretanto, a biomassa do reator é composta por microrganismos nitrificantes, desnitrificantes e microrganismos responsáveis pela remoção de matéria orgânica, pois todos estes processos ocorriam simultaneamente no reator. Com isso, ao se utilizar o parâmetro SSV para calcular as velocidades específicas, estará se obtendo um valor inferior ao valor caso fosse obtida apenas a massa de microrganismos nitrificantes/desnitrificantes.

5.6 Número mais provável (NMP)

Os resultados obtidos de NMP em cada uma das condições operacionais estão apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Resultados do ensaio de número mais provável em todas as fases.

	Bactérias oxidadoras de amônia (NMP/100 mL)	Bactérias oxidadoras de nitrito (NMP/100 mL)	Bactérias desnitrificantes (NMP/100 mL)
Fase I-a	2,4E+10	1,7E+8	2,3E+10
Fase II	1,1E+11	1,3E+9	1,7E+10
Fase III	3,3E+10	1,3E+8	3,3E+10
Fase IV	4,9E+8	6,8E+7	1,3E+11

Os valores de NMP das bactérias oxidadoras de amônia em todas as etapas foram superiores ao NMP das bactérias oxidadoras de nitrito. Alguns estudos também já verificaram esse

comportamento (MENDONÇA, 2002; KIELING, 2004; DANIEL, 2005; SPÍNOLA, 2009). Esses resultados podem estar relacionados com o fato de a oxidação da amônia liberar mais energia para o crescimento celular. A energia livre obtida pela oxidação de 1 mol de amônia até nitrito varia entre 58 e 84 kcal, enquanto que a energia livre obtida para a oxidação de 1 mol de nitrito até nitrato varia entre 15,4 e 20,9 kcal. Admitindo-se que a produção celular é função da energia livre obtida, a massa de microrganismos oxidadores de amônia deve ser maior que os microrganismos oxidadores de nitrito (EPA, 1993).

Com o abaixamento do TDH de 12 horas para 10 horas (Fase I-a para Fase II), pode ser verificado um aumento na população dos microrganismos nitrificantes. Este aumento pode estar relacionado com uma maior carga nitrogenada aplicada ao sistema, aumentando a disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos nitrificantes e, conseqüentemente, gerando um maior crescimento destes microrganismos.

Ao se alterar o TDH de 10 horas para 8 horas (Fase II para Fase III), observou-se queda na concentração dos microrganismos nitrificantes, queda esta que pode ter causado a diminuição na eficiência de nitrificação do reator, diminuindo, conseqüentemente, a eficiência de remoção de N-total no sistema. Uma hipótese que explicaria este fato é que, com o aumento da vazão, mesmo com uma carga nitrogenada aplicada mais elevada, pode ter havido um maior desenvolvimento dos microrganismos heterotróficos aeróbios/facultativos, devido à maior carga de matéria orgânica aplicada ao reator. Este aumento pode ter desfavorecido o desenvolvimento dos microrganismos nitrificantes autotróficos, que competiam pelo oxigênio com os microrganismos heterotróficos. Com isso, houve uma diminuição no NMP dos microrganismos nitrificantes e um aumento no NMP dos microrganismos desnitrificantes, resultado de um maior desenvolvimento de microrganismos heterotróficos facultativos.

Durante a Fase IV, na qual houve um aumento no período de aeração, verificou-se queda no NMP dos microrganismos nitrificantes e aumento nos NMP dos microrganismos desnitrificantes.

Entretanto, apesar do menor número dos microrganismos nitrificantes, a nitrificação durante esta fase foi eficiente. Já na Fase III, observou-se um maior número de microrganismos oxidadores de amônia, quando comparada com a Fase IV. Todavia, apesar do NMP maior, a eficiência de nitrificação foi menor, reafirmando a hipótese de que, apesar da presença dos microrganismos nitrificantes, estes estavam sendo prejudicados pela competição pelo oxigênio com os microrganismos heterotróficos aeróbios.

Ao aumentar o período de aeração (Fase IV), apesar do NMP de microrganismos nitrificantes ter sido menor, estes não foram prejudicados pela competição por oxigênio com os microrganismos heterotróficos, promovendo uma boa eficiência de nitrificação.

Os valores de NMP dos microrganismos desnitrificantes variaram valores entre $1,7 \times 10^{-10}$ e $1,3 \times 10^{11}$ NMP/100 mL, apresentando menor oscilação, quando comparado com os resultados de NMP dos microrganismos nitrificantes.

5.7 Perfis temporais

A fim de verificar se o efluente do reator apresentava variações em suas características, durante os ciclos de aeração e não aeração, foram realizados perfis temporais do efluente do reator, com amostragem de 30 em 30 minutos, durante o período de um ciclo completo. Os resultados destes ensaios estão apresentados na Figura 5.18.

Figura 5.18 - Perfis temporais durante a Fase I -a, Fase II, Fase III e Fase IV. N-NH_4^+ (▲), N-NO_2^- (◆), N-NO_3^- (■) e OD (●).

Os resultados referentes às Fases I-a, II e III mostram que há variação da concentração de OD durante o ciclo de 3 horas. No início da aeração, há um aumento rápido na concentração de OD,

chegando à faixa de 2,5-4,0 mg.L⁻¹. No momento em que a aeração é desligada, há uma queda rápida da concentração de OD, chegando até zero no final desta etapa.

Com relação à Fase IV, durante a qual se aumentou o período de aeração de 2 horas para 3 horas, observou-se uma elevação rápida da concentração de OD, atingindo 4,5 mg.L⁻¹ logo nos primeiros 30 minutos, tendo esse valor sido mantido até 150 minutos de aeração. Após este período, verificou-se aumento da concentração de OD, atingindo uma concentração no final do período aerado de 7,5 mg.L⁻¹. Com o término do período de aeração, a concentração de OD caiu rapidamente, com valores próximos a zero em 30 minutos sem aeração.

Apesar dessa variação da concentração de OD, as concentrações de amônia, nitrito e nitrato se mantiveram constantes em todos os ensaios, indicando que não há variações nas características do efluente durante os ciclos de aeração e não aeração. Os resultados dos perfis temporais corroboram com os resultados obtidos no ensaio hidrodinâmico, concluindo que o sistema apresenta características de escoamento próximas a reatores de mistura completa.

5.8 Análise dos sólidos e descarte de lodo

Os resultados das análises da série de sólidos durante a Fase I e Fase II estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Valores de sólidos nas fases estudadas. ST - sólidos totais, STV - sólidos totais voláteis, STF - sólidos totais fixos, SST - sólidos suspensos totais, SSV - sólidos suspensos voláteis, SSF - sólidos suspensos fixos.

	Fase I		Fase II		Fase III		Fase IV	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
ST (mg.L ⁻¹)	574 ± 131	302 ± 56	645 ± 78	423 ± 43	407 ± 105	210 ± 68	477 ± 89	235 ± 28
STV (mg.L ⁻¹)	388 ± 86	168 ± 51	407 ± 85	227 ± 47	220 ± 75	70 ± 28	320 ± 64	102 ± 18
STF (mg.L ⁻¹)	186 ± 57	134 ± 7	238 ± 22	196 ± 64	187 ± 48	140 ± 14	157 ± 52	133 ± 15
SST (mg.L ⁻¹)	166 ± 52	10 ± 5	159 ± 56	54 ± 16	244 ± 68	110 ± 8	216 ± 61	50 ± 11
SSV (mg.L ⁻¹)	130 ± 32	7 ± 8	121 ± 36	32 ± 9	189 ± 45	108 ± 6	202 ± 57	50 ± 8
SSF (mg.L ⁻¹)	36 ± 22	4 ± 5	38 ± 22	21 ± 10	50 ± 32	2 ± 3	14 ± 12	0 ± 3

Como pode ser visualizado, há uma queda na concentração de sólidos do efluente quando comparada com o afluente em todas as fases. A concentração máxima de sólidos totais no efluente foi de 423 mg.L⁻¹ (Fase II) e a concentração mínima foi de 210 mg.L⁻¹ (Fase III). Esses valores são

baixos quanto comparados com a concentração de SSV em reatores de mistura completa e biomassa suspensa, como lodos ativados (METCALF e EDDY, 2003), eliminando ou diminuindo a dimensão das unidades de clarificação do efluente.

Com relação aos sólidos suspensos, observou-se maior concentração de biomassa nas Fases III e IV. Esse aumento pode estar relacionado a uma maior velocidade vertical do líquido no interior do reator devido ao aumento da vazão e consequentemente a vazão de recirculação. Com uma maior velocidade, pode haver uma maior facilidade da biomassa de desprender da espuma, saindo no efluente final. Entretanto, mesmo nas Fases III e IV, essas concentrações de sólidos suspensos foram baixas, com um valor máximo de SST igual a 110 mg.L^{-1} .

Um fato interessante apresentado por esse reator está relacionado à produção de lodo. Durante todo o período de operação, houve apenas dois momentos em que se realizou descarte de lodo do fundo do reator (que ocorreram nos dias 158 e 203), com características apresentadas na Tabela 5.10. Estes descartes foram realizados pelo fato de que, nestas épocas, verificou-se um aumento da concentração de sólidos no efluente. Todavia, verificou-se posteriormente que esse aumento da concentração de sólidos estava relacionado ao modo em que se coletava o efluente, uma vez que havia acúmulo de sólidos na mangueira de saída do efluente e estes sólidos eram descarregados eventualmente no momento de coleta do efluente, aumentando a concentração de sólidos. Com a alteração do modo de coleta do efluente, este aumento na concentração de sólidos no efluente não foi mais verificado, não havendo mais descarte de biomassa do reator.

Tabela 5.10 - Concentração e período de descarte de lodo do reator. ST - sólidos totais, STV - sólidos totais voláteis, STF - sólidos totais fixos.

Dia de operação	Descarte de Lodo	
	158° (Fase I)	203° (Fase II)
ST (mg.L^{-1})	3947	6319
STV (mg.L^{-1})	2975	4375
STF (mg.L^{-1})	972	1944

Durante as Fases I, II, III e IV, foi verificada a presença de organismos semelhantes a pequenos vermes no efluente do reator. Foi realizada uma microscopia óptica deste organismo e as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 5.19.

Figura 5.19 - Microscopia realizada do Metazoário *Aelosoma sp* presente no efluente do reator.

Analisando a literatura, verificou-se que esse microrganismo é semelhante ao metazoário *Aelosoma sp*, que é característico de reatores bem estabilizados que apresentam efluentes com boas qualidades e possível presença de nitrato. Este tipo de organismo é aeróbio e se alimenta das próprias bactérias do reator, sendo abundantes em tanques de aeração das estações de tratamento de esgoto que apresentam boas condições de operação (JENKINS *et al.*, 2003). Espécies de metazoários e protozoários também têm sido relacionadas com boa qualidade do tratamento de efluentes, podendo fornecer instrumentos úteis para avaliar o desempenho desses sistemas (GINORIS *et al.*, 2007).

Além de serem indicadores de boa qualidade do efluente e bom funcionamento do reator, Rensink *et al.* (1997) verificaram uma queda na produção de lodo em um reator de lodos ativados de 0,40 para 0,15 gSS.gDQO⁻¹ com a adição de metazoários no reator. Os autores também observaram um aumento da concentração de nitrato e fosfato no efluente. Com isso, pode-se inferir que a baixa concentração de sólidos no efluente e o baixo descarte de lodo do reator pode estar diretamente relacionado à presença de *Aelosoma sp*, pois este poderia estar degradando o excesso de lodo do reator.

5.9 pH e Alcalinidade

Os valores médios de pH e alcalinidade em todas as fases estão apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Valores médios de pH e alcalinidade em cada fase.

	Afluente		Efluente	
	pH	Alcalinidade total (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	pH	Alcalinidade total (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)
Fase I-a	7,0 ± 0,2	176,2 ± 32,5	7,1 ± 0,2	59,3 ± 26,8
Fase II	7,0 ± 0,2	186,4 ± 40,8	7,3 ± 0,2	70,6 ± 25,9
Fase III	7,0 ± 0,1	159,9 ± 26,0	7,4 ± 0,2	78,7 ± 31,4
Fase IV	7,1 ± 0,1	179,6 ± 37,4	7,2 ± 0,3	54,9 ± 40,9

Como pode ser observado, houve pouca variação no pH tanto no afluente quanto no efluente. Os valores médios de pH estão próximos à neutralidade, favorecendo o desenvolvimento dos microrganismos nitrificantes, desnitrificantes e heterotróficos aeróbios.

Sabe-se que no processo de oxidação de N-NH₄⁺ até N-NO₃⁻ há um consumo de alcalinidade e que, no processo de desnitrificação, existe a geração de 50% da parcela de alcalinidade consumida na nitrificação. Ou seja, em sistemas que promovem a nitrificação e desnitrificação em unidades separadas, pode-se tornar necessária a adição de um alcalinizante no reator nitrificante para que não haja uma queda no pH do sistema devido à baixa alcalinidade.

Com base nos dados obtidos neste trabalho, a alcalinidade média afluente do esgoto sanitário é igual a 175,5 mg.L⁻¹ (como CaCO₃). Considerando a concentração média de NTK igual a 41,8 mg.L⁻¹, caso houvesse a nitrificação completa desse nitrogênio em um reator estritamente nitrificante (desconsiderando a alcalinidade gerada pela amonificação do N-orgânico), haveria um consumo de 298,2 mg.L⁻¹ de alcalinidade (como CaCO₃), gerando a necessidade de se adicionar algum composto alcalinizante para evitar a queda no pH do reator.

Entretanto, os resultados deste trabalho mostraram que não houve a necessidade de se adicionar alcalinizante no sistema, fato este que pode resultar na redução dos custos de operação quando do uso desse tipo de reator. A Tabela 5.12 apresenta um balanço de massa feito com relação à alcalinidade teórica e real do efluente.

Tabela 5.12 - Balanço de massa referente ao consumo e geração de alcalinidade no meio em casa fase.

	Nitrogênio nitrificado (mgN.L ⁻¹) ¹	Nitrogênio amonificado (mgN.L ⁻¹) ²	Nitrogênio desnitrificado (mgN.L ⁻¹) ³	Alcalinidade total consumida (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	Alcalinidade total gerada (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	Alcalinidade efluente teórica (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	Alcalinidade efluente real (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)
Fase I-a	43,2	12,4	39,8	308,4*	186,4**	54,1	59,3 ± 26,8
Fase II	38,4	11,8	35,3	274,2*	168,1**	80,4	70,6 ± 25,9
Fase III	29,4	6,3	27,1	209,9*	119,2**	69,2	78,7 ± 31,4
Fase IV	36,5	11,6	32,4	260,6*	157,1**	76,1	54,9 ± 40,9

¹ Nitrogênio nitrificado = (NTK afluente - NTK efluente)

² Nitrogênio amonificado = [(NTK afluente - N-NH₄⁺ afluente) - (NTK efluente - N-NH₄⁺ efluente)]

³ Nitrogênio desnitrificado = [N-NO₃⁻ afluente + (NTK afluente - NTK efluente) - N-NO₃⁻ efluente]

*Cada miligrama de N-NH₄⁺ nitrificado gera um consumo de 7,14 miligrama de alcalinidade (como CaCO₃) (WEF, 2010)

**Cada miligrama de N-NO₃⁻ desnitrificado gera 3,57 miligrama de alcalinidade (como CaCO₃) (WEF, 2010)

**Cada miligrama de N-orgânico amonificado gera 3,57 miligrama de alcalinidade (como CaCO₃) (Van Haandel e Marais, 1999)

Considerando que o afluente apresenta variação da alcalinidade durante o dia e que o balanço de massa foi feito considerando os valores médios de alcalinidade afluente e efluente, pode-se afirmar que os valores teóricos calculados são próximos aos valores reais encontrados.

Um fato interessante observado durante todo o período de operação do sistema foi a relação entre a alcalinidade total efluente com a concentração de N-NH₄⁺ efluente. A Figura 5.20 mostra um gráfico relacionando os valores de alcalinidade total efluente com os respectivos valores de N-NH₄⁺ do efluente.

Figura 5.20 - Relação entre concentração de N-NH₄⁺ efluente e a alcalinidade efluente durante a operação do reator.

Como pode ser visualizada, para valores de alcalinidade baixos, a concentração de N-NH₄⁺ também é baixa, indicando que a nitrificação no sistema está eficiente. Na medida em que o valor da alcalinidade do efluente aumenta, existe também um aumento na concentração de N-NH₄⁺,

indicando que o processo de nitrificação do sistema está pouco eficiente. Ou seja, esta seria uma forma bem simples e rápida de observar se o processo de nitrificação no sistema estava ou não eficiente, uma vez que a análise de alcalinidade é rápida e relativamente barata. Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de aprimorar esta técnica que relaciona a concentração de N-NH_4^+ com a alcalinidade do efluente.

5.10 Análise da comunidade microbiana

Após a extração do DNA e envio das amostras para a realização do sequenciamento, as amostras referentes às Fases II e III apresentaram problemas, não obtendo resultados referentes à comunidade microbiana nestas fases. Entretanto, as amostras retiradas do reator durante a Fase II referente à parte interna e externa da espuma foram sequenciadas, possibilitando fazer uma relação dos resultados destas amostras com a Fase II. Na Fase III, não se obteve nenhuma informação a respeito da diversidade microbiana e características taxonômicas.

Para as amostras referentes às Fases I-a e IV, foram obtidas 47400 e 53005 sequências respectivamente, resultando um total de unidades taxonômicas operacionais (UTO) de 10446 na Fase I-a e 10993 na Fase IV. Deste total, foram selecionadas as sequências representativas de 5626 UTOs na amostra da Fase I-a e 5933 UTOs na amostra da Fase IV (após a retirada de *singletons*).

Já para as amostras da parte interna e externa da espuma, retirada durante a Fase II, o total de sequências foi igual a 122791, sendo 87873 sequências referentes à parte interna da espuma e 34918 referentes à parte externa da espuma. Estas sequências resultaram em 13935 UTOs referentes a parte interna da espuma, sendo selecionadas 7495 sequências representativas (após a retirada de *singletons*). Na parte externa da espuma, obteve-se 5717 UTOs, sendo 3534 sequências representativas selecionadas.

Tabela 5.13 - Quantidade de sequências, UTOs e UTOs analisadas em cada amostra.

	Fase I-a	Fase IV	Espuma interna	Espuma externa
Sequências	47400	53005	87873	34918
UTO (97% de similaridade)	10446 ± 504	10993 ± 522	13935 ± 629	5717 ± 212
UTOs analisadas na taxonomia	5626	5933	7495	3534

5.10.1 Índices de diversidade

Analisando o índice de equitabilidade em todas as amostras, observaram-se valores entre 0,85 e 0,89, indicando significativa variação na distribuição da comunidade microbiana, uma vez que valores próximos a 1 indicam elevada variação.

Tabela 5.14 - Índices de diversidade alfa entre as amostras determinados no nível de 97% de similaridade.

Índices de diversidade	Fase I-a	Fase IV	Espuma interna	Espuma externa
Equitabilidade	0,897±0,002	0,891±0,002	0,855±0,002	0,87±0,002
Shannon	8,3±0,03	8,29±0,03	8,15±0,02	7,53±0,03
Chao1	16820±2151	17740±2294	23040±3148	8167±732
Simpson	0,9992	0,9993±0,00006	0,9988±0,00006	0,9973±0,00015

Observou-se pouca variação no índice de Shannon entre as amostras da Fase I-a e Fase IV, com valor igual a 8,3. Este índice está relacionado com a riqueza das amostras, sendo que quanto maior é o índice, maior é o número de táxons. Quando comparadas as amostras de biomassa da parte interna e externa da espuma (retiradas durante a Fase II), é possível verificar uma maior riqueza da amostra na parte interna (índice igual a 8,15) do que na parte externa (índice igual a 7,53).

Aplicando-se o índice Chao1, que também é utilizado para indicar riqueza, observou-se o mesmo comportamento descrito anteriormente. As amostras referentes às Fases I-a e IV apresentaram índices iguais a 16820 e 17740 respectivamente, mantendo-se elevada riqueza microbiana em ambas as fases. Quando comparada a parte interna da espuma com a parte externa, observou-se novamente uma maior riqueza na parte interna, com um índice igual a 23040, sendo que na parte externa o índice foi igual a 8167.

Para verificar se as amostras possuíam espécies dominantes, calculou-se o índice de Simpson, que apresenta valor igual a zero para amostras com elevada dominância de espécies e valor igual a 1 para amostras com baixa dominância. Comparando-se as Fases I-a e IV, observou-se que ambas apresentavam índices superiores a 0,9, indicando uma distribuição equânime dos táxons na comunidade microbiana em cada fase. Também se obteve o mesmo valor do índice entre as amostras da parte interna e externa da espuma.

Apesar do problema no sequenciamento da amostra da Fase II, é possível inferir que esta fase apresentou maior diversidade quando comparada com as demais fases, baseando-se no total de UTOs encontrados na parte interna e externa da espuma durante esta fase. Removendo-se as UTOs repetidas, a soma das duas amostras gerou um total de 13868 UTOs, valor superior às demais fases.

Analisando a curva de rarefação (Figura 5.21), evidenciou-se maior riqueza para a amostra interna da espuma. Ou seja, considerando-se apenas a parte interna da espuma retirada na Fase II, obteve-se uma maior riqueza na diversidade microbológica do que nas Fases I-a e IV, indicando novamente que a Fase II apresentou a maior diversidade microbiana.

Figura 5.21 - Curva de rarefação definidas para nível de similaridade de 97% nas amostras referentes a Fase I-a, IV, espuma interna e espuma externa.

Uma hipótese que explicaria esta menor diversidade microbiana na parte externa da espuma pode estar relacionada com a capacidade de adaptação dos microrganismos às condições de aeração e não aeração. Na parte externa da espuma, onde existe o contato direto do material suporte com o meio líquido, a biomassa ali presente estava sujeita às condições mais restritivas, como presença e ausência de oxigênio dissolvido. Este fator pode ter influenciado no desenvolvimento da comunidade microbiana, selecionando somente as espécies adaptadas a este tipo de condição. Já na

parte interna, como se tratava de um ambiente anóxico/anaeróbio, havia uma condição menos restritiva para o desenvolvimento microbiológico, promovendo uma maior diversidade de microrganismos nesta região da espuma.

5.10.2 Caracterização da diversidade microbiana

Com a aplicação do RDP-Classifer, obteve-se uma classificação em filos nas amostras, com uma abundância relativa entre 75,3% e 92,8%. Quando comparada com a abundância relativa referente aos gêneros, notou-se uma queda neste percentual, variando entre 42,6% e 50,8%. A Tabela 5.15 mostra os valores de abundância relativa das amostras referente a filo, classe, ordem, família e gênero.

Tabela 5.15 - Abundância relativa em cada fase (similaridade de 97%).

	Abundância relativa				
	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Fase I-a	85,1%	78,0%	62,1%	51,4%	42,6%
Fase IV	92,8%	88,1%	83,1%	79,0%	50,8%
Espuma externa	86,8%	77,9%	65,7%	56,1%	43,3%
Espuma interna	75,3%	66,6%	57,9%	50,1%	43,5%

A Tabela 5.16 mostra o total de gêneros classificados em cada amostra, o número de sequências não classificadas e a abundância relativa destas sequências não classificadas.

Tabela 5.16 - Total de gêneros classificados em cada amostra e total de sequências não classificadas (similaridade de 97%).

	Nº total de gêneros	Não classificados	
		Nº total de sequências	Abundância relativa
Fase I-a	158	24432	57,4%
Fase IV	211	23585	49,2%
Espuma externa	159	18545	56,7%
Espuma interna	237	46013	56,5%

Na parte interna da espuma, o número total de gêneros foi de 237, contra 159 na parte externa, corroborando com os resultados da curva de rarefação (Figura 5.21).

Devido o elevado número de gêneros encontrados em cada amostra, limitou-se à descrição dos 20 gêneros com maior abundância relativa de cada amostra. Posteriormente, foram listados os

gêneros responsáveis pela remoção de nitrogênio, ou seja, gêneros capazes de oxidar N-NH_4^+ ou N-NO_2^- para a obtenção de energia para o crescimento e gêneros capazes de utilizar N-NO_2^- ou N-NO_3^- como receptor final de elétrons na respiração. Devido a elevada abundância relativa dos filos e das classes analisadas, estes foram descritos e comparados entre si em todas as amostras.

5.10.2.1 Filos e classes

Com relação aos filos observados nas Fases I-a e IV, destaca-se o filo Proteobacteria com a maior abundância relativa em todas as amostras observadas (65,1% para Fase I-a, 75,5% para Fase IV). A Figura 5.22 apresenta a distribuição dos 10 filos com maiores abundância relativa.

Figura 5.22 - Abundância relativa de filos com similaridade de 97% nas Fases I-a e IV.

Com relação às amostras da espuma externa e interna, também houve uma maior abundância relativa do filo Proteobacteria, obtendo valores iguais a 63,1% para espuma externa e 30,3% para espuma interna. A Figura 5.23 mostra os 10 filos com maior abundância relativa.

Figura 5.23 - Abundância relativa de filós com similaridade de 97% nas espuma externa e interna.

Diferentemente dos resultados referentes às Fases I-a e IV, observou-se uma menor abundância relativa do filo Proteobacteria na amostra da espuma interna. Com exceção dos filós Proteobacteria e Actinobacteria, todos os demais filós apresentaram abundância relativa maiores na amostra da espuma interna com relação à espuma externa.

Zhang *et al.* (2011) realizaram um estudo na comunidade microbiana de 15 amostra de reatores de lodos ativados localizados em diferentes países, como China, Estados Unidos e Canadá. Em todas as amostras, observaram-se as maiores frequências relativas dos filós Proteobacteria (36-65%), Firmicutes (8,1%), Bacteroidetes (7%), Actinobacteria (6,5%), Verrucomicrobia (4,2%), Chloroflexi (3,4%), Acidobacteria (3,0%) e Planctomycetes (2,4%). Estes resultados são semelhantes aos filós encontrados em todas as amostras analisadas (Fase I-a, Fase IV, espuma externa e espuma interna).

A Tabela 5.17 apresenta todos os filós encontrados nas amostras analisadas juntamente com sua abundância relativa.

Tabela 5.17 - Abundância relativa dos filos (97% similaridade).

Filos	Abundância relativa (%)			
	Fase I-a	Fase IV	Espuma externa	Espuma interna
Acidobacteria	4,63	2,48	2,61	15,13
Actinobacteria	6,36	3,77	13,62	6,34
Armatimonadetes	0,44	0,13	0,2	0,53
Bacteroidetes	0,64	2,07	0,42	2,86
BRC1	---	---	---	0,01
Chlamydiae	0,15	0,01	0,12	1,75
Chlorobi	0,02	0,27	---	0,06
Chloroflexi	2,56	3,54	1,7	2,54
Cyanobacteria/Chloroplast	---	---	---	0,07
Deinococcus-Thermus	---	---	---	0,01
Euryarchaeota	---	---	---	0,002
Firmicutes	2,36	3,09	2,08	7,7
Fusobacteria	---	0,01	---	0,005
Gemmatimonadetes	0,005	0,03	0,02	0,2
Lentisphaerae	---	0,004	---	0,01
Nitrospira	0,04	---	---	0,03
OD1	0,01	0,02	---	0,09
OP11	0,13	0,04	0,07	0,03
Planctomycetes	2,19	0,87	2,07	3,94
Proteobacteria	65,08	75,46	63,09	30,31
Spirochaetes	0,02	0,07	---	0,13
Synergistetes	0,005	0,15	0,01	0,04
TM7	0,32	0,72	0,73	0,87
Verrucomicrobia	0,02	0,01	0,06	2,4
WS3	0,12	0,04	0,01	0,23
Não classificados	14,9	7,22	13,18	24,71

Com relação às classes encontradas, destacam-se as Betaproteobacteria e Gamaproteobacteria. As Figuras 5.23 e 5.24 mostram as classes com maiores abundância relativas das amostras analisadas.

Figura 5.24 - Abundância relativa das classes com similaridade de 97% nas Fases I-a e IV.

Figura 5.25 - Abundância relativa das classes com similaridade de 97% na espuma interna e externa.

Pertence à classe Betaproteobacteria uma variedade de gêneros microrganismos que fazem parte do ciclo do nitrogênio, como *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, entre outros (BRENNER *et al.*, 2005). Estes microrganismos são quimioautotróficos capazes de oxidar

N-NH_4^+ para geração de energia, utilizando carbono inorgânico como receptor final de elétrons. Os principais gêneros encontrados em cada amostra serão discutidos no próximo item.

5.10.2.2 Gêneros

Neste item, serão apresentados os principais gêneros presentes em cada uma das amostras analisadas (os 20 gêneros com maior abundância relativa). Apesar de este tipo de análise não ser quantitativa, ou seja, gêneros com maior abundância relativa podem não ser os mais abundantes na biomassa do reator, utilizou-se deste critério para fazer uma análise mais geral sobre os gêneros encontrados no reator, uma vez que não é objetivo deste trabalho realizar um estudo completo da comunidade microbiana.

Nas Fases I-a e IV, o número total de gêneros encontrados foram igual a 159 e 211 respectivamente. A Figura 5.26 mostra os 20 gêneros com maior abundância relativa para as amostras de biomassa na Fase I-a.

Figura 5.26 - Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra de biomassa da Fase I-a.

Destes gêneros, não apresentaram na literatura uma descrição mais detalhada os gêneros *Gp4*, *Gp3*, *Gp6*, *Gp17*, *Gp10*, *Armatimonadetes_gp5* e *TM7_genera_incertae_seds*. Microrganismos do gênero *Pasteuria* são parasitas obrigatórios em nematoides, não estando relacionado com os processos de remoção de matéria orgânica e nitrogênio (PRESTON *et al.*, 2003).

Entre os demais gêneros, 6 deles são capazes de utilizar nitrito e/ou nitrato como receptor final de elétrons. As principais características de cada gênero referentes a receptores de elétrons e fonte de carbono estão apresentadas na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 - Características dos gêneros com maior abundância relativa na amostra de biomassa da Fase I-a.

Gênero	Receptores de elétrons			Fonte de carbono		Referência
	Oxigênio	Nitrito	Nitrato	Heterotróficos	Autotróficos	
<i>Steroidobacter</i>	+	+	+	+	-	(FAHRBACH <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thiothrix</i>	+	-	+	+	+	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Comamonas</i>	+	+	+	+	-	(CHEN e NI, 2011)
<i>Mycobacterium</i>	+	-	-	+	-	(HARTMANS <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rhodobacter</i>	-	+	+	+	+	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Novosphingobium</i>	+	-	+	+	-	(TAKEUCHI <i>et al.</i> , 2001)
<i>Azohydromonas</i>	-	-	+	+	+	(XE e YOKOTA, 2006)
<i>Streptococcus</i>	+	-	-	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Singulisphaera</i>	+	-	-	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Methylocystis</i>	+	-	-	Somente metano e metanol	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Conexibacter</i>	+	-	+	+	-	(MONCIARDINI <i>et al.</i> , 2003)
<i>Caldilinea</i>	+	-	-	+	-	(SEKIGUCHI <i>et al.</i> , 2003)

Com relação aos 12 gêneros apresentados, apenas os gêneros *Rhodobacter* e *Azohydromonas* não são aeróbios. Entretanto, estes 2 gêneros são capazes de utilizar nitrito e nitrato (*Rhodobacter*) ou apenas nitrato (*Azohydromonas*) como receptor de elétrons.

Todos esses gêneros apresentam espécies heterotróficas, sendo que apenas alguns gêneros também apresentam espécies autotróficas. Como o sistema apresentava remoção de matéria orgânica, o desenvolvimento de microrganismos heterotróficos tende a ser maior que os microrganismos autotróficos pela diferença nas velocidades de crescimento.

Um gênero interessante encontrado com elevada abundância relativa foi a *Comamonas*. No trabalho de Chen e Ni (2011), foram isolados 3 gêneros de microrganismos presentes lodo de um sistema de tratamento de chorume capazes de nitrificar heterotroficamente e desnitrificar aerobicamente, sendo um deles o *Comamonas*. Segundo os autores, a taxa de crescimento máximo específico ($\mu_{\max}$) dos microrganismos do gênero *Comamonas* é igual a $0,38 \text{ h}^{-1}$, cerca de 10 vezes maior que os microrganismos autotróficos nitrificantes (*Nitrosomonas europaea* apresenta um $\mu_{\max}$ igual a $0,03$ a $0,05 \text{ h}^{-1}$). A velocidade de remoção de N-total das *Comamonas* obtida pelos autores foi de $0,381 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (essa velocidade é igual à quantidade de amônia oxidada menos a quantidade de nitrito e nitrato no final do ensaio, dividido pelo tempo do ensaio).

Ou seja, como o sistema apresentava uma relação C/N relativamente elevada (relação DQO/N-total por volta de 10), é possível que o processo de nitrificação heterotrófica, juntamente com uma desnitrificação aeróbia, realizado por este gênero de microrganismos, tenha desempenhado papel significativo no processo de remoção de nitrogênio no reator. Entretanto, não foram realizados ensaios específicos que permitam inferir sobre a importância desses processos no reator. Os processos convencionais de nitrificação e desnitrificação podem ter sido os principais responsáveis pela remoção de nitrogênio, tanto devido aos períodos de aeração e não aeração, quanto devido à criação de uma zona aeróbia na parte externa do material suporte e anóxica no interior do material suporte.

Entre os 159 gêneros encontrados na Fase I-a, destaca-se também o gênero *Nitrospira*, que são microrganismos responsáveis pelo processo de nitrificação (abundância relativa de 0,04%). São microrganismos quimioautotróficos aeróbios, capazes de oxidar nitrito a nitrato (WEF, 2010).

A Figura 5.27 mostra os 20 gêneros com maior abundância relativa na amostra da biomassa durante a Fase IV.

Figura 5.27 - Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra de biomassa da Fase IV.

Dos 20 gêneros com maior abundância relativa na Fase IV, 4 gêneros são semelhantes aos com maior abundância relativa da Fase I-a. Destaca-se também uma elevada abundância do gênero *Comamonas*, capazes de nitrificar heterotroficamente e desnitrificar aerobicamente, como já apresentado anteriormente.

A Tabela 5.19 mostra as principais características dos gêneros com maior abundância relativa no que se refere aos receptores de elétrons e fonte de matéria orgânica.

Tabela 5.19 - Características dos gêneros com maior abundância relativa na amostra de biomassa da Fase IV.

Gênero	Receptores de elétrons			Fonte de carbono		Referência
	Oxigênio	Nitrito	Nitrato	Heterotróficos	Autotróficos	
<i>Comamonas</i>	+	+	+	+	-	(CHEN e NI, 2011)
<i>Azospira</i>	+	-	+	+	-	(REINHOLD-HUREK e HUREK, 2000)
<i>Dechloromonas</i>	+	-	+	+	-	(ACHENBACH <i>et al.</i> , 2001)
<i>Hydrogenophaga</i>	+	-	+	+	+	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Sterolibacterium</i>	+	-	+	+	-	(TARLERA e DENNER, 2003)
<i>Acidovorax</i>	+	-	+	+	+	(WILLEMS <i>et al.</i> , 1990)
<i>Georgfuchsia</i>	+	-	+	+	-	(WEELINK <i>et al.</i> , 2009)
<i>Sulfuritalea</i>	+	+	+	+	+	(KOJIMA e FUKUI, 2011)
<i>Longilinea</i>	-	-	-	+	-	(YAMADA <i>et al.</i> , 2007)
<i>Limnohabitans</i>	+	-	-	+	-	(HAHN <i>et al.</i> , 2010)
<i>Knoellia</i>	+	-	-	+	-	(SHIN <i>et al.</i> , 2012)
<i>Geothrix</i>	-	-	-	+	-	(COATES <i>et al.</i> , 1999)
<i>Zoogloea</i>	+	-	+	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Desulfomonile</i>	-	-	-	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Alkanindiges</i>	+	-	-	+	-	(BOGAN <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptococcus</i>	+	-	-	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Acinetobacter</i>	+	-	-	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Azohydromonas</i>	-	-	+	+	+	(XE e YOKOTA, 2006)

Apenas 4 gêneros apresentados na Tabela 5.19 são anaeróbios, sendo que o gênero *Azohydromonas* é capaz de utilizar nitrato como receptor final de elétrons. Com relação aos demais gêneros aeróbios, 9 deles são capazes de utilizar nitrato e/ou nitrito como receptor final de elétrons.

Destaca-se também a presença do gênero *Nitrosomonas*, com uma abundância relativa igual a 0,01%. São microrganismos quimioautotróficos aeróbios, responsáveis pela nitrificação, capazes de oxidar amônia a nitrito (WEF, 2010).

Um fato interessante observado tanto na Fase I-a quanto na Fase IV, considerando os gêneros com maior abundância relativa, foi a presença de microrganismos aeróbios facultativos, ou seja, na presença de O.D., é provável que estes microrganismos utilizavam oxigênio como receptor final de elétrons. Já na ausência de O.D., eles utilizavam nitrito e/ou nitrato como receptor final de elétrons. Como o reator apresentavam períodos com aeração e sem aeração, pode ter havido uma

maior adaptação destes microrganismos no reator, oxidando matéria orgânica aerobicamente nos períodos aerados e desnitrificando heterotroficamente em períodos sem aeração.

Considerando todos os gêneros encontrados em cada amostra, não foi verificada a presença de gêneros associados ao processo ANAMMOX. Barana *et al.* (2013), trabalharam com o mesmo modelo de reator tratando o efluente de um reator UASB em um abatedouro de aves (relação DQO/NTK por volta de 2,0), observaram a presença de atividade ANAMMOX no reator. Naquele estudo, a baixa relação C/N, pode ter sido mais favorável para o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pelo processo ANAMMOX. Já o afluente em estudo, a relação DQO/N-total era próximo a 10, desfavorecendo o processo de oxidação anaeróbia da amônia.

Com relação às amostras de biomassa da espuma na Fase II (parte interna e externa da espuma), foram encontrados 238 gêneros na parte interna e 160 gêneros na parte externa. Devido ao elevado número de gêneros, também foram selecionados os 20 gêneros com maiores abundância relativa, sendo estes analisados com relação à fonte de matéria orgânica e aos receptores de elétrons.

A Figura 5.28 mostra os 20 gêneros com maior abundância relativa na biomassa da parte interna da espuma.

Figura 5.28 - Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra de biomassa na parte interna da espuma

Pode ser observada a presença dos gêneros *Gp4*, *Gp6*, *Subdivision3_genera_incertae_sedis*, *Armatimonadetes_gp5* e *Spartobacteria_genera_incertae_sedis*, para os quais a literatura não apresenta estudos detalhados sobre seus metabolismos.

Com relação aos demais gêneros, a Tabela 5.20 mostra suas principais características referentes aos receptores de elétrons e fonte de carbono.

Tabela 5.20 - Características dos gêneros com maior abundância relativa na amostra de biomassa da espuma na parte interna.

Gênero	Receptores de elétrons			Fonte de carbono		Referência
	Oxigênio	Nitrito	Nitrato	Heterotróficos	Autotróficos	
<i>Azospira</i>	+	-	+	+	-	(REINHOLD-HUREK e HUREK, 2000)
<i>Mycobacterium</i>	+	-	-	+	-	(HARTMANS <i>et al.</i> , 2006)
<i>Blastopirellula</i>	+	-	-	+	-	(SCHLESNER <i>et al.</i> , 2004)
<i>Steroidobacter</i>	+	+	+	+	-	(FAHRBACH <i>et al.</i> , 2008)
<i>Dechloromonas</i>	+	-	+	+	-	(ACHENBACH <i>et al.</i> , 2001)
<i>Azohydromonas</i>	-	-	+	+	+	(XE e YOKOTA, 2006)
<i>Clostridium XI</i>	-	-	-	+	+	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Clostridium sensu stricto</i>	-	-	-	+	+	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Comamonas</i>	+	+	+	+	-	(CHEN e NI, 2011)
<i>Conexibacter</i>	+	-	+	+	-	(MONCIARDINI <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bradyrhizobium</i>	+	-	-	+	+	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Geothrix</i>	-	-	-	+	-	(COATES <i>et al.</i> , 1999)

Considerando os 12 gêneros apresentados na Tabela 5.20, observaram-se 6 gêneros capazes de utilizar oxigênio sob ambiente aeróbio como receptor de elétrons e de utilizar nitrito e/ou nitrato quando há ausência de oxigênio. Apenas o gênero *Geothrix* é estritamente anaeróbio. Ou seja, é possível inferir que, apesar destes microrganismos estarem presentes em uma região mais profunda do biofilme, é provável que ainda exista um resquício de oxigênio dissolvido no meio líquido, além da presença de nitrito e nitrato.

A Figura 5.29 mostra os gêneros encontrados na biomassa localizada na parte externa da espuma.

Figura 5.29 - Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra de biomassa na parte externa da espuma.

Pode ser visualizada uma maior abundância relativa do gênero *Comamonas* na parte externa da espuma com relação à parte interna. Com relação aos demais gêneros, a Tabela 5.21 mostra um resumo de suas características com relação à fonte de matéria orgânica e receptores de elétrons.

Tabela 5.21 - Características dos gêneros com maior abundância relativa na amostra de biomassa da espuma na parte externa.

Gênero	Receptores de elétrons			Fonte de carbono		Referência
	Oxigênio	Nitrito	Nitrato	Heterotróficos	Autotróficos	
<i>Mycobacterium</i>	+	-	-	+	-	(HARTMANS <i>et al.</i> , 2006)
<i>Steroidobacter</i>	+	+	+	+	-	(FAHRBACH <i>et al.</i> , 2008)
<i>Comamonas</i>	+	+	+	+	-	(CHEN e NI, 2011)
<i>Dechloromonas</i>	+	-	+	+	-	(ACHENBACH <i>et al.</i> , 2001)
<i>Thiothrix</i>	+	-	+	+	+	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bordetella</i>	+	-	+	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Caldimonas</i>	+	-	-	+	-	(TAKEDA <i>et al.</i> , 2002)
<i>Sandarakinorhabdus</i>	+	-	-	+	-	(GICH e OVERMANN, 2006)
<i>Methylocystis</i>	+	-	-	Somente metano e metanol	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Azospira</i>	+	-	+	+	-	(REINHOLD-HUREK e HUREK, 2000)
<i>Novosphingobium</i>	+	-	+	+	-	(TAKEUCHI <i>et al.</i> , 2001)
<i>Acidovorax</i>	+	-	+	+	+	(WILLEMS <i>et al.</i> , 1990)
<i>Desulfomonile</i>	-	-	-	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Catellibacterium</i>	+	-	-	+	-	(TANAKA <i>et al.</i> , 2004)
<i>Methylocaldum</i>	-	-	-	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Hydrogenophaga</i>	+	-	+	+	+	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)
<i>Singulisphaera</i>	+	-	-	+	-	(BRENNER <i>et al.</i> , 2005)

Considerando os gêneros apresentados na Tabela 5.21, 15 estão relacionados a microrganismos aeróbios. Do total de 15 gêneros, 9 podem possuir microrganismos facultativos que utilizam nitrito e/ou nitrato como receptor de elétrons. Como a parte externa da espuma estava em contato com o meio líquido, o qual sofria variação da concentração de O.D, é esperado que a composição da biomassa nessa região apresente microrganismos capazes de se desenvolver tanto em condições aeradas quanto em condições anóxicas.

Comparando a biomassa da parte interna com a biomassa da parte externa da espuma, é possível verificar uma maior diversidade de gêneros de microrganismos na região interna da espuma. Esta situação pode ter ocorrido pelo fato de a zona externa da espuma estar sujeita a maiores variações operacionais, principalmente com relação à concentração de O.D. Como a concentração de O.D. variava no sistema entre 3,5 e 0,0 mg.L⁻¹, é possível que apenas os microrganismos mais adaptados se desenvolvessem nas regiões que sofreria maior impacto devido

essa variação. Com isso, acabou-se selecionando microrganismos mais adaptados a esta condição, diminuindo a diversidade microbiana quando comparada com a parte interna da espuma.

Fazendo esta análise superficial da comunidade microbiana, foi possível verificar a presença de microrganismos diretamente relacionados com o ciclo do nitrogênio, como microrganismos aeróbios facultativos e microrganismos heterotróficos nitrificantes, devido à presença do gênero *Comamonas*. Uma investigação mais aprofundada sobre a microbiologia do reator deve ser realizada, uma vez que se trata de uma comunidade mixotrófica, com elevadas inter-relações entre os processos metabólicos dos microrganismos.

5.11 Considerações sobre o reator com leito estruturado e aeração intermitente (LEAI)

Essa pesquisa permitiu constatar que o LEAI mostrou ser um sistema eficiente na remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário. Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos relatados por Moura *et al.* (2012), obtendo-se elevada eficiência de remoção de nitrogênio mesmo com TDH de 8 horas e 10 horas.

Para os TDHs de 12 horas, 10 horas e 8 horas, as velocidades ascensionais no reator foram de 0,12 m/h, 0,15 m/h e 0,18 m/h, considerando uma razão de recirculação igual a 3. Essa informação pode ser importante para o aumento de escala do reator, uma vez que essa velocidade pode influenciar no processo de transferência de massa e na própria hidrodinâmica do reator. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados a respeito deste parâmetro de projeto, tornando-se possível obter valores mais confiáveis para o projeto deste modelo de reator.

Os fenômenos bioquímicos de remoção conjunta de nitrogênio e matéria orgânica em um único reator de fluxo contínuo ainda não foram completamente esclarecidos nesta pesquisa. Entretanto, a verificação da presença do gênero *Comamonas sp* indica a possibilidade da ocorrência dos processos de nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia no sistema. Ou seja, o fenômeno biológico proposto no trabalho de Munch *et al.* (1996) pode ter ocorrido no sistema.

Por outro lado, não se pode descartar a ocorrência do fenômeno físico no biofilme do reator. Ou seja, é provável que haja uma variação da concentração de OD no interior do biofilme fixo à espuma de poliuretano, ocorrendo a nitrificação na parte externa da espuma e a desnitrificação na parte interna. No trabalho de Santos (2014), foi realizado um estudo da concentração de OD no interior de um biofilme que utilizava espuma de poliuretano como material suporte (estruturas cilíndricas iguais às deste trabalho). Observou-se que até uma profundidade de 670 μm , havia a presença de OD. Entre 670 μm e 900 μm , não havia a presença de OD, porém havia nitrito e nitrato no meio (ambiente anóxico). Em profundidade superior à de 900 μm , o meio líquido no interior do biofilme apresentava condições anaeróbias. Ou seja, pode ter havido a estratificação do biofilme no meio suporte devido a essa diferença na concentração de OD.

Também não se pode descartar a hipótese de ter havido equilíbrio entre as etapas de nitrificação e desnitrificação, característica de processos convencionais, devido à alternância dos períodos aerados e não aerados. Não foram observadas variações nas concentrações de N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- no efluente, nos perfis temporais realizados. No entanto, como o reator era submetido à recirculação interna, pode ter ocorrido a diluição destes compostos no meio líquido, não sendo possível verificar sua variação nos períodos aerados e não aerados.

Como já apresentado anteriormente, neste trabalho não se verificou a presença de gêneros de microrganismos responsáveis pelo processo ANAMMOX. Além disso, durante a primeira condição operacional (Fase I-a), realizou-se um ensaio cinético (dados não apresentados) visando verificar uma possível atividade ANAMMOX na biomassa do reator e não se verificou esta atividade. Já nos trabalhos de Barana *et al.* (2013) e de Santos (2014), que trabalharam com o mesmo modelo de reator com afluentes que apresentavam C/N baixa (por volta de 2), verificou-se a presença de atividade ANAMMOX. A elevada relação C/N no esgoto sanitário pode ter desfavorecido o desenvolvimento destes microrganismos, inviabilizando a ocorrência de desnitrificação autotrófica via ANAMMOX.

Trata-se de uma nova configuração de reator que apresenta uma operação bastante simples. Apesar dos problemas encontrados durante toda a operação do sistema, é provável que em maiores escalas estes problemas não ocorram, como o entupimento e desgaste da pedra porosa que dispersava ar no interior do reator. Por outro lado, por se tratar de uma comunidade bacteriana mixotrófica, os processos bioquímicos que envolvem a oxidação de matéria orgânica, oxidação do N-NH_4^+ e a redução de N-NO_3^- ainda são pouco conhecidos, embora este trabalho apresente indícios da ocorrência de processos pouco explorados na literatura sobre operação de reatores contínuos.

6 Conclusões

Com os resultados obtidos nesta pesquisa, foi possível constatar o potencial de aplicação do reator de leito estruturado e aeração intermitente para o tratamento de esgoto sanitário visando à remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio.

Para garantir um regime de escoamento próximo a mistura completa, verificou-se, por meio dos ensaios hidrodinâmicos, que a razão de recirculação igual a 3 garante um número de reatores em série de mistura completa inferior a 3. Razões de recirculação superiores a 3 podem não resultar em uma melhoria na mistura do processo.

O sistema apresentou elevada eficiência na remoção de matéria orgânica e nitrogênio para TDH de 12 horas, 10 horas e 8 horas. Com TDH de 12 horas e 10 horas, verificou-se que períodos de aeração de 2 horas e não aeração de 1 hora foram suficientes para promover a nitrificação do nitrogênio orgânico e N-NH_4^+ e também desnitrificar grande parte da parcela oxidada, gerando um efluente com concentrações máximas de $4,9 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e $3,9 \text{ mg.L}^{-1}$ para NTK, N-NO_2^- e N-NO_3^- respectivamente. A eficiência de remoção de N-total nestas duas fases teve um valor médio igual a 80%.

Com um TDH de 8 horas, mantendo-se os períodos de 2 horas aerando seguida de 1 hora sem aeração, observou-se uma queda na eficiência de remoção de N-total para 70%. Essa menor eficiência foi devida à queda das eficiências do processo de nitrificação, gerando um efluente com concentração de NTK igual a $7,9 \text{ mg.L}^{-1}$. Com a alteração do período de aeração para 3 horas, o sistema voltou a apresentar elevada de remoção de N-total, com eficiência média de 79%.

A remoção de DQO em todas as fases foi elevada, com eficiências médias iguais ou superiores a 90%.

As velocidades de nitrificação via N-NH_4^+ , via N-NO_2^- e de desnitrificação foram semelhantes aos valores referentes a sistemas que operam com remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio. Quando comparadas com velocidades de sistemas compostos por reatores

independentes para nitrificação, desnitrificação e remoção de matéria orgânica, as velocidades obtidas nesta pesquisa foram inferiores.

A quantificação da comunidade nitrificante e desnitrificante por meio de ensaios de NMP mostrou uma maior concentração dos microrganismos oxidadores de amônia com relação aos oxidadores de nitrito em todas as fases. Não houve variações significativas no NMP da comunidade desnitrificante em todas as fases estudadas.

Os perfis temporais mostraram que, apesar de o sistema operar sob aeração intermitente, não havia picos de produção de nitrato e amônia durante o ciclo de aeração e não aeração. Ou seja, ocorria o processo de nitrificação e desnitrificação simultânea no reator. Além disso, a vazão de recirculação escolhida também auxiliou nessa baixa variação da concentração dos compostos nitrogenados no efluente, proporcionando regime de escoamento próximo ao de mistura completa.

As análises de diversidade microbiana mostraram que a biomassa do reator é composta por uma comunidade mixotrófica, com elevada riqueza e diversidade microbiana. Considerando os gêneros com maior abundância relativa nas amostras, verificou-se elevada quantidade de gêneros que fazem parte do ciclo do nitrogênio, principalmente no processo de redução de nitrato e nitrito. Destaca-se a presença do gênero *Comamonas sp* com elevada abundância relativa em todas as amostras. Este gênero de microrganismos é capaz de nitrificar heterotroficamente e desnitrificar aerobicamente, diferentemente dos processos convencionais de nitrificação e desnitrificação. Ou seja, é possível que esta via não convencional de remoção de nitrogênio possa ter ocorrido no reator.

Para trabalhos futuros, algumas sugestões foram propostas com base neste trabalho:

- Verificar o efeito da porosidade do leito na eficiência do reator;
- Avaliar o efeito da recirculação na eficiência e nos perfis temporais do sistema;
- Quantificar os microrganismos nitrificantes e desnitrificantes em diferentes profundidades do material suporte a fim de investigar a ocorrência de estratificação da biomassa;

- Reduzir o diâmetro do material suporte para investigar eficiência do reator em função da variação do diâmetro do material suporte;
- Realizar ensaios cinéticos de nitrificação com diferentes concentrações de DQO a fim de verificar um aumento na velocidade de nitrificação pela via não convencional (nitrificação heterotrófica);
- Aumentar a escala do reator e verificar sua eficiência na remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogênio.

7 Bibliografia

- ABELIOVICH, A. *The Nitrite-Oxidizing Bacteria*. 3rd edition, New York: Springer New York, Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, 2006, p. 861-872. (The Prokaryotes).
- ACHENBACH, L. A.; MICHAELIDOU, U.; BRUCE, R. A.; FRYMAN, J.; COATES, J. D. *Dechloromonas agitata* gen. Nov., sp nov and *dechlorosoma suillum* gen. Nov., sp nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, Mar, p. 527-533, 2001.
- AHN, Y. H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 8, p. 1709-1721, 2006.
- ALMASRI, M. Nitrate contamination of groundwater: A conceptual management framework. *Environmental Impact Assessment Review*, v.27, n.3, p.220–242, 2007.
- APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 20^a edition. Washington, D.C. APHA. 2012.
- BARANA, A. C.; LOPES, D. D.; MARTINS, T. H.; POZZI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; DEL NERY, V.; FORESTI, E. Nitrogen and organic matter removal in an intermittently aerated fixed-bed reactor for post-treatment of anaerobic effluent from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 1, n. 3, p. 453-459, 2013.
- BOGAN, B. W.; SULLIVAN, W. R.; KAYSER, K. J.; DERR, K. D.; ALDRICH, H. C.; PETEREK, J. R. *Alkanindiges illinoisensis* gen. Nov., sp nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, Sep, p. 1389-1395, 2003.
- BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. Ed. New York: Springer, v. 2, 2005 (The Proteobacteria).
- CALIJURI, M. C. *Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais*. São Carlos: RIMA, 2006.
- CANTO, C. S. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Feasibility of nitrification/denitrification in a sequencing batch biofilm reactor with liquid circulation applied to post-treatment. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 3, p. 644-654, 2008.
- CHEN, F.-Y.; LIU, Y.-Q.; TAY, J.-H.; NING, P. Operational strategies for nitrogen removal in granular sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials*, v. 189, n. 1-2, May 15, p. 342-348, 2011.
- CHEN, K. C.; CHEN, J. J.; HOUNG, J. Y. Improvement of nitrogen-removal efficiency using immobilized microorganisms with oxidation-reduction potential monitoring. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 25, n. 5, Nov, 2000.
- CHEN, Q.; NI, J. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 9, Sep, p. 1305-1310, 2011.

CHOWDHURY, N.; ZHU, J.; NAKHLA, G.; PATEL, A.; ISLAM, M. A novel liquid-solid circulating fluidized-bed bioreactor for biological nutrient removal from municipal wastewater. *Chemical Engineering & Technology*, v. 32, n. 3, p. 364-372, 2009.

CHU, L. B.; WANG, J. L. Comparison of polyurethane foam and biodegradable polymer as carriers in moving bed biofilm reactor for treating wastewater with a low C/N ratio. *Chemosphere*, v. 83, n. 1, Mar, p. 63-68, 2011.

COATES, J. D.; ELLIS, D. J.; GAW, C. V.; LOVLEY, D. R. *Geothrix fermentans* gen. Nov., sp nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, Oct, p. 1615-1622, 1999.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 1, p. D141-D145, 2009.

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

DANIEL, L. M. C.; POZZI, E.; FORESTI, E.; CHINALIA, F. A. Removal of ammonium via simultaneous nitrification-denitrification nitrite-shortcut in a single packed-bed batch reactor. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 3, p. 1100-1107, 2009.

DICKIE, I. A. Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. *New Phytologist*, v. 188, n. 4, p. 916-918, 2010.

DILLALO, R., ALBERTSON, O.E. Volatile acids by direct titration. *Journal of Water Pollution Control Federation*, v.33, p.356-365, 1961.

Environmental Protection Agency (EPA). Nitrogen control. Washington (DC): US EPA; 1993.

FAHRBACH, M.; KUEVER, J.; REMESCH, M.; HUBER, B. E.; KAEMPFER, P.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. *Steroidobacter denitrificans* gen. Nov., sp nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, Sep, p. 2215-2223, 2008.

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

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

GICH, F.; OVERMANN, J. *Sandarakinorhabdus limnophila* gen. Nov., sp nov., a novel bacteriochlorophyll a-containing, obligately aerobic bacterium isolated from freshwater lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, Apr, p. 847-854, 2006.

GINORIS, Y. P.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; COELHO, M. A. Z.; NICOLAU, A. Aplicação de técnicas de análise de imagem e de estatística multivariável no reconhecimento de

protozoários e metazoários típicos de sistemas por lodos ativados. *24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Belo Horizonte - MG, Anais, 2003.

GONZALEZ, B. C.; SPINOLA, A. L. G.; LAMON, A. W.; ARAUJO, J. C.; CAMPOS, J. R. The use of microsensors to study the role of the loading rate and surface velocity on the growth and the composition of nitrifying biofilms. *Water Science and Technology*, v. 64, n. 8, 2011, 2011.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and RNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

GUPTA, A. B.; GUPTA, S. K. Simultaneous carbon and nitrogen removal in a mixed culture aerobic rbc biofilm. *Water Research*, v. 33, n. 2, Feb, p. 555-561, 1999.

HAHN, M. W.; KASALICKY, V.; JEZBERA, J.; BRANDT, U.; JEZBEROVA, J.; SIMEK, K. *Limnohabitans curvus* gen. Nov., sp nov., a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, Jun, p. 1358-1365, 2010.

HANAKI, K.; WANTAWIN, C.; OHGAKI, S. Nitrification at low-levels of dissolved-oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Water Research*, v. 24, n. 3, Mar, p. 297-302, 1990.

HARTMANS, S.; DE BONT, J. A. M.; STACKEBRANDT. *The Prokaryotes*. 3. Ed. New York: Springer, v. 3, 2006 (Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes).

HE, S.-B.; XUE, G.; WANG, B.-Z. Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (snd) and its kinetics model in membrane bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, v. 168, n. 2-3, Sep 15, p. 704-710, 2009.

HELLINGA, C.; SCHELLEN, A.; MULDER, J. W.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. The sharon process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Science and Technology*, v. 37, n. 9, p. 135-142, 1998.

HOLMAN, J. B.; WAREHAM, D. G. Cod, ammonia and dissolved oxygen time profiles in the simultaneous nitrification/denitrification process. *Biochemical Engineering Journal*, v. 22, n. 2, p. 125-133, 2005.

JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGER, G. T. *Manual of the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and others solids separation problems*. 3rd edition, London - UK, 2003.

JIMENEZ, B.; NOYOLA, A.; CAPDEVILLE, B.; ROUSTAN, M.; FAUP, G. Dextran blue colorant as a reliable tracer in submerged filters. *Water Research*, v. 22, n. 10, p. 1253-1257, 1988.

KHIN, T.; ANNACHHATRE, A. P. Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, n. 7, p. 519-532, 2004.

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

- KOJIMA, H.; FUKUI, M. *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. Nov., sp nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, Jul, p. 1651-1655, 2011.
- KOOPS, H.; PURKHOLD, U.; RÖSER, A. P.; TIMMERMAN, G.; WAGNER, M. *The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria*. 3rd edition, New York: Springer New York, Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, 2006, p. 778-811. (The Prokaryotes).
- LEVENSPIEL, O. *Chemical reaction engineering*. 3.ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 2000.
- LIM, J.-W.; SENG, C.-E.; LIM, P.-E.; NG, S.-L.; SUJARI, A.-N. A. Nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor using polyurethane foam cubes of various sizes as carrier materials. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 21, Nov, p. 9876-9883, 2011.
- LIU, X.; DONG, C. Simultaneous COD and nitrogen removal in a micro-aerobic granular sludge reactor for domestic wastewater treatment. *Engineering and Risk Management*, v. 1, 2011, 2011.
- LIU, Y. C.; SHI, H. C.; XIA, L.; SHI, H. M.; SHEN, T. G.; WANG, Z. Q.; WANG, G.; WANG, Y. Z. Study of operational conditions of simultaneous nitrification and denitrification in a carousel oxidation ditch for domestic wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 3, p. 901-906, 2010.
- LUOSTARINEN, S.; LUSTE, S.; VALENTIN, L.; RINTALA, J. Nitrogen removal from on-site treated anaerobic effluents using intermittently aerated moving bed biofilm reactors at low temperatures. *Water Research*, v. 40, n. 8, p. 1607-1615, 2006.
- MANCONI, I.; CARUCCI, A.; LENS, P. Combined removal of sulfur compounds and nitrate by autotrophic denitrification in bioaugmented activated sludge system. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 98, n. 3, Oct 15, p. 551-560, 2007.
- MARTINS, T. H. *Conversão de compostos nitrogenados em reatores biológicos: operação, caracterização microbiológica e filogenética*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- MENDONÇA, L. C. *Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- METCALF & EDDY. *Wastewater Engineering: Treatment and reuse*. 4 ed. New York, McGraw-Hill International edition, 2003.
- MOCKAITIS, G.; PANTOJA-FILHO, J. L. R.; RODRIGUES, J. A. D.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Continuous Anaerobic Bioreactor With Fixed-Structured Bed (ABFSB) for wastewater treatment: a developing technology. *X Oficina e Simpósio Latino-Americano de Digestão Anaeróbia*, Ouro Preto - Minas Gerais, 2011.
- MONCIARDINI, P.; CAVALETTI, L.; SCHUMANN, P.; ROHDE, M.; DONADIO, S. *Conexibacter woesei* gen. Nov., sp nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, Mar, p. 569-576, 2003.

- MORAES, B. S.; ORRU, J. G. T.; FORESTI, E. Nitrogen and sulfide removal from effluent of uasb reactor in a sequencing fed-batch biofilm reactor under intermittent aeration. *Journal of Biotechnology*, v. 164, n. 3, Apr 10, p. 378-385, 2013.
- MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção. *Projeto Prosab*, Rio de Janeiro:ABES, 2009.
- MOURA, R. B. *Desempenho de um reator vertical de fluxo contínuo e leito estruturado com recirculação do efluente, submetido à aeração intermitente, na remoção de carbono e nitrogênio de um efluente sintético*. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. *Journal of Environmental Management*, v. 98, May, p. 163-167, 2012.
- MULDER, A.; VANDEGRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *Fems Microbiology Ecology*, v. 16, n. 3, p. 177-183, 1995.
- MUNCH, E. V.; LANT, P.; KELLER, J. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Research*, v. 30, n. 2, p. 277-284, 1996.
- NETTO, A. P. O.; ZAIAT, M. Treatment of domestic sewage in an anaerobic-aerobic fixed-bed reactor with recirculation of the liquid phase. *Clean-Soil Air Water*, v. 40, n. 9, Sep, p. 965-971, 2012.
- NOCKO, L. M. *Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido a aeração intermitente*. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- OSADA, T.; HAGA, K.; HARADA, Y. Removal of nitrogen and phosphorus from swine wastewater by the activated-sludge units with the intermittent aeration process. *Water Research*, v. 25, n. 11, p. 1377-1388, 1991.
- POCHANA, K.; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (snd). *Water Science and Technology*, v. 39, n. 6, p. 61-68, 1999.
- PRESTON, J. F.; DICKSON, D. W.; MARUNIAK, J. E.; NONG, G.; BRITO, J. A.; SCHMIDT, L. M.; GIBLIN-DAVIS, R. M. *Pasteuria* spp.: Systematics and phylogeny of these bacterial parasites of phytopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, v. 35, n. 2, Jun, p. 198-207, 2003.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *azovibrio restrictus* gen. Nov., sp nov., *azospira oryzae* gen. Nov., sp nov and *azonexus fungiphilus* gen. Nov., sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, Mar, p. 649-659, 2000.
- RENSINK, J. H.; RULKENS, W. H. Using metazoa to reduce sludge production. *Water Science and Technology*, v. 36, n. 11, 1997, p. 171-179, 1997.
- REYES-AVILA, J. S.; RAZO-FLORES, E.; GOMEZ, J. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*, v. 38, n. 14-15, p. 3313-3321, 2004.

RIPLEY, L.E., BOYLE, W.C., CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, v.58, n.5, p.406-411, 1986.

ROSTRON, W. M.; STUCKEY, D. C.; YOUNG, A. A. Nitrification of high strength ammonia wastewaters: Comparative study of immobilisation media. *Water Research*, v. 35, n. 5, p. 1169-1178, 2001.

SANTOS, C. E. D. *Influência da relação carbono/nitrogênio e da fonte de carbono no processo de nitrificação e desnitrificação simultânea em reator de leito estruturado*. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SCHLESNER, H.; RENSMANN, C.; TINDALL, B. J.; GADE, D.; RABUS, R.; PFEIFFER, S.; HIRSCH, P. Taxonomic heterogeneity within the planctomycetales as derived by DNA-DNA hybridization, description of rhodopirellula baltica gen. Nov., sp nov., transfer of pirellula marina to the genus blastopirellula gen. Nov as blastopirellula marina comb. Nov and emended description of the genus pirellula. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, Sep, p. 1567-1580, 2004.

SEKIGUCHI, Y.; YAMADA, T.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. Anaerolinea thermophila gen. Nov., sp nov and caldilinea aerophila gen. Nov., sp nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain bacteria at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, Nov, p. 1843-1851, 2003.

SHAPLEIGH, J. *The Denitrifying Prokaryotes*. 3rd edition, New York: Springer New York, Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry, p. 769-792. (The Prokaryotes), 2006.

SHARMA, B.; AHLERT, R. C. Nitrification and nitrogen removal. *Water Research*, v. 11, n. 10, p. 897-925, 1977.

SHIN, N.-R.; ROH, S. W.; KIM, M.-S.; JUNG, M.-J.; WHON, T. W.; BAE, J.-W. Knoellia locipacati sp nov., from soil of the demilitarized zone in south korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, Feb, p. 342-346, 2012.

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

STROUS, M.; VANGERVERN, E.; ZHENG, P.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, v. 31, n. 8, p. 1955-1962, 1997.

SURAMPALLI, R. Y.; TYAGI, R. D.; SCHEIBLE, O. K.; HEIDMAN, J. A. Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors. *Bioresource Technology*, v. 61, n. 2, p. 151-157, 1997.

TAKEDA, M.; KAMAGATA, Y.; GHIROSE, W. C.; HANADA, S.; KOIZUMI, J. Caldimonas manganoxidans gen. Nov., sp nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, manganese-oxidizing thermophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, May, p. 895-900, 2002.

TAKEUCHI, M.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A. Proposal of the genus *sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *sphingobium*, *novosphingobium* and *sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, Jul, p. 1405-1417, 2001.

TANAKA, Y.; HANADA, S.; MANOME, A.; TSUCHIDA, T.; KURANE, R.; NAKAMURA, K.; KAMAGATA, Y. *Catellibacterium nectarophilum* gen. Nov., sp nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *sphingomonas* for vigorous growth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, May, p. 955-959, 2004.

TARLERA, S.; DENNER, E. B. M. *Sterolibacterium denitrificans* gen. Nov., sp nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the beta-proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, Jul, p. 1085-1091, 2003.

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

TUNDISI, J. G. *Água no século XXI: enfrentando a escassez*. São Carlos: RIMA, 1999.

VAN DE GRAAF, A. A. V.; DE BRUIJN, P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology-UK*, v.142, Aug, p.2187-2196, 1996.

VAN HAANDEL, A.; MARAIS, G. O. *O comportamento do sistema de lodo ativado. Teoria e aplicações para projetos e operação*. Campina Grande, Paraíba, 1999.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HOOIJMANS, C. M.; BRDJANOVIC, D.; HEIJNEN, J. J. Biological phosphate removal processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, n. 3, Sep, p. 289-296, 1997.

VILLAVERDE, S. Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*, v. 3, n. 2, 2004/06/01, p. 171-183, 2004.

VILLAVERDE, S.; GARCIAENCINA, P. A.; FDZPOLANCO, F. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Water Research*, v. 31, n. 5, p. 1180-1186, 1997.

WANG, B.; WANG, W.; HAN, H.; HU, H.; ZHUANG, H. Nitrogen removal and simultaneous nitrification and denitrification in a fluidized bed step-feed process. *Journal of Environmental Sciences-China*, v. 24, n. 2, 2012, p. 303-308, 2012.

WEELINK, S. A. B.; VAN DOESBURG, W.; SAIA, F. T.; RIJPSMA, W. I. C.; ROLING, W. F. M.; SMIDT, H.; STAMS, A. J. M. A strictly anaerobic betaproteobacterium *georgfuchsia toluolica* gen. Nov., sp nov degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 70, n. 3, Dec, p. 575-585, 2009.

WEF (Water Environment Federation). *Nutrient Removal*. WEF Manual of Practice n°34, McGraw Hill, USA, 2010.

WIJFFELS, R. H.; TRAMPER, J. Nitrification by immobilized cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, n. 6, p. 482-492, 1995.

WILLEMS, A.; FALSEN, E.; POT, B.; JANTZEN, E.; HOSTE, B.; VANDAMME, P.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; DELEY, J. *Acidovorax*, a new genus for *pseudomonas-facilis*, *pseudomonas-delafieldii*, *e-falsen* (ef) group 13, ef group 16, and several clinical isolates, with the species *acidovorax-facilis* comb-nov, *acidovorax-delafieldii* comb-nov, and *acidovorax-temperans* sp-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 40, n. 4, Oct, p. 384-398, 1990.

WRIGHT, E. S.; YILMAZ, L. S.; NOGUERA, D. R. Decipher, a search-based approach to chimera identification for 16s rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 3, p. 717-725, 2012.

XE, C. H.; YOKOTA, A. Reclassification of *alcaligenes latus* strains iam 12599(t) and iam 12664 and *pseudomonas saccharophila* as *azohydromonas lata* gen nov, comb nov, *azohydromonas australica* sp nov and *pelomonas saccharophila* gen nov, comb nov, respectively (vol 55, pg 2419, 2005). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, Feb, p. 497-497, 2006.

YAMADA, T.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; SEKIGUCHI, Y. *Bellilinea caldifistulae* gen. Nov., sp nov and *longilinea arvoryzae* gen. Nov., sp nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, Oct, p. 2299-2306, 2007.

YAMAGIWA, K.; OOHIRA, Y.; OHKAWA, A. Simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous pollutants by a plunging liquid jet bioreactor with cross-flow filtration operated under intermittent aeration. *Bioresource Technology*, v. 53, n. 1, p. 57-62, 1995.

YING, C.; UMETSU, K.; IHARA, I.; SAKAI, Y.; YAMASHIRO, T. Simultaneous removal of organic matter and nitrogen from milking parlor wastewater by a magnetic activated sludge (mas) process. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 12, p. 4349-4353, 2010.

YOO, K.; AHN, K. H.; LEE, H. J.; LEE, K. H.; KWAK, Y. J.; SONG, K. G. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (snd) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Water Research*, v. 33, n. 1, p. 145-154, 1999.

YUAN, X. J.; GAO, D. W. Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor. *Journal of Hazardous Materials*, v. 178, n. 1-3, p. 1041-1045, 2010.

ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; FORESTI, E. Reator anaeróbio de leito fixo para tratamento de águas residuárias: Conceção e avaliação preliminar do desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química*, v. 11, p. 33, 1994.

ZHANG, T.; SHAO, M.; YE, L. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of active sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME Journal*, v. 6, p. 1137-1147, 2011.