LEONIDIA MARIA DE CASTRO DANIEL

**"REMOÇÃO DE NITROGÊNIO VIA NITRITO EM REATOR
OPERADO EM BATELADAS SEQUENCIAIS CONTENDO
BIOMASSA IMOBILIZADA E AERAÇÃO INTERMITENTE"**

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 Hidráulica e
saneamento.

Orientador: Prof. Titular Dr. EUGENIO FORESTI

São Carlos
2005

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **LEONÍDIA MARIA DE CASTRO DANIEL**

Tese defendida e julgada em 14-10-2005 perante a Comissão Julgadora:

Prof. Titular **EUGENIO FORESTI** (Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADA

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Titular **PEDRO ALÊM SOBRINHO**
(Escola Politécnica/USP)

APROVADA

Prof. Dr. **ROQUE PASSOS PIVELLI**
(Escola Politécnica/USP)

APROVADA

Prof. Dra. **GIOVANA TOMMASO**
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP)

Aprovada

Prof. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

AGRADECIMENTOS

Ao professor Eugênio Foresti pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À minha família.

À Cristina Iamamoto

À Andréa Buzzini

Aos amigos Marcelo Barroso, Cynthia, Sissy, Mércia e Kelly.

À Eloísa Pozzi e Fabio Alexandre Chinalia pelos exames microbiológicos

Aos colegas do Laboratório de Processos Biológicos: Betão, Isabel, Márcia, Dirlane, Júlia, Ana Flávia, Aline, Iolanda, Dalva, Arivaldo, Rogers, Samantha...

Aos técnicos Vagner Lamon e Roberto Bérghamo.

Às técnicas Ana Paula, Beth e Janja pela ajuda preciosa.

À Rose, Sá e Pavi

Professora Ruth, a quem tenho um carinho muito especial

A Deus, que colocou estas pessoas na minha vida.

À FAPESP por conceder a bolsa e financiar a pesquisa.

RESUMO

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

Um reator de leito fixo, preenchido com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano, foi operado em bateladas seqüenciais, alimentado com substrato sintético com concentração de nitrogênio amoniacal de 125, 250, 500 e 40 mg/L. O principal objetivo da pesquisa foi verificar a possibilidade de se promover a nitrificação curta no reator submetido à aeração intermitente, com a formação de nitrito como principal composto intermediário, seguida da desnitrificação. Para concentração de nitrogênio amoniacal de 125 e 250 mg/L o perfil temporal das concentrações de nitrogênio monitoradas evidenciou que tempo de ciclo de 24 horas foi excessivo. Durante a operação do reator submetido à concentração de nitrogênio amoniacal de 500 mg/L e de 40 mg/L, ficou evidente a influência do modo de operação, quanto à concentração de oxigênio e extensão dos períodos aeróbios e anóxicos, no tempo de ciclo necessário. Para todas as concentrações de nitrogênio amoniacal estudadas a duração do período de aeração foi suficiente para nitrificar uma fração do N-amoniaco afluente, de modo que as concentrações de nitrito e ácido nitroso não atingissem níveis tóxicos ao processo de oxidação de N-amoniaco. Ao longo do período de operação, o nitrogênio na forma de nitrito tornou-se a forma oxidada predominante e foi possível manter este acúmulo de nitrito em todas as etapas de operação do reator, mesmo alterando a concentração de oxigênio dissolvido, prolongando o período de aeração e, reduzindo a concentração de amônia livre. Constatou-se, portanto, ser possível obter-se processo estável de remoção de nitrogênio em reator operado em bateladas seqüenciais, submetido a etapas de aeração e não aeração em um mesmo ciclo. Esse modo de operação permitiu o estabelecimento do processo de nitrificação parcial a nitrito nas etapas aeradas e desnitrificação nas etapas anóxicas.

Palavras Chaves: nitrificação parcial, desnitrificação completa, aeração intermitente, remoção de nitrogênio via nitrito.

ABSTRACT

DANIEL, L. M. C. (2005) Nitrogen removal through nitrite in sequential batch reactor with immobilized biomass and intermittent aeration. Thesis – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

A bench-scale sequencing batch reactor filled with polyurethane foam matrices was fed with synthetic substrate containing different influent ammonium nitrogen concentrations (120, 250, 500 and 40 mg/L) and subjected to different operating conditions. The main objective was to verify the possibility of promoting short nitrification in the reactor operated under intermittent aeration to obtain nitrite as the main intermediate compound to be denitrified during the anoxic periods. The profiles of the monitored nitrogen species along the cycles allowed verifying that the time cycle of 24 hours was excessive for ammonium nitrogen concentrations of 125 and 250 mg/L. The influence of the operating parameters relative to the dissolved oxygen concentration and extension of aerobic and anoxic periods on the cycle time was evident during the operation at ammonium nitrogen concentrations of 500 and 40 mg/L. The duration of the aeration periods was long enough to allow a fraction of the influent ammonium to be nitrified for all the ammonium nitrogen concentrations studied. The concentrations of nitrite and nitrous acid have never reached the toxic levels to affect ammonia oxidation. Nitrite was the predominant form of oxidized nitrogen along all the operating periods. Nitrite accumulation occurred during all the stages of reactor operation, even when the reactor was subjected to different dissolved oxygen concentrations, length of aeration period and free ammonia concentration. Therefore, stable process of nitrogen removal was achieved in the sequencing batch reactor containing immobilized biomass subjected to a wide range of ammonium nitrogen concentrations. The operation way consisting of intermittent aeration followed by non aeration periods in the same cycle allowed the establishment of the process of partial nitrification to nitrite in the aerated steps followed by denitrification in the anoxic steps.

Keywords: Sequential batch reactors, partial nitrification, complete denitrification, intermittent aeration, nitrogen removal through nitrite.

LISTA DE ABREVIATURAS

N-afluente	Nitrogênio amoniacal afluente
N-amoniacal	Nitrogênio amoniacal
N-nitrato	Nitrogênio como nitrato
N-nitrito	Nitrogênio como nitrito
N-NH ₃	Nitrogênio como amônia livre
N-NO ₂ ⁻	Nitrogênio como nitrito
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
SVA	Sólidos Voláteis Aderidos à espuma
SVT	Sólidos Voláteis Totais

LISTA DE SIGLAS

APHA	American Public Health Association
ARDRA	Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado
ASBR	Anaerobic Sequential Batch Reactor
NMP	Número Mais Provável
PCR	Polimerase Chain Reaction
SBR	Sequential Batch Reactor
SHARON	Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite
UASB	(Up Flow Anaerobic Sludge Blanket)

SUMÁRIO

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	4
2.1 – Objetivo geral	4
2.2 - Objetivos específicos	4
3 – REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1- Remoção de nitrogênio via nitrito	7
3.2 - Aeração intermitente na remoção biológica de nitrogênio	15
3.3- Configuração dos reatores operados em batelada	20
3.3.1 – Reatores contendo biomassa imobilizada	22
3.3.2 – Agitação	24
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 – Instalações e procedimentos	26
4.1.1 – Substrato.....	26
4.1.2 - Descrição do reator	28
4.2 - Procedimento experimental	30
4.2.1 - Operação do Reator	30
4.2.2 - Escolha do lodo de inóculo.....	32
4.2.3 - Imobilização da biomassa.....	32
4.2.4 - Ensaio para verificar a velocidade de desnitrificação via nitrito e via nitrato	32
4.2.5 - Ensaio para verificar a possibilidade da rota alternativa de desnitrificação usando amônio como doador de elétrons	34
4.3 - Métodos analíticos	36
4.3.1 – Análises físico-químicas	36
4.3.2 – Estimativa de Sólidos Aderidos	36
4.3.3 – Estratégia de operação para manutenção da concentração de Oxigênio dissolvido na faixa desejada	38

4.4 – Exames microbiológicos	39
4.4.1 - Análise para estimativa de Número Mais Provável (NMP) de organismos nitrificantes e desnitrificantes	39
4.4.2 - Isolamento de cepas desnitrificantes nas amostras retiradas do reator durante operação com N-afluente de 125 e 250 mgN/L	40
4.4.3 - Extração e amplificação de DNAr pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) para as cepas isoladas de bactérias desnitrificantes nas amostras retiradas do reator durante operação com N-afluente de 125 e 250 mgN/L	41
4.4.4 - Análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA) para as cepas isoladas de bactérias desnitrificantes nas amostras retiradas do reator durante operação com N-afluente de 125 e 250 mgN/L	41
4.4.5 - Clonagem e seqüenciamento das cepas isoladas de desnitrificantes nas condições operacionais de N-afluente de 125 e 250 mgN/L	41
4.4.6 - Extração e amplificação de DNAr pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) da amostra de DNA total da biomassa microbiana na condição operacional de N-afluente de 250 mg N/L	42
4.4.7 - Clonagem e seqüenciamento da amostra contendo o DNA total da biomassa microbiana na condição operacional de N-afluente de 250 mgN/L	42
 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	 44
5.1 - Resultados e discussão das Etapas 1 e 2	44
5.1.1 - Concentração de oxigênio dissolvido (OD)	44
5.1.2 - Remoção de nitrogênio	45
5.1.3 - Concentração de nitrito e nitrato	47
5.1.4 - Estratégia de operação com aeração intermitente	49
5.1.5 - Velocidade de consumo de oxigênio	51
5.1.6 - Velocidade de desnitrificação via nitrito e via nitrato	52
5.1.7 - Verificação do potencial de desnitrificação com N-amoniaco como doador auxiliar de elétrons	54
5.1.8 - Fatores que podem ter estimulado a remoção de nitrogênio via nitrito durante as etapas 1 e 2	59
 5.2 – Resultados e discussão relativos à operação do reator com N-amoniaco afluente de 500mg/L	 62
5.2.1 – Particularidades operacionais do reator quando submetido à concentração afluente de nitrogênio 500mg/L	62
5.2.2 - Oxigênio dissolvido durante operação do reator com N-amoniaco afluente de 500 mg N/L	63
5.2.3 – Valores de pH e alcalinidade	64
5.2.4 – Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal durante operação do reator com N-amoniaco afluente de 500 mg N/L	66
5.2.5 - Concentração de nitrito e nitrato	69
5.2.6 – Fatores que podem ter estimulado a remoção de nitrogênio via nitrito durante operação com N-afluente de 500 mg/L	72

5.3 – Resultados e discussão relativos à operação do reator com N-amoniaco afluente de 40mg/L.....	75
5.3.1 - Particularidades operacionais do reator quando submetido à concentração afluente de nitrogênio 40 mg N /L	75
5.3.2 - Eficiência de remoção de nitrogênio durante operação com N-afluente de 40 mg/L	76
5.3.3 - Remoção de nitrogênio via nitrito durante operação do reator com N-afluente 40 mg N/L	78
5.3.4 - Fatores que podem ter estimulado a remoção de nitrogênio via nitrito durante operação com N-afluente de 40 mg/L	79
5.4 - Exames microbiológicos	82
5.4.1 – Estimativa da população de organismos nitrificantes e desnitrificantes	82
5.4.2 - Isolamento e seqüenciamento do DNA 16S de cepas bacterianas das amostras retiradas do reator durante operação com N-afluente de 125 e 250 mgN/L	84
5.4.3 – Resultados do seqüenciamento do DNA total (16S ribossomal) da amostra de biomassa retirada do reator durante operação com N-afluente de 250 mgN/L.....	85
5.5 - Perda de massa e volume do leito de espuma utilizado para imobilização da biomassa	88
5.6 – Concentração de sólidos no reator.....	90
5.7 - Velocidade de remoção de nitrogênio	92
6 – CONCLUSÕES.....	94
6.1 - Conclusões gerais	94
6.2 - Conclusões referentes a cada etapa.....	95
6.2.1 - Conclusões referentes às Etapas 1 e 2 – operação do reator com concentração de nitrogênio amoniacal afluente de 125 e 250 mg N/L.....	96
6.2.2 - Conclusões referentes à Etapa 3 – operação do reator com concentração de nitrogênio amoniacal afluente de 500 mg N/L.....	97
6.2.3 - Conclusões referentes à Etapa 4 – operação do reator com concentração de nitrogênio amoniacal afluente de 40 mg N/L.....	98
7 – SUGESTÕES.....	99
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 - INTRODUÇÃO

A maneira mais usada para a remoção de nitrogênio de águas residuárias é promover dentro de reatores biológicos a mesma rotina que acontece na natureza, onde o estabelecimento de condições favoráveis ao crescimento dos microrganismos é o único requisito para acelerar o processo (CIUDAD *et al.*, 2005). Esta relativa simplicidade pode criar expectativas quanto à maior probabilidade de um bom desempenho do reator, porém, repetir todas as etapas que acontecem na natureza para promover a remoção de nitrogênio pode levar a um gasto desnecessário.

As condições operacionais podem ser alteradas de modo a suprimir etapas que forem consideradas desnecessárias para o objetivo final do sistema. No caso da remoção biológica de nitrogênio, pela observação da seqüência das reações envolvidas na nitrificação e desnitrificação, a ocorrência de nitrito como produto intermediário em ambos, desperta o interesse na remoção de nitrogênio via nitrito.

Para possibilitar esta rota, é necessário inibir a nitratação, promovendo o acúmulo de nitrito e, a partir daí, promover a redução do nitrito para nitrogênio gasoso. O acúmulo de nitrito foi observado involuntariamente e considerado indesejado até a década de 70, quando então começou a ser considerado vantajoso do ponto de vista econômico (POLANCO *et al.*, 1996).

Desde então, diversos pesquisadores procuram identificar os parâmetros de operação que possam estimular esta rota que, pela estequiometria, requer menor aporte de oxigênio e de fontes externas de carbono (TURK e MAVINIC, 1987; SURMACZ-GÓRSKA *et al.*, 1997; ABELING e SEYFRIED, 1992; POLLICE *et al.*, 2002; KATSOGIANNIS *et al.*, 2003).

Conseguido o acúmulo de nitrito, que é a etapa mais crítica, o uso de aeração intermitente permite que a nitrificação e a desnitrificação ocorram no mesmo reator, o que

evita transtornos operacionais e despesas com bombeamento e recirculação. Além disso, a alternância de períodos aerados e não aerados pode facilitar o controle de pH, porque metade da alcalinidade requerida na nitrificação é devolvida ao sistema na desnitrificação (BARNES e BLISS 1983).

Al-Ghusain *et al.* (2002) estudando as transformações ocorridas com as formas de nitrogênio durante a digestão de lodo em reator operado com períodos aeróbios e anóxicos relatam que, o uso de períodos de aeróbios e anóxicos possibilitou que o sistema tivesse menor variação dos valores de alcalinidade e, conseqüentemente, favoreceu o controle do pH.

A idéia de promover as etapas aeróbia e anóxica no mesmo reator, já havia sido proposta por Irvine e Busch (1979), quando observaram que zonas anóxicas ocorriam naturalmente em sistemas aeróbios de tratamento e favoreciam a remoção de nitrogênio. A partir desse fato, os autores sugeriram que os reatores poderiam ser modificados para promover a existência de zonas anóxicas e, com isso, facilitar o tratamento de efluentes com altas concentrações ou múltiplos compostos.

Novas configurações de reatores têm sido desenvolvidas visando melhorar o desempenho dos sistemas de tratamento. Dentre os reatores propostos, o reator em batelada com biomassa imobilizada, proposto por Ratusznei *et al.* (2000) e modificado por Cubas *et al.* (2001), mostrou-se eficiente no tratamento anaeróbio de água residuária sintética simulando esgoto sanitário.

O reator em batelada e aeração intermitente pode permitir o aprimoramento do controle das características do efluente. Com o monitoramento das concentrações das formas de nitrogênio durante a operação do reator, pode-se determinar o tempo de ciclo e de aeração que permitam ao efluente alcançar os padrões de lançamento (IRVINE e BUSCH, 1979)

Outra vantagem do reator proposto é a imobilização da biomassa que, para as bactérias nitrificantes, que apresentam crescimento lento e baixo rendimento celular, pode significar a diferença entre permanecerem ou serem arrastadas do reator juntamente com o efluente. Segundo Barnes e Bliss (1983), embora aderir a uma superfície não seja essencial para o crescimento desses organismos, a imobilização da biomassa facilita sua permanência no sistema.

Ruiz *et al.* (2005) ressaltam uma outra grande vantagem de promover a nitrificação a nitrito seguida de desnitrificação. Segundo os autores, esta rota simplesmente representa uma estratégia operacional, que pode ser aplicada a sistemas já existentes sem investimentos extras.

A partir de todas as vantagens da remoção via nitrito, este estudo buscou aliar a flexibilidade do reator operado em batelada e aeração intermitente às vantagens da imobilização da biomassa no estabelecimento de condições adequadas para promover a remoção de nitrogênio via oxidação de nitrogênio amoniacal à nitrito, seguida de desnitrificação. Buscou-se também avaliar a estabilidade do reator na manutenção dessas rotas metabólicas pelas populações envolvidas quando submetidas a diferentes condições operacionais.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar a capacidade de um reator contendo biomassa imobilizada, operado em bateladas sequenciais e sob aeração intermitente, em remover nitrogênio amoniacal via nitrificação a nitrito e desnitrificação.

2.2 - Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

Avaliar a eficiência do reator no período aeróbio em converter nitrogênio amoniacal a nitrito e nitrato.

Avaliar a eficiência da desnitrificação nos períodos anóxicos utilizando etanol como fonte de carbono e doador de elétrons.

Verificar a possibilidade de se obter nitrito como forma oxidada predominante de nitrogênio nos períodos aeróbio, bem como o efeito dos parâmetros operacionais na estabilidade desse processo.

Determinar os períodos de aeração e não aeração adequados, através do monitoramento do desempenho do reator ao longo das bateladas para diferentes concentrações iniciais de N-amoniacal.

Avaliar os tempos das reações, através de perfil das concentrações das espécies de nitrogênio oxidadas, para determinar o tempo de ciclo ideal para cada concentração.

3 – REVISÃO DA LITERATURA

O método mais comum de remoção de nitrogênio consiste em promover a nitrificação, em ambiente aeróbio, seguindo-se a desnitrificação em ambiente anóxico, porém, estes processos podem acontecer concomitantemente quando o reator é submetido à reduzidas concentrações de oxigênio dissolvido (MULLER, 1995).

Os microrganismos considerados responsáveis pelo processo de nitrificação são autótrofos quimiossintetizantes, para os quais a fonte de carbono é inorgânica, e a energia é obtida através da oxidação de substrato inorgânico. Em sistemas de tratamento de efluentes líquidos, a contribuição de organismos heterótrofos na nitrificação pode ser considerada desprezível (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998).

O processo biológico de nitrificação a partir do nitrogênio amoniacal ocorre em várias etapas, podendo ser simplificaradamente resumido em duas etapas. Na primeira, pela ação enzimática dos microrganismos, o nitrogênio amoniacal é oxidado a hidroxilamina e, posteriormente, a nitrito (equações 3.1 e 3.2.).

O processo de nitrificação é usualmente representado partindo do íon amônio devido a predominância da forma ionizada (NH_4^+) a valores de pH dentro da faixa ideal da nitrificação, porém a amônia livre (NH_3), e não o íon amônio, é provavelmente a principal forma de nitrogênio utilizada como substrato para a oxidação à nitrito Suzuki *et al.* (1974).

Segundo Wiesmann (1994) a amônia em sua forma não ionizada é o substrato para *Nitrosomonas*, porque menos energia é requerida para seu transporte para dentro da célula,

em comparação a energia gasta no transporte da forma ionizada.

Na segunda etapa (equação 3.3), o nitrito é oxidado para nitrato. Com essa reação, os organismos envolvidos no processo conseguem energia para síntese e manutenção celular (BARNES e BLISS, 1983). A predominância de uma ou outra espécie de microrganismo depende das condições do meio em que o processo biológico ocorre (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998).

A desnitrificação pode ser realizada por diversos microrganismos heterotróficos facultativos, não exigindo bactérias específicas, como no processo de nitrificação. No processo de desnitrificação, via de regra, o nitrato é reduzido a nitrito, que posteriormente é convertido a nitrogênio gasoso (BARNES e BLISS, 1983). A faixa ótima de pH situa-se entre 6,5 e 8,0 (SURAMPALLI *et al.*, 1997) e a temperatura entre 35 a 50 °C (BARNES e BLISS, 1983).

A equação (3.4) mostra a redução do nitrato usando etanol como doador de elétrons, e a equação (3.5) a redução do nitrito com a mesma fonte de carbono (KOTLAR *et al.* 1996).

Aesoy *et al.* (1998) compararam o uso de etanol, ácido acético e lodo hidrolizado como fontes de carbono para a desnitrificação de um efluente sintético. Nesse estudo, o etanol proporcionou maior estabilidade ao processo e menor concentração de nitrito no efluente. A relação requerida DQO/N para o etanol foi de 4,5.

Nyberg *et al.* (1996) estudaram a adição de etanol e metanol em um sistema em escala real. Em seu estudo relatam que o sistema havia sido projetado para adição de metanol, porém, pela disponibilidade de um resíduo líquido de uma indústria farmacêutica que continha grande quantidade de etanol, este substituiu por nove meses o metanol. Durante este período, o sistema apresentou velocidade de utilização de nitrato três vezes

maior, comparada ao período em que foi adicionado metanol como fonte de carbono e doador de elétrons.

Além da nitrificação a nitrato seguida de desnitrificação, outra maneira de se obter nitrogênio gasoso é a chamada desnitrificação curta, ou remoção via nitrito, através da qual o nitrogênio afluente é oxidado a nitrito, em ambiente aeróbio e, após esta etapa é reduzido a nitrogênio gasoso em ambiente anóxico. Assim, a desnitrificação acontece pela sua redução para nitrogênio molecular, dispensando a fase redução do nitrato (SURMACZ-GÓRSKA *et al.*, 1997).

3.1- Remoção de nitrogênio via nitrito

O acúmulo de nitrito era considerado um efeito indesejado pela sua toxicidade em ambientes aquáticos e pelo consumo de cloro durante a desinfecção Rhee *et al.* (1997). O que antes era visto como um problema resultante das condições operacionais ou das características do resíduo, passou a ser considerado vantajoso do ponto de vista econômico a partir da década de 70 com os estudos que surgiram a respeito da remoção de nitrogênio via nitrito (POLANCO *et al.* 1996).

Segundo Villaverde *et al.* (1997), o acúmulo de nitrito ocorre principalmente durante a partida do reator, devido ao crescimento mais lento dos organismos oxidantes de nitrito, comparado ao crescimento das bactérias oxidantes de nitrogênio amoniacal. Porém, diante das vantagens da remoção de nitrogênio via nitrito, diversas maneiras têm sido estudadas para explorar melhor esta via de remoção.

Como vantagens da remoção de nitrogênio via nitrito, é evidente a economia de 25% da demanda de oxigênio requerida na oxidação de nitrogênio amoniacal a nitrato (SURMACZ-GÓRSKA *et al.*, 1997; TURK e MAVINIC, 1989). Além disso, o crescimento da biomassa anaeróbia é menor (TURK e MAVINIC, 1989). Adicionalmente, segundo Turk e Mavinic (1989), a remoção via nitrito possibilita economia de 40% de fonte de carbono adicionada na etapa de desnitrificação.

Abeling e Seyfried (1992) relataram eficiência de 90% na remoção de nitrogênio via nitrito com a relação DQO/N igual a 2,8, durante estudo com efluente pré-tratado de uma

indústria dedicada a produção de amido de batata. Katsogiannis *et al.* (2003), utilizando um reator de bancada alimentado com substrato sintético, usaram acetato como fonte de carbono na razão C/N igual a 3 para a desnitrificação via nitrito. Estes valores, comparados à relação DQO/N de 4,5, encontrada para a desnitrificação a partir do nitrato (AESOY *et al.*, 1998; NYBERG *et al.*, 1996), evidenciam a economia na adição de fonte externa de carbono.

Embora a remoção via nitrito possa economizar fonte de carbono, a relação DQO/N deve possibilitar desnitrificação completa do nitrogênio. Itokawa *et al.* (2001) estudaram a influencia da razão DQO/N na emissão de óxido nitroso durante a desnitrificação em um reator com aeração intermitente. Os autores observaram que, na presença de nitrito, a desnitrificação endógena causada pela baixa razão DQO/N favoreceu a emissão de N₂O. Além disso, durante a fase aerada, pequena quantidade deste óxido foi produzida.

Outra vantagem desta rota é a maior velocidade de desnitrificação, que possibilita diminuição do período de tempo destinado à reação. Relatos da literatura apontam diferença significativa entre as velocidades de desnitrificação via nitrito e via nitrato, sendo que a velocidade via nitrito é sempre maior, 63% (TURK e MAVINIC, 1989), duas vezes maior (ABELING e SEYFRIED, 1992), ou até de 3 a 5 vezes mais rápida que a desnitrificação via nitrato (GEE e KIM, 2004).

As principais maneiras de remoção de nitrogênio via nitrito estudadas são o processo SHARON (Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite) (MULDER e VAN KEMPEN, 1997) e a inibição dos organismos oxidantes de nitrito por amônia livre (NH₃). Ambas impedem a completa nitrificação, com a interrupção do processo após a oxidação de N-amoniaco e antes da oxidação do nitrato. Desse modo, o substrato inicial da desnitrificação é o nitrogênio na forma de nitrito, o que dispensa a primeira etapa da desnitrificação.

A equação (3.5) mostra, simplificadamente, a sequência das formas de nitrogênio na nitrificação. A equação (3.6) mostra a sequência na desnitrificação. A rota que mostra a remoção de nitrogênio via nitrito é realçada na cor cinza. Porém, em sistemas convencionais, a limitação para esta rota é a rápida conversão do nitrito para nitrato.

No processo SHARON, Mulder e Van Kempen (1997) relatam que não há a necessidade de longo tempo de retenção celular. A característica especial deste processo é ter como produto da nitrificação predominantemente o nitrito e não o nitrato. Os autores descrevem que, em condições normais, o crescimento de *Nitrobacter* impede o acúmulo de nitrito. Porém, dependendo da temperatura, a velocidade de crescimento de *Nitrosomonas* pode exceder a velocidade de crescimento de *Nitrobacter* e, deste modo, o tempo de detenção pode reter *Nitrosomonas* e não ser suficiente para reter as *Nitrobacter* (FIGURA 3.1), o que terá como consequência a predominância de nitrito como forma oxidada de nitrogênio.

FIGURA 3.1. Retirada de *Nitrobacter* do sistema pelo reduzido tempo de retenção celular
Representação esquemática - sem escala vertical como na fonte
Fonte: Mulder e van Kempen (1997)

Assim, a escolha do tempo de detenção deve se basear no tempo mínimo de retenção celular necessário para possibilitar a permanência das bactérias oxidantes de N-amoniaco e, também, deve possibilitar que as bactérias oxidantes de nitrito sejam removidas do sistema. Segundo Jetten *et al.* (1999), o processo SHARON de remoção de nitrogênio pode ser conseguido com temperaturas em torno de 25°C. Porém, a limitação do processo SHARON é a dificuldade de controle da temperatura nos reatores em escala real.

Diversas maneiras são estudadas para inibir a oxidação do nitrito a nitrato. Yoo *et al.* (1999) estudaram a remoção de nitrogênio via nitrito por nitrificação/desnitrificação

simultâneas, utilizando substrato sintético. Os autores relatam que a hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}/\text{NH}_3\text{OH}^+$), produto intermediário da nitrificação considerado inibidor para *Nitrobacter*, pode ter sido o principal responsável pelo acúmulo de nitrito, porque esta substância tende a se acumular em ambientes com baixo OD, alto pH, e alta razão $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$.

A forma mais divulgada de inibição da nitratação tem sido a inibição dos organismos por amônia livre. Os organismos oxidantes de nitrito são mais sensíveis às concentrações de amônia livre e nitrito que os organismos oxidantes de N-amoniaco, o que pode levar ao acúmulo de nitrito (ANTHONISEN *et al.*, 1976). Esta diferença de sensibilidade entre esses organismos tem sido usada para inibir a segunda etapa do processo de nitrificação, procurando-se a remoção de nitrogênio via nitrito (SURMACZ-GÓRSKA *et al.*, 1997; TURK E MAVINIC, 1989; YOO *et al.*, 1999).

Segundo Anthonisen *et al.* (1976), a concentração de amônia livre, em função do pH, temperatura e da concentração de N-amoniaco, é dada pela equação (3.7).

$$\text{Amonia livre (mg/L)} = \frac{17}{14} \times \frac{N - \text{amoniaco (mg/l)} \times 10^{\text{pH}}}{e^{(6.344/273 + 0^\circ\text{C})} + 10^{\text{pH}}} \quad (3.7)$$

A inibição de *Nitrobacter* por amônia livre (NH_3) pode ocorrer em concentrações a partir de 0,1 mg/L (ANTHONISEN *et al.*, 1976). Para *Nitrosomonas*, a concentração inicial de amônia livre que promove a inibição pode estar no intervalo de 10 a 150 mg/L (ANTHONISEN *et al.*, 1976) ou acima de 30 mg/L (FORD e CHURCHWELL, 1980).

Para promover a remoção de nitrogênio via nitrito é necessário inibir a oxidação de nitrito sem interferir negativamente na oxidação do nitrogênio amoniaco. Diversos estudos foram realizados em busca da concentração de amônia livre que permita esta inibição seletiva (SURMACZ-GÓRSKA *et al.*, 1997; ABELING e SEYFRIED, 1992; TURK e MAVINIC, 1989; ÇEÇEN, 1996).

Abeling e Seyfried (1992) em estudo da remoção de nitrogênio via nitrito, trabalharam com um reator em escala piloto, com biomassa imobilizada em meio suporte plástico. O reator foi alimentado continuamente com efluente pré-tratado de uma indústria dedicada a produção de amido de batata, operado com pH entre 8,3 e 8,5 e temperatura de

20 °C. Os autores relatam que com concentração de amônia livre entre 1 a 5 mg/L houve a inibição das bactérias oxidantes de nitrito, mas não das bactérias oxidantes de N-amoniacal.

Surmacz-Górska *et al.* (1997) estudaram a nitrificação curta em um sistema de lodos ativados em escala de bancada. O reator foi alimentado com substrato sintético e operado com pH próximo de 8. Os autores relatam que houve acúmulo de nitrito, sem inibir a oxidação da N-amoniacal, com concentração de amônia livre de 1 a 6 mg N-NH₃/L.

Porém, o acúmulo de nitrito pode não ser permanente, em decorrência da adaptação das bactérias oxidantes de nitrito à concentração de amônia livre (TURK e MAVINIC, 1989; VILLAYERDE *et al.*, 2000).

Turk e Mavinic (1989) utilizaram reatores de lodos ativados em escala de bancada para estudo da manutenção do acúmulo de nitrito em sistemas adaptados a amônia livre. Os autores observaram que, mesmo com concentração média de amônia livre de 25,5 mg/L e picos de até 40 mg/L, não foi possível deter a diminuição no acúmulo de nitrito.

Villaverde *et al.* (2000) relatam que, após quatro meses de operação de um biofiltro submerso, observaram adaptação e recuperação da atividade de organismos oxidantes de nitrito, o que foi considerado um indicativo da dificuldade em obter a remoção de nitrogênio via nitrito durante longos períodos de operação.

Çeçen (1996) estudou a nitrificação parcial em resíduo sintético simulando efluente de indústria de fertilizantes. Para isto, o autor utilizou um reator de fluxo ascendente preenchido com cilindros de polietileno para imobilização da biomassa. O autor ressalta que, além do efeito da adaptação das bactérias oxidantes de nitrito, a diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal, causada por sua própria oxidação, pode tornar inviável manter o acúmulo de nitrito.

Como o equilíbrio entre o íon amônio e amônia livre está diretamente ligado à temperatura e ao pH, pode-se ter a mesma concentração de amônia livre para diferentes valores de temperatura e de pH. Neste caso, embora a concentração do inibidor seja a mesma, a atividade dos organismos oxidantes de N-amoniacal e nitrito será diferente, como consequência do efeito combinado do pH, da temperatura e concentração de amônia livre, o que pode explicar a diferença encontrada entre os limites de inibição por amônia livre estabelecidos por diferentes pesquisadores (POLANCO *et al.*, 1996).

Polanco *et al.* (1996) utilizaram um biofiltro preenchido com material pozolânico

para imobilização da biomassa. Foram realizados três experimentos, nos quais foi mantida a razão entre concentração de amônia livre e a concentração de Sólidos Voláteis Aderidos (SVA) igual a 0,5mg N-NH₃ por grama de SVA. Alterando a temperatura, pH e N-amoniacal, os autores relatam que o efeito da temperatura pode ser preponderante comparado ao efeito da concentração de N-amoniacal. Além disso, o efeito do pH pode ser predominante em relação ao efeito da temperatura.

Quanto à alcalinidade, Villaverde *et al* (1997) relatam que, durante operação de um filtro biológico em escala de bancada com remoção de nitrogênio via nitrito, o consumo de alcalinidade foi de 7,1 mg CaCO₃ por mg N-amoniacal oxidado, exatamente a quantidade requerida pela estequiometria. Porém, Hwang *et al.* (2000), estudando a influência da alcalinidade na remoção curta de nitrogênio, relatam que a atividade das bactérias oxidantes de N-amoniacal aumentou quando a razão alcalinidade/N-amoniacal foi elevada para 9,4. Aliado ao melhor desempenho das nitritantes devido ao aumento da alcalinidade, o aumento do pH fez com que a concentração de amônia livre aumentasse, o que, por sua vez, promoveu a inibição seletiva das bactérias oxidantes de nitrito, melhorando o desempenho quanto ao acúmulo de nitrito no filtro biológico de fluxo ascendente (HWANG *et al.*, 2000).

Embora seja difícil isolar o pH da concentração de amônia livre, a manutenção de valores elevados de pH no reator pode favorecer o acúmulo de nitrito. Para isso, pode-se operar o reator em valor de pH que possibilite maior atividade de organismos nitritantes em comparação aos nitratantes.

Bae *et al.* (2002), estudando os fatores operacionais que melhor proporcionassem o acúmulo de nitrito em um reator em batelada alimentado com substrato sintético contendo 50 mg/L de N-amoniacal, OD de 2 a 3 mg/L e temperatura de 30 °C, relatam que o acúmulo de nitrito foi desprezível em pH próximo de 7 e favorecido com valores de pH entre 8 e 9. Villaverde *et al.* (1997) relatam que o acúmulo de nitrito teve início a partir de pH 7,5 e chegou a representar 85 % do nitrogênio oxidado no pH 8,5. Relatam ainda que, com pH 8, observaram máxima atividade das bactérias oxidantes de N-amoniacal.

A remoção de nitrogênio via nitrito pode ser favorecida pela escolha da temperatura, que deve favorecer o crescimento das *Nitrosomonas* e a desnitrificação. Ford e Churchwell (1980) relatam que a temperatura ótima para cultura pura de *Nitrosomonas* varia entre 30 e

36°C, com crescimento ótimo em 35°C; para *Nitrobacter*, a temperatura considerada ótima está entre 8 e 28, com ótimo em 28°C.

Porém, a temperatura ótima para crescimento das bactérias pode não ser um fator isolado. Segundo Alician (1986), a temperatura que proporciona a maior velocidade de oxidação de nitrito pelas bactérias *Nitrobacter winogradskyi* depende da concentração de OD e de nitrito no ambiente. Deste modo, pelas concentrações normalmente encontradas em esgoto sanitário, a velocidade de oxidação máxima ocorre com temperatura abaixo de 15 °C e não próxima de 30 °C. Isto significa que o acúmulo de nitrito pode ser consequência das elevadas temperaturas em sistemas nitrificantes durante o verão.

O acúmulo de nitrito pode ser favorecido também pela baixa concentração de oxigênio dissolvido (ÇEÇEN, 1996; YOO *et al.*, 1999; GARRIDO *et al.*, 1996; POLLICE *et al.*, 2002). Segundo Wiesmann (1994), os organismos oxidantes de N-amoniaco requerem OD de pelo menos 0,3 mg/L e os organismos oxidantes de nitrito 1,1mg/L. Esta diferença pode explicar a observação de acúmulo de nitrito para reatores submetidos à baixas concentrações de OD.

Yoo *et al.* (1999) recomendam, para máxima nitrificação e mínima nitratação, concentração média de OD próxima de 1,3 mg/L. Este valor é próximo da concentração de 1,5 mg/L que possibilitou alta concentração de nitrito no efluente e satisfatória remoção de N-amoniaco nos experimentos de Garrido *et al.* (1996).

Garrido *et al.* (1996) estudaram a influência do oxigênio dissolvido no acúmulo de nitrito. Para este estudo, foi utilizado um reator em escala de bancada alimentado com substrato sintético contendo 14 mmol/L. Quando a concentração de OD foi de 2,5mg/L, houve completa nitratação; para concentração de OD entre 1 e 2 mg/L, ocorreu o máximo acúmulo de nitrito. Para concentração de OD menor que 1 mg/L, a conversão de nitrogênio amoniacal foi reduzida.

Ruiz *et al.* (2005) relatam que, utilizando um reator contínuo com agitação mecânica para verificar a interferência dos parâmetros operacionais no acúmulo de nitrito, observaram que a nitrificação não foi afetada pela redução da concentração de OD de 5,7 a 1,7 mg/L. O máximo acúmulo de nitrito, sem afetar a oxidação do nitrogênio amoniacal, ocorreu com OD de 0,7 mg/L.

Hanaki *et al.* (1990), trabalhando com sistema destinado a nitrificação, relataram que a baixa concentração de OD aumentou o rendimento celular das bactérias oxidantes de N-amoniacal e diminuiu a taxa específica de utilização do substrato. Porém, o alto rendimento celular possibilitava a presença de grande população de bactérias oxidantes de N-amoniacal no reator, o que compensava a reduzida velocidade de utilização do substrato.

A baixa concentração de OD pode favorecer o acúmulo de nitrito, porém, pode ocasionar formação de produtos indesejáveis como o óxido nítrico. Segundo Okayasu *et al.* (1997), a emissão de N_2O durante a nitrificação é fortemente dependente da concentração de OD no reator. Quando a concentração de oxigênio é suficiente, a emissão deste óxido é desprezível. Porém, com baixas concentrações de OD ocorre grande conversão para N_2O .

Çeçen (1996) afirma que, mais importante que a concentração de OD, é a sua relação OD/N-NH₃, que favorece o acúmulo de nitrito quando se torna menor que 10, ou seja a concentração de OD deve ser analisada juntamente com a concentração de amônia livre.

Embora a baixa concentração de OD favoreça o acúmulo de nitrito, este parâmetro pode não ser essencial para a manutenção da remoção curta de nitrogênio. Gee e Kim (2004), utilizando como substrato o sobrenadante de um digestor de lodo com pH entre 7,5 a 8,5 e temperatura de 24 °C, relatam que houve acúmulo de nitrito com OD de 4 mg/L. Segundo os autores, a alta carga de N-amoniacal afluente foi a responsável pela supressão do crescimento dos organismos nitrificantes.

Jianlong e Ning (2003) relatam que, embora a oxidação do nitrogênio amoniacal e o acúmulo de nitrito sejam sensíveis às alterações nas condições operacionais, pH, amônia livre e OD, os resultados obtidos durante a operação do reator com substrato sintético e concentração de N-amoniacal variando de 100 a 900 mg/L indicaram que o pH e a amônia livre tiveram papel fundamental na remoção de nitrogênio via nitrito.

Outro fator importante é a disponibilidade de carbono para a biomassa nitrificante autótrofa. A disponibilidade de carbono é controlada pelo equilíbrio químico que depende do valor de pH. Em um ambiente com baixos valores de pH, o CO₂ pode ser eliminado por “stripping”, o que pode resultar em escassez de alcalinidade e, em valores elevados de pH, o carbono pode ser principalmente transformado em carbonatos, que são, na maioria, insolúveis e difíceis de assimilar (VILLAVARDE *et al.*, 1997)

Jun *et al.* (1999) estudaram a adição de carbono inorgânico como estimulador das bactérias nitrificantes. Em seu trabalho realizado com substrato sintético contendo N-amoniaco na concentração de 55 mg/L, aumentaram a concentração de carbono de 24 a 48 mg de carbono como NaHCO_3 , para cada mg de nitrogênio. Como resultado, relataram que a atividade das bactérias nitrificantes foi proporcional ao carbono inorgânico presente.

Quanto à participação de organismos heterótrofos na oxidação de N-amoniaco a nitrito, Rhee *et al.* (1997) relatam que isolaram organismos heterótrofos capazes de oxidar N-amoniaco a nitrito. Porém, embora presentes, os organismos nitrificantes heterótrofos não foram efetivos no reator seqüencial de batelada utilizado para estudar o acúmulo de nitrito.

Segundo Princic *et al.* (1998), a concentração de amônia, de oxigênio dissolvido e o pH são os parâmetros mais importantes para a velocidade de nitrificação e os mais prováveis para determinar a comunidade nitrificante selecionada.

Ao estudar os fatores que podem interferir no acúmulo de nitrito, é difícil isolar os efeitos da alcalinidade, do pH, da concentração de amônia livre, temperatura, oxigênio dissolvido, pois todos estes fatores estão interligados pelas leis de equilíbrio químico. Para elevar a concentração de OD pode-se provocar o “stripping” do CO_2 e, deste modo, elevar o pH, que juntamente com a temperatura, determina a concentração de amônia livre. Por outro lado, o “stripping” do CO_2 pode comprometer a disponibilidade de carbono inorgânico, que é a fonte de carbono para os organismos autótrofos oxidantes do nitrogênio amoniaco.

3.2 - Aeração intermitente na remoção biológica de nitrogênio

Uma das vantagens da aeração intermitente em um sistema operado para remoção de nitrogênio é a possibilidade de que ocorram menores variações nos valores de pH, pois, durante a oxidação de nitrogênio amoniaco para nitrito, ocorre liberação de íons H^+ , o que pode provocar diminuição significativa do pH. Porém, pela imposição de aeração intermitente, a atividade dos organismos no período anóxico devolve alcalinidade ao

sistema. Deste modo o pH pode ser controlado pela desnitrificação e, se necessário, pela dosagem adicional de hidróxido (Figura 3.2) (MULDER e VAN KEMPEN, 1997).

FIGURA 3.2. Variação de pH ao longo do ciclo
Fonte: Mulder e Van Kempen (1997)

Zonas anóxicas ocorrem naturalmente em sistemas aeróbios de tratamento e favorecem a remoção de nitrogênio. Irvine *et al.* (1979) estudaram o tratamento de esgoto sanitário em reator operado em bateladas sequenciais com agitação mecânica, alternando o período de aeração e não aeração afirmaram que, a desnitrificação se iniciava assim que a aeração era interrompida.

A aplicação de aeração intermitente pode evitar efeitos inibidores em reatores submetidos a efluentes com alta concentração de nitrogênio. Para isto, pode-se controlar a extensão do período de aeração de modo que a concentração de nitrito não atinja níveis inibidores. Segundo estudos de Cervantes *et al.* (2001), a desnitrificação foi inibida por nitrito com concentrações entre 200 e 400 mg N-NO₂⁻/L, com a formação de N-amoniacal.

Ruiz *et al.* (2005) relatam que durante operação de um reator UASB (Up Flow Anaerobic Sludge Blanket) em escala de bancada e alimentado com substrato sintético, observou-se a adaptação dos organismos desnitrificantes a elevados valores de

concentração de nitrito no substrato de alimentação, devido ao efeito de diluição, que possibilitava concentração em torno de 15 mg/L no interior do reator.

Abeling e Seyfried (1992) verificaram que as concentrações de nitrito relatadas como responsáveis por inibição da desnitrificação são muito diferentes e que, calculando-se os valores das concentrações de ácido nitroso a partir das concentrações nitrito e do pH, foram obtidos valores muito próximos, o que indica que a inibição ocorre pela presença de ácido nitroso. Os autores relataram que a concentração de 0,13 mg HNO₂/L foi suficiente para inibir os organismos desnitrificantes.

O ácido nitroso pode inibir também os organismos oxidantes de nitrito, mesmo em baixas concentrações, como na faixa entre 0,2 a 2,8 mg/L. De acordo com Anthonisen *et al.* (1976), a concentração deste ácido é dependente da concentração de nitrito, do pH e da temperatura segundo a equação 3.8.

$$HNO_2(mg/L) = \frac{46}{14} \times \frac{N - NO_2^-(mg/l)}{e^{(-2300/273+^oC)} \times 10^{pH}} \quad (3.8)$$

O uso de aeração intermitente pode favorecer que os processos de nitrificação e desnitrificação ocorram ao mesmo tempo, principalmente, no início do período aerado, enquanto o ambiente está anóxico e a concentração de OD ainda não suprime a desnitrificação (YOO *et al.*, 1999). Além disso, ambientes com baixas concentrações de OD e alta carga orgânica favorecem a nitrificação heterotrófica, que pode oxidar parcela do N-amoniaco (ZHAO *et al.*, 1999).

A mudança de ambiente anóxico para aeróbio favorece o acúmulo de nitrito por aumentar a fase *lag* dos organismos oxidantes de nitrito. Assim, para promover a remoção de nitrogênio via nitrito, o tempo de aeração deve ser longo o suficiente para ocorrer a nitrificação, mas curto o suficiente para não permitir a adaptação dos organismos oxidantes de nitrito (TURK e MAVINIC, 1989).

Segundo Jianlong e Ning (2003), períodos mais curtos de aeração podem favorecer o acúmulo de nitrito. Rhee *et al.* (1997) relatam que o acúmulo de nitrito foi favorecido com a operação dos reatores com períodos aeróbios menores. Segundo os autores, o período anóxico pode ter causado diminuição da velocidade de crescimento das bactérias

oxidantes de nitrito. Para impedir adaptação das bactérias oxidantes de nitrito, Yoo *et al.* (1999) recomendam tempo de aeração de 72 minutos.

Gee e Kim (2004) relatam que a existência de período anóxico pode estimular a atividade dos organismos oxidantes de N-amoniacal e também dos organismos oxidantes de nitrito e, desse modo, levar à redução no tempo necessário para a oxidação de nitrogênio amoniacal. Além disto, estudando a remoção de nitrogênio via nitrito, Gee e Kim (2004) relatam que a existência de um período anóxico pode favorecer esta rota, em seu estudo observaram que mais de 80% do nitrogênio oxidado permaneceu como nitrito no sistema nitrificante/desnitrificante, enquanto que, para o sistema sem período anóxico, a concentração de nitrito representou apenas 60% do nitrogênio oxidado.

Katsogiannis *et al.* (2003) também relataram que o curto período de aeração pode ter sido o responsável pela supressão dos organismos nitratantes e, conseqüentemente, pela remoção de nitrogênio via nitrito. Utilizando um reator de bancada, alimentado com substrato sintético com pH de 7,2 a 7,3, os autores impuseram séries de períodos aeróbios de 20 minutos seguidos por períodos anóxicos de uma hora e, com estas condições operacionais, a concentração máxima de nitrato não excedeu 0,5 mg/L.

Pollice *et al.* (2002) estudaram a influencia da aeração e da idade do lodo na oxidação de N-amoniacal para nitrito e nitrato, utilizando um reator em escala de bancada com N-amoniacal entre 350 a 500 mg N/L ressaltam que, a alternância entre aerobiose e anoxia pode favorecer a remoção simultânea de N-amoniacal e nitrito, embora relatem que, provavelmente, este processo não deve ter sido responsável pela perda de nitrogênio em seu experimento.

Em ambiente anaeróbio, o nitrogênio amoniacal pode atuar como doador de elétrons auxiliar e promover a desnitrificação com baixíssimas concentrações de produtos intermediários indesejáveis, como nitrito e os óxidos nítrico e nitroso (CERVANTES *et al.*, 2001). Em um sistema operado sob aeração intermitente que trata efluente com alta concentração de N-amoniacal, parcela dessa forma não oxidada no período de aeração pode servir como doador auxiliar de elétrons.

Porém, Béline e Martinez (2002) ressaltam que, cada etapa da desnitrificação utiliza uma enzima específica que pode ser diferentemente inibida pela presença de oxigênio dissolvido, sendo que a N₂O-redutase requer período mais longo para recuperar sua

atividade, comparada às enzimas nitrito e nitrato redutase. Os autores relatam também que, embora a aeração intermitente possa evitar a presença de oxigênio dissolvido na etapa da desnitrificação, o óxido nitroso pode ser emitido para a atmosfera caso a aeração inicie antes da completa desnitrificação.

Quando se procura uma cultura mista para promover, no mesmo reator, a nitrificação e a desnitrificação, pode ocorrer problema com o crescimento dos organismos heterotróficos porque, como os organismos desnitrificantes têm maior velocidade de crescimento que os nitrificantes, podem se tornar predominantes e levar os organismos nitrificantes a ficarem em camadas internas do biofilme desprovidas de oxigênio (KOTLAR *et al.*, 1996).

Quanto à duração do período de aeração e não aeração em reatores, diversos autores têm sugerido o uso do potencial redox como alternativa para escolha do tempo de aeração e não aeração. Estes defendem não o uso de um valor absoluto, mas estratégias de controle com base em mudanças características que aparecem na curva do potencial redox com o tempo (PEDDIE *et al.* 1990; WAREHAM *et al.* 1994; HAO e HUANG, 1996; RA *et al.*, 2000).

Segundo Peddie *et al.* (1990), o potencial redox pode ser definido como a medida da atividade dos elétrons envolvidos em reações de oxidação e redução, ocorridas em meio aquoso. Esses valores dependem da especificidade do meio, pois a atividade é influenciada por fatores como os constituintes químicos do sistema, variedade da atividade biológica, pH e temperatura e, além disso, alertam sobre o cuidado com interferência de outros equipamentos presentes no sistema sobre o equipamento de medida de potencial redox.

Wareham *et al.* (1993) estudaram o uso de potencial redox em tempo real para controlar a duração do período anóxico em um digestor de lodo. Os autores utilizaram dois reatores, sendo que um deles foi operado com 3 horas de aeração seguido de 3 horas sem aeração e o segundo reator trabalhou com 3 horas de aeração. Porém, a duração do período anóxico era determinada pelo programa de computador que detectava um ponto de inflexão na curva de potencial redox. Os autores explicam que o primeiro ponto de inflexão da curva de potencial redox acontece quando a concentração de OD pode ser lida por sondas. O segundo ponto de inflexão indica que todo o nitrato já foi desnitrificado e o ambiente está deixando de ser anóxico e passando a anaeróbio. Neste caso, poder-se-ia voltar a promover

a aeração, já que a anaerobiose não interessaria e, deste modo, utilizar melhor o tempo de operação.

Outra maneira para controlar o período de aeração e não aeração sugerida é a utilização da curva de pH (AL_GHUSAIN *et al.*, 1994; HAO e HUANG, 1996;). Al_Ghusain *et al.* (1994) relatam que um ponto de inflexão na curva formada pelo perfil temporal dos valores de pH pode indicar quando praticamente todo o nitrogênio amoniacal foi convertido para nitrato. Denominado *ammonia valley*, este ponto pode ser utilizado para indicar que a aeração deve ser interrompida. Para controlar o período de não aeração, os autores sugerem o ponto denominado *nitrate apex*, que coincide com o ponto de inflexão do nitrato na curva de potencial redox, evitando anaerobiose no sistema.

Uma possível desvantagem da operação do reator sob aeração intermitente está relacionada com a sedimentabilidade do lodo. Durante estudo dos parâmetros que favoreciam a remoção via nitrito e posterior desnitrificação, Ruiz *et al.* (2005) utilizaram dois reatores desnitrificantes e relataram que o lodo do reator contínuo, com agitação mecânica e aeração intermitente, não apresentou boa sedimentabilidade. Ocorreu a redução da biomassa no reator, o que teve, como consequência, a diminuição da eficiência de desnitrificação, fato que não foi observado no reator com manta de lodo submetido ao mesmo substrato.

3.3- Configuração dos reatores operados em batelada

O reator anaeróbio em batelada sequencial (ASBR – Anaerobic Sequential Batch Reactor), com crescimento do lodo biológico em suspensão, foi inicialmente desenvolvido por Dague e seus colaboradores na Universidade Estadual de Iowa (ANGENENT e DAGUE, 1995).

O ASBR apresenta quatro fases distintas em seu ciclo, (HALLOPETER e DAGUE, 1994):

- ✓ fase de enchimento: a concentração do substrato é máxima e tem-se maior velocidade de produção de biogás, o que pode promover a mistura interna e melhorar o contato da biomassa com o substrato;

- ✓ fase de reação: quando os organismos estabilizam o substrato; nessa fase pode-se usar mistura contínua ou intermitente;
- ✓ fase de sedimentação: o reator funciona como um sedimentador; a mistura é interrompida e a produção de gás é mínima; essa fase possibilita que a biomassa seja mantida no reator, aumentando-se o tempo de retenção celular,
- ✓ fase de descarte: o sobrenadante é removido do reator.

O funcionamento do ASBR dispensa dispositivos e preocupações com a distribuição uniforme do afluente, elimina a possibilidade de caminhos preferenciais, e dispensa recirculação do efluente (ANGENENT e DAGUE, 1995).

O reator em batelada necessita de mistura, que pode ser mecânica, hidráulica ou por recirculação de gás e sua intensidade deve ser controlada para não comprometer a formação e manutenção dos grânulos (ANGENENT e DAGUE, 1995).

Ratusznei *et al.* (2000) utilizaram um ASBR contendo biomassa imobilizada em cubos de espuma de poliuretano para o tratamento anaeróbico de resíduo sintético, os autores relatam que, a imobilização da biomassa proporcionou ao reator melhor capacidade de retenção de sólidos e, além disso, dispensa a formação de grânulos e o período de sedimentação.

Irvine e Busch (1979) exemplificam a flexibilidade de operação pelo controle dos tempos de reação e de enchimento em função das características do afluente e do efluente desejado.

Em constante desenvolvimento, o tratamento de águas residuárias busca, além de melhor entendimento dos processos, novas configurações de reatores para alcançar o melhor aproveitamento do volume útil reacional e, com isto, diminuir o volume total, aumentar a facilidade de operação e reduzir custos.

Ratusznei *et al.* (2000), apresentaram uma configuração de ASBR com biomassa imobilizada em partículas de espuma de poliuretano, as quais ficam contidas em um cesto; a agitação é promovida por um agitador magnético no fundo do reator. Cubas *et al.* (2001) apresentaram uma modificação deste modelo, provido de agitação mecânica com impelidores tipo turbina e com maior razão entre o volume trocado em cada ciclo e o volume total do reator. Ambos os reatores apresentaram resultados satisfatórios no

tratamento anaeróbio de substratos sintéticos, criando perspectivas favoráveis a novos estudos.

A imobilização da biomassa, que pode favorecer a permanência dos organismos de crescimento lento, como as bactérias nitrificantes, e a maior flexibilidade de operação do reator em batelada, tornam o reator acima citado, com inserção de aeração intermitente, uma alternativa interessante para o estudo da remoção de nitrogênio via nitrito.

3.3.1 – reatores contendo biomassa imobilizada

A imobilização da biomassa adiciona, às vantagens do Reator em Batelada Sequencial (SBR – Sequential Batch Reactor), as vantagens do crescimento aderido como: melhor desempenho no tratamento de compostos orgânicos presentes em baixa concentração; manutenção de organismos de crescimento lento; melhor retenção de organismos que apresentam baixa velocidade de sedimentação; e eliminação da necessidade do período de sedimentação (HIRL e IRVINE, 1996).

As bactérias nitrificantes são exemplos de organismos de crescimento lento e baixo rendimento celular, que necessitam altos tempos de retenção celular (BARNES e BLISS, 1983). A partir da observação da presença destes organismos aderidos a materiais suporte inertes, buscam-se oferecer meios para facilitar sua imobilização e, com isto, evitar que eles sejam removidos juntamente com o efluente do sistema (KOTLAR *et al.*, 1996).

Segundo Hagopian e Riley (1998), os organismos nitrificantes tendem a liberar polímero extracelular que facilita sua fixação em uma matriz de lodo. Rostron *et al.* (2001) relatam que, com a imobilização, além de se obter maior tempo de retenção celular, é possível conseguir, também, maior concentração de biomassa ativa. O aumento da concentração de biomassa pode resultar em maior eficiência do sistema e possibilitar o tratamento em reatores menores. Além disso, pode proporcionar maior resistência à cargas de choque, a tóxicos e à variação de temperatura.

De acordo com Hao e Huang (1996), a utilização de aeração intermitente pode interferir negativamente na sedimentabilidade do lodo. Porém, estudos de Gieseke *et al.* (2002) relatam que a imobilização da biomassa possibilita que o biofilme seja exposto a condições alternadas de aeração; além disso, o biofilme é espacialmente heterogêneo e

permite a presença de organismos aeróbios e anaeróbios, o que possibilita a ocorrência do processo de nitrificação e desnitrificação.

Apesar de todas as vantagens da imobilização da biomassa, a possibilidade de reter os organismos oxidantes de nitrito a nitrato pode não ser favorável a remoção curta de nitrogênio pois, segundo estudo de Pollice *et al.* (2002), sobre a influência da aeração e do tempo de retenção celular na oxidação de N-amoniacal, o controle do tempo de retenção celular é essencial para se conseguir a remoção de nitrogênio via nitrito quando a concentração de oxigênio dissolvido não é o fator limitante para a oxidação de nitrito para nitrato.

A imobilização da biomassa em cubos de espuma de poliuretano foi utilizada em reatores em escala de bancada para realização de pesquisas na degradação de diversos poluentes (ZAIAT *et al.*; 1994; RATUSZNEI *et al.*, 2000; CUBAS *et al.* 2001), porém, embora tenha apresentado bom desempenho como meio suporte, existe a possibilidade de degradação deste material.

A degradação de polímeros sintéticos depende da estrutura do material, da presença de organismos capazes de degradá-los e das condições ambientais que favoreçam o crescimento destes organismos (GU, 2003). Detalhadamente, a biodegradação do polímero depende de propriedades como orientação molecular, cristalinidade e grupos químicos presentes na cadeia polimérica que determinam a facilidade de acesso das enzimas de degradação (HOWARD, 2002).

Polímeros podem ser também considerados substratos para organismos heterótrofos: fungos e bactérias. A associação de processos biológicos a fatores abióticos pode facilitar a degradação do polímero (GU, 2003). Diversas espécies do gênero *Pseudomonas* e algumas bactérias desnitrificantes utilizam poliuretano como única fonte de carbono e energia (HOWARD, 2002).

O mecanismo de degradação de polímeros ocorre pela ação das enzimas extracelulares, que quebram cadeias poliméricas complexas em cadeias mais curtas ou moléculas menores, permitindo a difusão pela membrana celular e, desse modo, podem ser utilizadas como fonte de carbono e energia (GU, 2003).

Quanto ao mecanismo de degradação do poliuretano, a enzima extracelular PU-esterase pode hidrolisar o polímero para partículas menores, o que facilita a ação das

enzimas ao polímero parcialmente degradado. Este mecanismo pode diminuir a competição entre os organismos que degradam o poliuretano e, além disso, melhorar o acesso dessas células aos metabólitos (HOWARD, 2002)

3.3.2 – Agitação

O ASBR necessita de mistura que pode ser mecânica, hidráulica ou por recirculação do gás gerado (ANGENENT e DAGUE, 1995). Para reatores aeróbios, os aeradores, além de fornecer oxigênio, são freqüentemente utilizados para promover a mistura (METCALF e EDDY, 1991).

A velocidade da biotransformação é controlada pelo efeito combinado da transferência de massa de uma substância para a célula e da atividade celular intrínseca. Na maioria das vezes, a limitação à biorremediação é devida à transferência de massa insatisfatória que impede a exploração de todo o potencial de degradação dos microrganismos (BOSMA *et al.*, 1997).

Em um sistema com cultura mista, os organismos heterótrofos, por terem maior velocidade de crescimento, podem predominar na superfície do biofilme. Desse modo, além do consumo de oxigênio pelas bactérias heterótrofas, sua camada funciona como barreira à transferência de massa, interferindo no crescimento das bactérias nitrificantes e, conseqüentemente, na nitrificação (NOGUEIRA *et al.*, 2002). O uso de um agitador com uma rotação adequada pode diminuir a limitação à transferência de massa.

Em um reator em batelada, a transferência de massa afeta o desempenho e o tempo de ciclo requerido. Desse modo, a agitação pode ser controlada para reduzir a limitação à transferência de massa e deve ser escolhida pela consideração dos aspectos ambientais e econômicos (CUBAS *et al.*, 2001).

Pela revisão da literatura, a baixa concentração de oxigênio, a alternância de períodos aeróbios e anóxicos, a elevada concentração de N-amoniaco, tudo isso, associado ao crescimento lento dos organismos nitrificantes, poderia comprometer o bom desempenho do sistema usado para remoção de nitrogênio, por isso torna-se tão interessante entender melhor quais fatores são realmente essenciais para promover a

remoção de nitrogênio via nitrito, e também, verificar se a imobilização da biomassa não compromete a remoção curta por favorecer também as bactérias oxidantes de nitrito.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Instalações e procedimentos

Para esclarecer o experimento realizado neste trabalho de doutorado, segue-se a descrição do substrato utilizado e da montagem experimental, bem como das condições em que os ensaios foram realizados.

4.1.1 – Substrato

Em função do objetivo da pesquisa de promover a efetiva remoção de nitrogênio pela sucessão temporal das condições óxicas e anóxicas no mesmo reator, foram utilizados dois substratos, um para o período de aeração do reator, destinado a promover a oxidação do nitrogênio amoniacal, outro para o período de não aeração, destinado a promover a redução do nitrogênio oxidado nos períodos aerados.

Para a oxidação do N-amoniacal, foi utilizado substrato sintético composto basicamente por cloreto de amônio como fonte de nitrogênio e bicarbonato de sódio para tamponamento e fonte inorgânica de carbono (Tabela 4.1). Além disso, foram adicionados sais minerais e elementos-traço para crescimento de organismos nitrificantes, de acordo com Schmidt e Belzer (1984) (Tabela 4.2).

Tabela 4.1 – Composição do substrato.

Etapa	NH ₄ Cl (mg/l)	N-amoniacal estequiométrico (mg/l)	NaHCO ₃ (mg/l)	N-amoniacal medido (mg/L)
1	478	125	1485	126±2,9
2	955	250	2970	251 ± 7,1
3	1911	500	2970	499 ± 9,8
4	153	40	475	40 ± 1,4

O bicarbonato de sódio foi escolhido como fonte de alcalinidade por apresentar maior solubilidade que o CaCO_3 . A quantidade adicionada deveria suprir a alcalinidade estequiometricamente requerida para a nitrificação, 7,2 mg alcalinidade como CaCO_3 para cada mg de N-amoniaco oxidado (BARNES e BLISS, 1983). Porém, devido à necessidade de se manter o pH em valores adequados, essa quantidade foi diminuída na etapa 3.

Tabela 4.2 - Sais minerais e elementos-traço para crescimento de organismos nitrificantes

Constituinte químico	Concentração da solução estoque	Solução requerida para 1 Litro de meio	
		Oxidantes de N-amoniaco	Oxidantes de nitrito
Sais	g/100ml	ml	ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	10	-
KNO_2	0,85	-	1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,34	1	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4	1	5
Bromotymol blue	0,04	5	-
K_2HPO_4	3,48	-	4
KH_2PO_4	2,72	7,5	1
ferro quelante		1	1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,246		
EDTA dissodio	0,331		
elementos traço		1	1
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01		
MnCl_2	0,02		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0002		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002		

Fonte: Schmidt e Belzer (1984)

O substrato foi preparado diariamente e, quando o tempo de ciclo era menor que 24 horas, o substrato era armazenado em refrigerador para evitar degradação. No início do ciclo, para enchimento do reator, o substrato era bombeado passando por um trocador de calor.

Para o período de não aeração era adicionado etanol como fonte externa de carbono. A solução de água e etanol foi preparada diariamente e armazenada em refrigerador para evitar a degradação. O volume da solução de etanol adicionado foi de 500ml, que foi dividido pelo número de períodos anóxicos. Desta forma, em cada período foi adicionada

uma fração desse volume, com o intuito de evitar uma relação C/N desfavorável à nitrificação, bem como o crescimento excessivo de organismos heterotróficos no período aerado.

Para escolha da quantidade de carbono a ser adicionada, considerou-se a razão DQO/N de 4,5 para a nitrificação via nitrato e etanol como doador de elétrons (AESOY *et al.*, 1998). Porém, com grande expectativa na remoção de nitrogênio via nitrito, aplicou-se a esta razão a economia de 40% relatada por Turk e Mavinic, (1989). Deste modo, adotou-se razão DQO/N igual a 3.

Durante todas as etapas o volume da solução fonte de carbono foi o mesmo, de modo que, apenas a concentração de etanol era modificada em cada etapa para manter a mesma relação C/N igual a 3, sem aumentar o efeito de diluição do nitrogênio devido ao volume de solução de etanol.

4.1.2 - Descrição do reator

O reator utilizado foi adaptado do modelo proposto por Ratusznei *et al.* (2000) e modificado por Cubas *et al.* (2001). A Figura 4.1a mostra uma representação esquemática do reator construído em acrílico, com 20 cm de diâmetro, 27 cm comprimento e volume útil de 6 litros. No interior do cilindro de acrílico, foi fixado um cesto de aço inoxidável, que continha o meio suporte utilizado para imobilização da biomassa. A Figura 1b mostra uma representação esquemática do cesto, formado por dois cilindros concêntricos de aço inoxidável perfurado, com diâmetro externo de 20 cm e interno 4 cm.

A tampa do reator em acrílico apresentava diversas aberturas para saída de ar, além disso, esta tampa teve a função de base para fixação do agitador e das sondas de oxigênio dissolvido e de potencial redox.

A aeração foi promovida através de uma placa porosa alimentada por um compressor de ar. A placa circular, com 10 cm de diâmetro, foi fixada junto ao fundo do reator. Um agitador mecânico tipo hélice, além de promover à homogeneização do meio, permitia melhorar a transferência de massa entre a fase líquida e a biomassa.

Figura 4.1: Esquema do reator Batelada Sequencial com aeração intermitente (a) : (1) tanque de reação; (2) entrada fonte externa de carbono; (3) cesto aço inoxidável para conter biomassa imobilizada; (4) saída do efluente; (5) descarte de lodo; (6) difusores de ar; (7) entrada do afluente, (8) agitador mecânico, (b) Esquema do Cesto onde as biopartículas são acondicionadas. Desenho sem escala, medidas em cm

A aeração foi promovida através de uma placa porosa alimentada por um compressor de ar. A placa circular, com 10 cm de diâmetro, foi fixada junto ao fundo do reator. Um agitador mecânico tipo hélice, além de promover à homogeneização do meio, permitia melhorar a transferência de massa entre a fase líquida e a biomassa.

O período de operação do agitador mecânico, o período de aeração e não aeração, além da operação das bombas de enchimento, descarte do efluente, e adição de fonte de carbono, foram controlados por um software desenvolvido pela empresa T&S, de São Carlos, instalado em um micro computador.

O reator (Figura 4.2) foi mantido dentro de uma câmara com controle de temperatura programado para 30 °C. Os valores de temperatura, em cada uma das etapas, foram obtidos através da sonda imersa no reator e registrados no computador. Estes valores são apresentados juntamente com os resultados de cada etapa.

Figura 4.2: Montagem experimental

4.2 - Procedimento experimental

Apresenta-se uma descrição geral da operação do reator, relatando-se os procedimentos comuns a todas as etapas. Alguns parâmetros operacionais, como tempo de ciclo, tempo de aeração e concentração de oxigênio dissolvido (OD) foram alterados em algumas etapas. Portanto, serão descritos juntamente com apresentação dos resultados de cada etapa.

4.2.1 - Operação do Reator

O início do ciclo dava-se com o acionamento da bomba de enchimento e da entrada de ar. Após o tempo de enchimento, aproximadamente 10 minutos, a bomba era desligada e então era acionado o agitador e tinha início o primeiro período de aeração. Após esse período, a entrada de ar era interrompida e começava a contagem de tempo do período anóxico. Após 5 minutos de anoxia, a bomba de adição de fonte de carbono era ligada, sendo desligada após o volume necessário ter sido bombeado. Essa sequência de período de aeração seguido de período de não aeração se repetia até o final do ciclo, que se completava com a interrupção da agitação mecânica e acionamento da bomba de descarte. Assim que a bomba de descarte era desligada, iniciava-se um novo ciclo.

O esquema da Figura 4.3 representa, simplificada, o algoritmo utilizado para abertura e fechamento das válvulas empregadas para o controle das bombas, agitador e entrada de ar durante um ciclo.

Figura 4.3 – Representação esquemática do algoritmo que controlava as válvulas de controle do reator.

O esquema da Figura 4.3 pode ser descrito por:

Tempo 0: inicia-se o ciclo com os seguintes comandos:

- Liga-se a bomba de enchimento;
- Liga-se agitação
- Liga-se a aeração

Tempo 1: o reator está cheio, comando executado:

- Desliga-se a bomba enchimento

Os tempos DA, C, L A, compõem uma rotina para possibilitar a aeração intermitente, que se repete até o final do ciclo:

Tempo D A: fim do período aeróbio, comando executado:

- Desliga-se a aeração

Tempo C: após 5 minutos do final do período aeróbio, comando executado:

- Adição de fonte de carbono

Tempo L A: final do período anóxico, comando executado:

- Liga-se a aeração

Tempo 3: o reator prepara-se para terminar o ciclo, comandos executados:

- Desliga-se a agitação
- Liga-se a bomba de descarte

Tempo 4: final do ciclo, comando executado:

- Desliga-se a bomba de descarte

4.2.2 - Escolha do lodo de inóculo

Para escolher o lodo de inóculo, foram observados lodos de três sistemas de lodos ativados, dois industriais e um de esgoto doméstico (ETE Flores da cidade de Rio Claro, SP). Através de observações por microscopia ótica, foi possível verificar a diversidade morfológica aparente de organismos, bem como o aspecto geral dos flocos formados.

Além disso, foram realizados ensaios qualitativos para verificar a presença de organismos nitrificantes. Para isto, amostras dos lodos foram incubadas em meio específico para crescimento desses organismos, de acordo com Schmidt e Belzer (1984).

Todos os tubos apresentaram resultados positivos depois de apenas uma semana de crescimento. De posse desse resultado, escolheu-se o lodo da ETE de Flores, da cidade de Rio Claro que, nas observações microscópicas, apresentou maior variedade morfológica, melhor aspecto dos flocos e menor número de bactérias filamentosas.

4.2.3 - Imobilização da biomassa

O lodo foi imobilizado em partículas cúbicas de espuma de poliuretano de modo semelhante ao proposto por Zaiat *et al.* (1994). Para promover a imobilização, as partículas de espuma foram colocadas em um recipiente e imersas no lodo de inóculo. Então, foram misturados de maneira uniforme, permanecendo sob aeração por 2 horas.

Decorrido o período de contato, as matrizes com as células aderidas foram peneiradas para que o lodo excedente fosse eliminado e, em seguida, foram colocadas no cesto de inox do reator.

4.2.4 - Ensaio para verificar a velocidade de desnitrificação via nitrito e via nitrato

Para esse ensaio, o cesto com os cubos de espuma foi retirado do reator no final de seu ciclo, durante operação com N-afluente de 125 mg/L, de modo que, com o revolvimento das matrizes, houve desprendimento de biomassa que se depositou no fundo do recipiente e foi utilizada como inóculo nos três reatores no ensaio de desnitrificação.

As células microbianas foram incubadas em meio basal com macro e micronutrientes (SCHMIDT e BELZER, 1984).e, seletivamente, com nitrato e nitrito, de acordo com a proposta do ensaio (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Composição do substrato dos sistemas estudados

Reatores	N-nitrato (mg/l)	N-nitrito (mg/l)	etanol (mg/l)
R1	30	-	64
R2	-	30	64

Utilizou-se o etanol como fonte de carbono em ambos os reatores. Como aceptores terminais de elétrons, utilizou-se nitrato em R1 e nitrito em R2.

O estudo cinético do processo de desnitrificação foi realizado com a quantificação de N_2O , que é um dos produtos intermediários da atividade de microrganismos desnitrificantes, usando-se acetileno como bloqueador da redução enzimática de N_2O para N_2 (YOSHINARI e KNOWLES, 1976).

Como esse estudo foi realizado em batelada, as amostras foram mantidas em reatores de 400 mL, contendo 300 mL de material reativo (substrato, macro e micro nutrientes) e 100 mL de volume para gás. Os frascos foram vedados com rolha de borracha, e, a seguir, 20% da fase gasosa foi substituída por acetileno, à pressão parcial de 10kPa e manipulados à temperatura de $\pm 30^{\circ}C$.

A concentração acumulada de N_2O nos frascos foi quantificada por cromatografia a gás, utilizando-se cromatógrafo Gow Mac (série 150), equipado com detector de condutividade térmica e coluna Porapak Q (80-100 mesh), com 2 m de comprimento e $\frac{1}{4}$ " de diâmetro interno; e temperatura constante do forno $30^{\circ}C$, acoplado a integrador processador Hp 3396 e hidrogênio (60 mL/min) como gás de arraste. Volumes de 1 mL do biogás retirado da fase gasosa dos reatores foram injetados através de seringa tipo “gas-tight” “Hamilton”. As concentrações acumuladas de N_2O nos reatores foram calculadas a partir da equação proposta por Tiedje (1982). Os resultados experimentais foram ajustados de acordo com uma função polinomial e as velocidades máximas da produção de N_2O foram calculadas por regressão linear dos pontos da fase exponencial. Com estes valores e a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV), foram calculadas as velocidades máximas específicas para cada situação em estudo.

No final do ensaio, foram determinadas as concentrações de nitrito e nitrato para cálculo da eficiência de remoção do nitrogênio. Essas variáveis foram analisadas segundo os procedimentos descritos por APHA (1998).

4.2.5 - Ensaio para verificar a possibilidade da rota alternativa de desnitrificação usando amônio como doador de elétrons

A biomassa utilizada neste ensaio foi retirada durante a primeira etapa de operação do reator, com N- amoniacal afluente de 125 mg/L. O cesto com os cubos de espuma foi retirado do reator no final de seu ciclo, de modo que, revolvendo-se as matrizes, houve desprendimento de biomassa, que se depositou no fundo do recipiente, e foi utilizada como inóculo nos quatro reatores desse ensaio.

As células microbianas foram incubadas em meio basal com macro e micronutrientes (SCHMIDT e BELZER, 1984). Para se avaliar o potencial dos microrganismos desnitrificantes, foram montados quatro reatores (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Composição do substrato dos sistemas estudados

Reatores	Volume de lodo (ml)	N-nitrito (mg.l ⁻¹)	N-amoniacal (mg.l ⁻¹)	etanol (mg.l ⁻¹)	Acetileno
R1	100	13,61-	-	64	sim
R2	100	14,73	30	-	não
R3	100	13,63	30	-	sim
R4	100	12,65		-	sim

Como esse estudo foi realizado em batelada, as amostras foram mantidas em reatores de 500 ml, contendo 400 ml de material reativo (substrato, macro e micro nutrientes) e 100 ml de volume para gás. Os frascos foram vedados com rolha de borracha e, nos reatores R1, R3 e R4, 20% de fase gasosa foi substituído por acetileno, à pressão parcial de 10kPa. Os frascos foram manipulados à temperatura de, aproximadamente, 30°C.

O reator R1, diferentemente dos demais reatores, recebeu adição de etanol como fonte de carbono para se verificar a ocorrência de desnitrificação na presença de doador de elétrons e fonte de carbono.

Os reatores R2 e R3 receberam adição de N-amoniacoal e se diferenciam apenas pela adição de acetileno. O reator R2 não recebeu acetileno, para evitar possível inibição de bactérias nitrificantes que, segundo Bock *et al.* (1995), podem apresentar atividade desnitrificante e, durante a nitrificação, podem ser inibidas por esse composto.

O reator R4 foi utilizado como controle. Desse modo, seus resultados podem ser comparados com os dos reatores que não receberam fonte de carbono, mas receberam N-amoniacoal como doador de elétrons.

O estudo cinético do processo de desnitrificação foi realizado com a quantificação de N_2O , que é produto da atividade de microrganismos desnitrificantes, usando-se acetileno como bloqueador da redução enzimática de N_2O para N_2 (YOSHINARI e KNOWLES, 1976). Porém, diante da possibilidade de uma rota alternativa de desnitrificação, a partir de N-amoniacoal e nitrito, que não tenha o N_2O como produto intermediário, foram também medidas as concentrações de nitrito.

A concentração acumulada de N_2O nos frascos foi quantificada por cromatografia a gás, utilizando-se cromatógrafo Gow Mac (série 150), equipado com detector de condutividade térmica e coluna Porapak Q (80-100 mesh), com 2 m de comprimento e $\frac{1}{4}$ " de diâmetro interno. O forno foi operado à temperatura constante de $30^{\circ}C$. Utilizou-se um integrador processador HP3396 acoplado ao cromatógrafo e hidrogênio (60 mL/min) como gás de arraste. Volumes de 1 mL do biogás retirados da fase gasosa dos reatores foram injetados através de seringa tipo “gas-tight” “Hamilton”. As concentrações acumuladas de N_2O nos reatores foram calculadas a partir da equação proposta por Tiedje (1982).

Amostras líquidas foram tiradas dos reatores, ao longo do ensaio, para determinação das concentrações de nitrito, nitrato e N-amoniacoal. Essas variáveis foram analisadas segundo os procedimentos descritos por APHA (1998).

4.3 - Métodos analíticos

Segue-se a apresentação dos métodos analíticos que possibilitaram analisar as amostras coletadas durante o experimento.

4.3.1 – Análises físico-químicas

As análises para determinação de Sólidos Totais (ST), Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos fixos e voláteis foram realizadas segundo os procedimentos descritos por American Public Health Association (APHA) (1998), sendo; Sólidos Totais pelo método 2540 B, Sólidos Suspensos Totais pelo método 2540 D e para Sólidos fixos e voláteis o método utilizado foi o 2540E.

Para quantificar a concentração de N-amoniaco, a amostra foi destilada pelo método 4500-NH₃ B e então titulada pelo método 4500-NH₃ C. Para medir a concentração de nitrito e nitrato foi utilizado o equipamento para FIA (análise por injeção de fluxo) e o método proposto 4500 NO₃⁻ I, ambos descritos por American Public Health Association (APHA) (1998).

4.3.2 – Estimativa de Sólidos Aderidos

No final de cada etapa, foram retiradas amostras para estimar quantitativamente os Sólidos Voláteis aderidos. Foram retirados aleatoriamente 12 cubos de espuma para compor as amostras, que eram colocados em frasco com pérolas de vidro com pequeno volume de água destilada e agitados para promover o desprendimento da biomassa. A água desta lavagem era colocada em um balão volumétrico com capacidade de 100 ml e, após nove sucessivas lavagens, completava-se o volume do balão com água destilada.

Com a água de lavagem das espumas, realizou-se a análise de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Sólidos Voláteis Totais (SVT), de acordo com procedimentos descritos por APHA (1998).

Os cubos de espumas lavados foram mantidos em estufa e retirados para pesagem após 48 horas. A partir dos resultados de SVT e do peso dos cubos de espuma foram estimadas as concentrações de SVA no reator (equações 4.1 a 4.2).

$$SVT = \frac{\text{massa de sólidos}}{\text{volume da amostra}} \quad (4.1)$$

$$SVA = SVT * \frac{Va}{m} * \frac{Ne}{Na} * \frac{m}{V} \quad (4.2)$$

Sendo:

SVT: Sólidos Voláteis Totais

Va: Volume água de lavagem da espuma

m: Massa amostra de espuma

Ne: Número de espumas do reator

Na: número espumas da amostra

V: Volume do reator

$$SVA = SVT * \frac{\text{volume da água de lavagem}}{\text{massa de espuma da amostra}} * \frac{\text{número de espuma do reator}}{\text{número de espuma da amostra}} * \frac{\text{massa de espuma da amostra}}{\text{volume do reator}}$$

A concentração de ácidos voláteis totais foi determinada de acordo com metodologia descrita por Dilallo e Albertson (1961) e a alcalinidade como CaCO₃ pela metodologia descrita por Ripley *et al.* (1986).

A concentração de amônia livre foi estimada em função da concentração de N-amoniacal, pH e temperatura, pela aplicação da equação (4.7), apresentada por Anthonisen *et al.* (1976).

$$NH_3(mg/L) = \frac{17}{14} * \frac{N - amoniacal * 10^{pH}}{e^{\left(6,344/(273+t^{oC})\right)} + 10^{pH}} \quad (4.7)$$

Considere:

NH₃ = concentração de N como NH₃

t = temperatura

A concentração de ácido nitroso foi calculada em função da concentração de nitrito, da temperatura e do valor de pH, de acordo com Anthonisen *et al.* (1976), pela aplicação da equação (4.8).

$$HNO_2 (mg / L) = \frac{46}{14} * \frac{N - nitrito}{e^{\left(-2.300 / (273 + t^{oC}) \right)} * 10^{pH}} \quad (4.8)$$

Sendo:

HNO_2 = concentração de N como HNO_2

t = temperatura

4.3.3 – Estratégia de operação para manutenção da concentração de Oxigênio dissolvido na faixa desejada

Para leitura da concentração de OD, utilizou-se um equipamento ORION modelo 1401. O equipamento enviava a leitura para um computador a cada 10 segundos e, com a utilização de um software desenvolvido pela empresa T&S São Carlos, estipulava-se o valor mínimo e máximo desejado para a concentração de OD. Deste modo, ao reconhecer valores inferiores ou superiores ao intervalo selecionado como ideal de trabalho, a entrada de ar era liberada ou interrompida.

A sonda utilizada para medir a concentração de oxigênio dissolvido foi colocada na parte superior do reator, mergulhada no meio líquido, entre a superfície livre e o cesto, porém, sem tocar o cesto. A localização da sonda foi escolhida para facilitar a operação, pois freqüentemente era necessário retirá-la para limpeza e manutenção. Além disso, como estava submetida a baixas concentrações, era necessário calibrá-la freqüentemente no ponto zero, com solução de sulfito de sódio, para manter a precisão da medida.

Devido à localização da sonda, as concentrações lidas não representam a concentração no interior das espumas contidas no cesto. Porém, pela geometria do reator, qualquer outra disposição também não garantiria a aquisição precisa da concentração de oxigênio dissolvido no reator como um todo.

4.4 – Exames microbiológicos

Os exames microbiológicos foram realizados pela pesquisadora Eloisa Pozzi, técnica do Laboratório de Processos Biológicos, do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, USP. Os ensaios de Biologia Molecular contaram com a colaboração do pesquisador Fabio Alexandre Chinalia.

Foram realizados: Estimativa do Número Mais Provável de organismos nitrificantes e desnitrificantes; isolamento de cepas desnitrificantes para posterior identificação desses organismos no final do período de operação com N-amoniaco afluente de 125 e 250 mg/L; extração e amplificação de DNA pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction); Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA) das cepas isoladas; clonagem e seqüenciamento das cepas isoladas de desnitrificantes e também de uma amostra do DNA total da condição de 250 mg/L de N- amoniacal.

4.4.1 - Análise para estimativa de Número Mais Provável (NMP) de organismos nitrificantes e desnitrificantes

As análises de NMP dos organismos oxidantes de amônia e de nitrito foram realizadas com a intenção de se verificar a ocorrência e magnitude destas populações diante da remoção via nitrito e compará-las nas condições operacionais estudadas.

A análise foi realizada no final de cada etapa do experimento, antes de se alterar a concentração de N-amoniaco afluente. Assim, as amostras foram retiradas ao final da operação com N-afluente de 125 mg N /L, 250 mg N /L, 500 mg N /L e 40 mg N /L. As amostras utilizadas nesta análise foram retiradas das amostras utilizadas para determinação de sólidos.

Para estimativa da microbiota nitrificante presente no reator, foi utilizado, como meio de cultura para as diluições decimais seriadas das bactérias presentes no lodo, o meio descrito por Schmidt e Belzer (1984), o qual foi adaptado para amostras líquidas.

Para a estimativa das bactérias desnitrificantes do RSB, foi utilizado como meio de cultura o mesmo substrato sintético basal descrito por Schmidt e Belzer (1984). Nitrato e

nitrito foram adicionados como aceptores terminais de elétrons e o etanol como fonte de carbono para a desnitrificação. O método empregado é o descrito por Focht e Joseph (1973) e modificado Tiedje (1982). Esta metodologia foi adaptada, nesse trabalho, para as amostras de lodo imobilizado nas espumas.

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

4.4.2 - Isolamento de cepas desnitrificantes nas amostras retiradas do reator durante operação com N-afluente de 125 e 250 mgN/L

A partir do resultado positivo das maiores diluições decimais seriadas, foi realizado o isolamento de cepas desnitrificantes. A confirmação do crescimento de cepas desnitrificantes purificadas via nitrito tornou-se evidente pelo consumo de nitrito, verificado pela reação qualitativa após adição da sulfanilamida e n-naftil. Já a confirmação do crescimento de cepas desnitrificantes purificadas via nitrato foi confirmada pelo consumo de nitrato, determinado pela reação qualitativa após a adição de difenilamina em ácido sulfúrico.

Após a confirmação da purificação das cepas desnitrificantes, as células foram visualizadas por meio de microscopia óptica comum e contraste de fase. O exame microscópico óptico das cepas isoladas foi realizado em microscópio “Leica”, acoplado à câmera com captura de imagem e software Image-Pro Plus. Posteriormente, essas cepas foram submetidas à extração e ampliação de DNA ribossomal 16S (PCR), digestão com enzimas de restrição para “análise de restrição do DNA ribossômico amplificado” (ARDRA), clonagem e sequenciamento.

4.4.3 - Extração e amplificação de DNAr pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) para as cepas isoladas de bactérias desnitrificantes nas amostras retiradas do reator durante operação com N-afluente de 125 e 250 mgN/L

A extração de DNA foi realizada através do método direto utilizando “glass beads” e mistura de fenol: clorofórmio:tampão (1:1:1 v/v) seguindo o procedimento descrito por Griffiths *et al.* (2000). Segmentos de DNA de aproximadamente 600 pares de bases (pb) do ribossomo 16 S foram amplificados em reações de PCR utilizando “eubacterial primers” 27F (5’ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3’) e 1522 R (5’ AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3’), seguindo metodologia descrita por Etchebehere *et al.* (2001).

4.4.4 - Análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA) para as cepas isoladas de bactérias desnitrificantes nas amostras retiradas do reator durante operação com N-afluente de 125 e 250 mgN/L

A técnica de ARDRA, descrita por Etchebehere *et al.* (2001), consistiu das seguintes etapas: 1) extração do DNA das culturas puras das cepas desnitrificantes isoladas do reator; 2) ampliação da região 16S do DNAr (PCR); 3) tratamento do produto do PCR com enzimas de restrição (endonucleases *Hha I* e *Hae III*); 4) comparação dos perfis de ARDRA das respectivas cepas isoladas para posterior clonagem e seqüenciamento.

4.4.5 - Clonagem e seqüenciamento das cepas isoladas de desnitrificantes nas condições operacionais de N-afluente de 125 e 250 mgN/L.

As amostras dos produtos de PCR (DNAr 16S de aproximadamente 600 pb) foram clonadas em plasmídeo pCR 2.1 TOPO-TA “easy vector system-Invitrogen”. Células competentes de *E. Coli* DH α 5 foram transformadas com o plasmídeo seguindo metodologia descrita pelo fabricante. Os clones foram selecionados ao acaso e a verificação da presença dos incertos realizada através de digestão com endo-nuclease *HhaI*. Foram seqüenciados entre 5 a 10 clones de cada cepa de bactéria desnitrificante isolada do reator.

O sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado em sequenciador ABI 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Foram utilizados “primers” M13 *forward* e *reverse*, respectivamente. As seqüências obtidas foram agregadas e alinhadas usando DNASTAR-Package Software (Lasergene Sequence Analysis). Depois do alinhamento e averiguação da presença de quimeras, as seqüências de nucleotídeo foram comparadas às seqüências do banco de dados eletrônico NCBI-database para a aproximação da identidade filogenética.

4.4.6 - Extração e amplificação de DNAr pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) da amostra de DNA total da biomassa microbiana na condição operacional de N-afluente de 250 mg N/L

A extração de DNA foi realizada através do método direto utilizando-se “glass beads” e mistura de fenol: clorofórmio:tampão (1:1:1 v/v) seguindo o procedimento descrito por Griffiths *et al.* (2000). Segmentos de DNA de aproximadamente 600 pares de bases (pb) do ribossomo 16 S foram amplificados em reações de PCR utilizando “eubacterial primers” 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 907r (5' -CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'), seguindo metodologia descrita por So e Young (1999).

4.4.7 - Clonagem e sequenciamento da amostra contendo o DNA total da biomassa microbiana na condição operacional de N-afluente de 250 mgN/L

As amostras dos produtos de PCR (DNAr 16S de aproximadamente 600 pb) foram clonadas em plasmídeo pCR 2.1 TOPO-TA “easy vector system-Invitrogen”. Células competentes de *E. Coli* DH α 5 foram transformadas com o plasmídeo seguindo metodologia descrita pelo fabricante. Os clones foram selecionados ao acaso e a verificação da presença dos incertos realizada através de digestão com endo-nuclease HhaI. Foram clonadas 142 colônias das quais 60 clones foram sequenciados. O sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado em sequenciador ABI 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Foram utilizados “primers” M13 *forward* e *reverse*, respectivamente. As seqüências obtidas foram agregadas e alinhadas usando DNASTAR-package Software (Lasergene Sequence

Analysis). Depois do alinhamento e averiguação da presença de quimeras, as seqüências de nucleotídeo foram comparadas às seqüências do banco de dados eletrônico NCBI-database para a aproximação da identidade filogenética.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados em cada etapa são apresentados de acordo com a similaridade operacional. Deste modo, são inicialmente apresentados os resultados encontrados durante a operação com N-amoniaco afluente de 125 e 250mg/L.

5.1 - Resultados e discussão das Etapas 1 e 2

Apresentam-se, a seguir, os resultados referentes ao período de operação no qual a concentração afluente de nitrogênio amoniacal foi de 125 mg/L (etapa 1) e, N-afluente de 250mg/L (etapa 2).

5.1.1 - Concentração de oxigênio dissolvido (OD)

Tanto para a etapa 1, quanto para a etapa 2, a concentração de OD nos períodos aerados foi mantida entre 2,0 e 2,5 mg O₂ /L. Observou-se que o sistema de controle de entrada de ar adotado foi eficiente ao manter a concentração de oxigênio dissolvido dentro da faixa esperada.

Os valores da concentração de oxigênio dissolvido registrados ao longo de um ciclo de 24 horas compõem a Figura 5.1, sendo que a Figura 5.1a refere-se a etapa 1, com concentração de N-amoniaco afluente de 125mgN/L e, Figura 5.1b refere-se a etapa 2 com concentração afluente de N-amoniaco de 250mgN/L.

Figura 5.1 – Perfil temporal da concentração de OD nos reatores
a - N-afluente 125 mg/L, b - N-afluente 250 mg/L

Devido à atividade dos organismos, os valores da concentração de OD caíam rapidamente quando a aeração era interrompida. Em consequência, o ambiente tornava-se mais favorável ao processo de desnitrificação, que efetivava a remoção do nitrogênio oxidado no período aeróbio, fato que se repetia como etapas sucessivas até o final do ciclo.

5.1.2 - Remoção de nitrogênio

A eficiência do reator foi calculada considerando-se as formas de nitrogênio: nitrito, nitrato e amoniacal, no afluente e no efluente do reator. Na Figura 5.2, estão expostos gráficos com os valores de eficiência de remoção de nitrogênio ao longo do período de operação do reator, submetido à concentração de nitrogênio amoniacal afluente de 125mg/L e 250mg/L.

Figura 5.2 – Eficiência de remoção de nitrogênio
a – Nitrogênio afluente 125 mg/L; b – Nitrogênio afluente 250 mg/L

Em ambos os experimentos, observou-se eficiência de remoção de nitrogênio acima de 90%, após apenas 20 dias de operação. Além disso, observou-se que, ao longo do tempo, não foi possível detectar, no efluente do reator, nenhuma das formas de nitrogênio monitoradas.

Além da concentração de nitrogênio amoniacal (N-amoniacal) no efluente encontrar-se abaixo do limite de detecção, pelo método adotado, também não foram detectadas as formas oxidadas nitrito e nitrato, indicando que o reator foi operado em condições tais que proporcionaram um bom desempenho não só na nitrificação, como também na desnitrificação, tanto para concentração afluente de 125 mg/L como para 250 mg N/L.

Embora não tenha sido detectada nenhuma das formas de nitrogênio no efluente do reator, as análises realizadas em períodos intermediários do ciclo permitiram observar que o nitrogênio era removido antes do final do ciclo, sendo que o tempo necessário para sua remoção diminuía gradualmente.

Foram realizados perfis das concentrações ao longo do tempo para confirmar o tempo necessário para remoção do nitrogênio. O perfil foi repetido em dois meses consecutivos, até que não apresentassem alterações significativas nos valores das concentrações das formas monitoradas de nitrogênio. A Figura 5.3 mostra o perfil das concentrações de nitrogênio como nitrito, nitrato, N-amoniacal e N- inorgânico.

Figura 5.3 – Perfil temporal das concentrações de N-inorgânico (*), N-amoniacal (Δ), nitrito ($\blacktriangle$) e nitrato ($\blacksquare$) durante as etapas 1 e 2.
a – Nitrogênio afluente 125 mg/L; b - Nitrogênio afluente 250 mg/L

Pelas concentrações apresentadas, observa-se que o tempo de ciclo escolhido foi excessivo, para a concentração inicial de 125 mg/L. Praticamente todo nitrogênio inorgânico foi removido nas primeiras quinze horas, enquanto que, para a concentração inicial de 250 mg/L, não se detectou nenhuma das formas de nitrogênio monitoradas após 19 horas de ciclo.

5.1.3 - Concentração de nitrito e nitrato

Considerando-se NO_t a soma das formas oxidadas de nitrogênio, nitrito e nitrato, observou-se, durante o período de operação do reator, que a razão $\text{NO}_2^-/\text{NO}_t$ aumentou gradualmente e, no final do período de operação, o nitrito passou a predominar como a forma de nitrogênio oxidada, conforme pode ser observado na Figura 5.4.

Figura 5.4 – Razão $\text{NO}_2^-/\text{NO}_t$ durante as etapas 1 e 2
a - Nitrogênio afluente 125 mg/L; b - Nitrogênio afluente 250 mg/L

Alguns autores alertam que, quando a concentração de amônia livre é o fator responsável pela remoção curta, o acúmulo de nitrito pode não ser permanente, devido à adaptação dos organismos (TURK e MAVINIC, 1989; ÇEÇEN, 1996). Neste estudo, somando-se os períodos de operação com N-amoniaco afluente de 125 mg/L e 250 mg/L, o reator foi operado durante mais de 12 meses e, durante todo este período, foi possível manter o acúmulo de nitrito e baixas concentrações de nitrato em todos os períodos aerados.

No final do período de operação, foi realizado o perfil das concentrações de nitrito e nitrato e N-amoniacal durante o ciclo. A Figura 5.5 evidencia, além do aumento e diminuição dos valores da concentração de nitrito, sua predominância como forma oxidada de nitrogênio.

Figura 5.5 – Perfil temporal das concentrações de nitrito (▲) e nitrato (■).
a - Nitrogênio afluente 125 mg/L; b - Nitrogênio afluente 250 mg/L

Logo que a aeração era interrompida, iniciava-se a desnitrificação, medida indiretamente pela concentração de nitrito, indicando que a operação do reator com aeração intermitente e baixas concentrações de oxigênio dissolvido não comprometeu a desnitrificação. Além disso, assim que se reiniciava a aeração, a concentração de nitrito começava a aumentar, indicando que o período anóxico não havia afetado negativamente a atividade das bactérias oxidantes de N-amoniacal.

A soma das quantidades de nitrogênio como nitrito e nitrato, formados ao longo do ciclo, não se iguala ao nitrogênio afluente, além da quantidade utilizada na síntese celular, este resultado pode indicar a ocorrência de nitrificação e desnitrificação simultâneas, possibilitada pelos baixos valores das concentrações de oxigênio dissolvido.

Outra hipótese para o não fechamento do balanço de massa de nitrogênio é a indesejável formação de óxido nitroso, forma de nitrogênio não monitorada e potencial causadora do efeito estufa. Segundo estudos de Itokawa *et al.* (2001) desenvolvidos com uso de um reator com aeração intermitente, na presença de nitrito, a desnitrificação endógena causada pela baixa razão DQO/N favoreceu a emissão de N_2O . Além disso, durante a fase aerada pequena quantidade deste óxido foi produzida.

A baixa concentração de oxigênio mantida no reator para favorecer a remoção via nitrito também pode ter favorecido a emissão de óxido nitroso. Segundo Okayasu *et al.* (1997), a emissão de N_2O durante a nitrificação é fortemente dependente da concentração de OD no reator. Quando a concentração de oxigênio é suficiente para a nitrificação, a emissão deste óxido é desprezível, porém, com baixas concentrações de OD, ocorre grande conversão para N_2O .

Além disso, todo o nitrogênio foi removido antes que fosse adicionada toda a fonte de carbono calculada como necessária, o que pode indicar que certa fração das formas oxidadas de nitrogênio é reduzida a nitrogênio gasoso através da utilização de doadores de elétrons endógenos ou, até mesmo o NH_4^+ .

5.1.4 – Estratégia de operação com aeração intermitente

A sucessão de períodos aerados e não aerados, embora possibilite a remoção de nitrogênio em um único reator, exige monitoramento das concentrações de nitrito e dos valores de pH, para que a concentração de ácido nitroso não atinja valores capazes de afetar negativamente o processo biológico de oxidação do N-amoniacal.

O pH é um fator diretamente relacionado ao período de aeração, pois o processo de nitrificação requer alcalinidade e, deste modo, altas concentrações de nitrogênio amoniacal podem levar à diminuição significativa do valor de pH na etapa da nitrificação. Observa-se que a variação dos valores de pH foi muito pequena, tanto para a concentração de N-amoniacal afluyente de 125 mg/L, como para N-afluyente de 250 mg/L (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Perfil temporal dos valores de pH medidos durante o ciclo de 24 horas
a – Nitrogênio afluyente 125 mg/L; b - Nitrogênio afluyente 250 mg/L

Esta distribuição razoavelmente uniforme dos valores de pH ocorreu de acordo com o esperado, pois, a alcalinidade utilizada na preparação do substrato foi sua quantidade estequiométrica requerida para nitrificar todo o nitrogênio amoniacal afluente. Como a oxidação deste composto ocorreu em pequenas frações no período aeróbio, a desnitrificação ocorrida em cada período anóxico devolvia parte da alcalinidade consumida.

A aeração intermitente também se reflete nos valores de potencial redox e, no final do período de operação a 125mg N /L e a 250mg N /L, foram realizados perfis do potencial redox ao longo do ciclo, conforme apresentado na Figura 5.9.

Figura 5.9 – Perfil temporal dos valores de potencial redox
a – Nitrogênio afluente 125 mg/L; **b** - Nitrogênio afluente 250 mg/L

Antes de analisar os valores de potencial redox convém observar que estes são valores relativos. Não se discute mais a necessidade de se obterem valores absolutos de potencial redox. O motivo, segundo Peddie *et al.* (1990), é que o potencial redox pode ser definido como a medida da atividade dos elétrons envolvidos em reações de oxidação e redução, ocorridas em meio aquoso. Esses valores dependem da especificidade do meio, pois a atividade é influenciada por fatores como os constituintes químicos do sistema, variedade da atividade biológica, pH e temperatura e, além disso, os autores alertam sobre o cuidado com interferência de outros equipamentos presentes no sistema sobre o equipamento de medida de potencial redox. A curva de potencial redox, em alguns casos, pode ser utilizada para determinar ou controlar os períodos de aeração e não aeração, por apresentar pontos de inflexão característicos, associados ao fim do período anóxico e início do anaeróbio, como relatado por vários autores pelo consumo total de nitrato (WAREHAM *et al.*, 1993; HAO e HUANG, 1996; SASAKI *et al.*, 1996).

Valores do potencial redox e das concentrações de nitrito de um período de não aeração são apresentados na Figura 5.10. Os valores de potencial redox não evidenciaram pontos de inflexão característicos de início de fermentação. Isto pode ter ocorrido devido às condições operacionais não possibilitarem a desnitrificação de todo o nitrito durante o período de não aeração.

Figura 5.10 – Valores de Potencial redox (°) e da concentração de nitrito (Δ) durante período de não aeração com N-afluente 125mg/L

A intenção, durante a escolha do tempo de aeração, era a de ter períodos em que o ambiente fosse aeróbio para nitrificar e períodos anóxicos para promover a desnitrificação. Portanto, as condições operacionais foram adequadas para evitar a anaerobiose e, com isto, aproveitar melhor o tempo de ciclo para a remoção de nitrogênio, tanto para concentração afluente de nitrogênio amoniacal de 125 mg N/L quanto para 250mg N/L.

5.1.5 - Velocidade de consumo de oxigênio

A atividade dos organismos aeróbios foi mensurada indiretamente, através do cálculo da velocidade de consumo de oxigênio. Para isso, a medição de OD foi realizada no próprio reator, com a intenção de se reproduzir o que realmente acontecia durante a operação.

Quando a concentração lida de OD era a concentração máxima de operação (2,5 mg/L), a entrada de ar era interrompida e os valores de OD anotados a cada 10 segundos.

O ensaio foi realizado em triplicata e os valores da concentração de OD obtidos, ao longo do tempo, estão representados na Figura 5.11.

Figura 5.11 – Concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo
a – Nitrogênio afluente 125mg/l; **b** – Nitrogênio afluente 250mg/L

A velocidade de consumo de oxigênio foi considerada numericamente igual ao coeficiente angular da curva formada pela regressão linear dos valores lidos nos primeiros seis minutos. Para a operação do reator com nitrogênio afluente de 125 mg N-NH₄/L, a velocidade de consumo de oxigênio pelo volume do reator foi de 0,05 mg O₂/min * L. Para a concentração afluente de 250 mg N-NH₄⁺/L foi de 0,06 mg O₂/min * L. (Figura 5.12).

Figura 5.12 – Regressão linear da curva de concentração de OD ao longo do tempo
a – Nitrogênio afluente 125mg/L; **b** – Nitrogênio afluente 250mg/L

5.1.6 – Velocidade de desnitrificação via nitrito e via nitrato

Na Figura 5.13, R1 e R2 mostram respectivamente as produções acumuladas de N₂O utilizando-se nitrito e nitrato como aceptores terminais de elétrons e etanol como

doador de elétrons, é importante lembrar que estes ensaios não foram realizados no reator de estudo, mas em sistemas montados exclusivamente para o ensaio de desnitrificação.

Figura 5.13 – Produção acumulada de N_2O ao longo do tempo nos reatores R1 e R2.

Observa-se que a velocidade de desnitrificação no reator alimentado com nitrito foi de 0,43 g N/g SSV.d, cerca de 2,4 vezes maior que a do reator alimentado com nitrato, que foi de 0,18 g N/g SSV.d. Estudos têm demonstrado que a velocidade do processo de desnitrificação via nitrito é cerca de 63% superior à desnitrificação via nitrato segundo relato de Turk e Mavinic (1989). Estudos de Abeling e Seyfried (1992) relatam velocidade duas vezes maior na desnitrificação via nitrito.

A Tabela 5.1 mostra as concentrações de nitrito, nitrato e a eficiência de remoção nos reatores estudados.

Tabela 5.1 - Concentrações de Nitrito e Nitrato e Eficiência de remoção nos reatores

Reator	Entrada		Saída		Eficiência de remoção (%)
	NO ₂ (mg/L)	NO ₃ (mg/L)	NO ₂ (mg/L)	NO ₃ (mg/L)	
R 1	ND	30	ND	6,7	78
R 2	30	ND	ND	ND	100

ND: não detectado

Embora a relação C/N tenha sido a mesma para os reatores R1 e R2, ocorreu maior eficiência de remoção de nitrogênio no reator contendo inicialmente apenas nitrito. No R2, como a desnitrificação parte do nitrito, não ocorre a etapa de redução do nitrato a nitrito, conseqüentemente há uma economia no consumo da fonte de carbono de modo que, toda

fonte de carbono foi disponibilizada para a conversão de nitrito a N_2O , o que pode também ter influenciado positivamente na velocidade do processo.

A maior velocidade específica de desnitrificação foi observada no reator onde ocorreu a desnitrificação curta (via nitrito), indicando economia no tempo de reação. Em um projeto, o menor tempo de reação pode significar redução de volume em reatores contínuos ou menor tempo de ciclo em reatores em batelada.

5.1.7 – Verificação do potencial de desnitrificação com N-amoniacal como doador auxiliar de elétrons

O objetivo deste ensaio foi verificar a possibilidade de influência de N-amoniacal na capacidade de desnitrificação da biomassa presente no reator. Para sua realização, a biomassa foi retirada do reator durante operação com N-amoniacal afluente de 125 mg/L.

As células microbianas foram incubadas em reatores de 500 ml como descrito na Capítulo 4, Tabela 4.2. A Figura 5.14 mostra, em gráfico, os valores da produção acumulada de N_2O . Observa-se que a formação acumulada de N_2O foi semelhante para os três reatores. Deste modo, o potencial de desnitrificação a partir de N-amoniacal não ficou evidenciado.

Figura 5.14 – Número de mols de N_2O ao longo do tempo nos reatores R2, R3 e R4.

Diante da possibilidade de uma rota alternativa que poderia não apresentar N_2O como produto intermediário, foram medidas as concentrações de nitrito. Os valores da

Tabela 5.2 foram calculados a partir das concentrações de nitrito medidas nas amostras retiradas do reator durante o ensaio. A conversão para número de mols, a partir da concentração de nitrito, teve a intenção de comparar a quantidade de substrato consumido e do produto formado.

Caso a rota alternativa não tivesse o N_2O como produto intermediário, a maior atividade desnitrificante poderia ser notada pela diferença no número de mols de nitrito. Neste caso, o reator poderia apresentar a mesma produção acumulada de N_2O e o nitrito poderia ser convertido diretamente para N_2 forma que não foi mensurada.

Tabela 5.2 – Número de mols de nitrito nos reatores R2, R3 e R4

tempo (h)	N- nitrito (N mols)			
	R1	R2	R3	R4
0,0	3,9E-04	4,2E-04	3,9E-04	3,6E-04
0,1	2,4E-04	3,5E-04	3,8E-04	3,6E-04
0,3	2,2E-04	3,3E-04	3,5E-04	3,4E-04
0,8	5,5E-05	3,2E-04	3,2E-04	3,0E-04
1,2	ND	3,1E-04	2,9E-04	3,0E-04
1,8	ND	2,9E-04	2,8E-04	2,8E-04
2,3	ND	2,6E-04	2,8E-04	2,4E-04
3,5	ND	2,1E-04	2,0E-04	1,9E-04

Na Figura 5.15, construída a partir dos valores mostrados na Tabela 5.2, observa-se grande semelhança na atividade desnitrificante dos reatores R2, R3 e R4. Não há evidência de diferença entre o reator que recebeu adição de N-amoniaco e os demais. Aparentemente, este composto não influenciou, quer positiva, quer negativamente, a atividade dos organismos desnitrificantes.

Figura 5.15 – Número de mols de NO_2^- ao longo do tempo nos reatores R2, R3 e R4

Salienta-se que, para evitar que houvesse N-amoniacal remanescente no lodo de inóculo, de modo que pudesse estar em todos os reatores do ensaio, a biomassa utilizada no ensaio foi retirada no final do ciclo do reator em batelada. Como a duração do ciclo deste reator era de 24 horas e não se detectava nenhuma forma de nitrogênio após 15 horas de ciclo, acredita-se que a quantidade de N-amoniacal era insignificante.

Para comparar o N_2O formado com o nitrito ou nitrato consumido, foram construídas as Figuras 5.16, 5.17 e 5.18, que se referem aos reatores R2, R3 e R4, respectivamente. Nota-se que praticamente todo o nitrito consumido foi convertido para N_2O , o que é um forte indício que a rota utilizada foi interrompida pela inibição por acetileno, possibilitando a medição do nitrogênio reduzido.

Figura 5.16 – Consumo de NO_2^- e Produção acumulada de N_2O no reator R2

Figura 5.17 – Consumo de NO_2^- e Produção acumulada de N_2O no reator R3

Figura 5.18 – Concentração de NO_2^- e Produção acumulada de N_2O no reator R4

Figura 5.19 – Concentração de NO_2^- nos reatores R1 e R4

Para comparar a velocidade de desnitrificação utilizando etanol como fonte de carbono e utilizando apenas a matéria orgânica presente no lodo, os resultados do número de mols de nitrito obtidos nos reatores R1 e R4 são mostrados na Figura 5.18. As velocidades máximas do consumo de nitrito foram calculadas por regressão linear dos pontos da fase exponencial. Com estes valores e com as concentrações de sólidos suspensos voláteis (SSV), mostrados na Tabela 5.3, foram calculadas as velocidades máximas específicas para as duas situações em estudo.

Tabela 5.3 – Velocidade de consumo de nitrito

Reator	ssv (mg./l ⁻¹)	Velocidade g N/g SSV. d
1	1413	0,51
4	1354	0,10

Observa-se que a velocidade de desnitrificação no reator alimentado com etanol foi de 0,57 gN/gSSV.d, enquanto que no reator R4, que não recebeu etanol, foi de 0,10gN/gSSV.d, cerca de 18% da velocidade de R1. Isto pode ser um indicativo de que parte da desnitrificação ocorreu com a utilização de outra fonte doadora de elétrons, provavelmente resultante da respiração endógena da biomassa.

A Tabela 5.4 mostra as concentrações de nitrito e a eficiência de remoção nos reatores estudados. Com exceção do reator que recebeu adição de etanol como doador de elétrons e fonte de carbono, os demais apresentaram praticamente a mesma eficiência de remoção de nitrogênio.

Tabela 5.4 - Concentrações de Nitrito e Eficiência de remoção nos reatores

Reator	Concentração inicial de nitrito (mg./l ⁻¹)	Concentração final de nitrito (mg./l ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)
R 1	13,6	ND*	100
R 2	14,7	7,5	49,2
R 3	13,6	7,1	47,7
R 4	12,7	6,7	47,3

*ND: não detectado

Caso o nitrogênio amoniacal fosse utilizado como doador de elétrons, a maior disponibilidade de doador de elétrons nos reatores que receberam este composto poderia resultar em maior eficiência de remoção. Como os reatores R2, R3 e R4 apresentaram praticamente a mesma eficiência, a remoção por esta via não pode ser quantificada, ou as condições operacionais não possibilitaram esta alternativa, ou sua velocidade é lenta o suficiente para não ser notada diante da possível presença de fonte endógena e da matéria orgânica remanescente.

5.1.8 – Fatores que podem ter estimulado a remoção de nitrogênio via nitrito durante as etapas 1 e 2

Diante das vantagens da remoção de nitrogênio via nitrito, decidiu-se verificar alguns fatores que podem favorecer esta via, como a concentração de oxigênio dissolvido, concentração de ácido nitroso, concentração de amônia livre e a razão OD/NH₃.

Embora a concentração de N-amoniacal afluyente de 125 e 250 mg N/L seja elevada, comparada a concentração normalmente encontrada no esgoto sanitário, provavelmente este não deve ter sido o fator responsável pela remoção via nitrito no reator pois, a predominância de nitrito como forma oxidada de nitrogênio era evidente mesmo quando a concentração de N-amoniacal diminuía ao longo do ciclo.

Strotmann e Windecker (1997), estudando a cinética nitrificante com dois reatores, um com biomassa imobilizada outro com crescimento suspenso, não observaram acúmulo de nitrito com concentrações de N-amoniacal de 100 a 1000 mg N/L, comparativamente muito superiores às concentrações a que esteve submetido o reator deste estudo.

Quanto à concentração de oxigênio dissolvido, mantendo-se a concentração de oxigênio dissolvido entre 2,0 e 2,5 mg O₂/L, houve predominância de nitrito como forma de nitrogênio oxidada, diferente do relatado por Garrido *et al.* (1996) que, trabalhando com reator de leito expandido, obtiveram nitrificação completa quando a concentração de OD foi mantida em 2,5 mg/L. Todavia, estas observações não descartam a possibilidade de ter sido a concentração de OD o fator responsável pela remoção curta de nitrogênio, já que, como descrito no Capítulo 4, Materiais e Métodos, a leitura da sonda de OD provavelmente não representava a concentração de oxigênio no interior das espumas.

Quanto à concentração de ácido nitroso, esta pode inibir tanto a nitrificação como a desnitrificação e, de acordo com Anthonisen *et al.* (1976), pode ser estimada em função da concentração de nitrito, da temperatura e do valor de pH.

Os valores estimados para a máxima concentração de ácido nitroso (Tabela 5.5) estão abaixo da faixa de concentração considerada inibidora para a nitratação que é de 0,2 mg N/L a 2,8 mg N-HNO₂ /L (ANTHONISEN *et al.* 1976) e também abaixo da concentração mínima considerada inibidora para a desnitrificação, correspondente a 0,13 mg N-HNO₂/L, de acordo com Abeling e Seyfried (1992).

Tabela 5.5 – Concentração de nitrogênio como ácido nitroso durante operação do reator submetido a N-amoniacoal de 125 e 250 mg N /L

Concentração afluente N- amoniacoal	Concentração máxima de nitrito (mg N /L)	Valor mínimo de pH	Temperatura mínima (°C)	Máxima concentração de N-HNO ₂ (mg N /L)
125	13	8	28	0,0004
250	20	8	28	0,0008

Outra preocupação com inibição ocorreu pela alta concentração de N-amoniacoal, associada ao valor elevado de pH, que pode provocar concentrações de amônia livre inibidoras para as bactérias oxidantes de N-amoniacoal.

A concentração máxima de amônia livre foi calculada de acordo com Anthonisen *et al.* (1976) e foram consideradas as condições mais críticas a que esteve submetido o reator quanto aos valores de pH, temperatura e concentração de máxima de N-amoniacoal (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Concentração máxima de amônia livre durante operação do reator submetido a N-amoniacoal afluente de 125 mg N-NH₃/L e 250 mg N-NH₃/L

Concentração afluente N-amoniacoal (mg N /L)	Concentração máxima de N- amoniacoal (mg/L)	Valor máximo de pH	Temperatura máxima (°C)	Concentração máxima de amônia livre (mg N-NH ₃ /L)
125	90	8,3	29	14,1
250	160	8,3	29	22,8

A concentração de amônia livre pode ter afetado negativamente a atividade dos organismos oxidantes de nitrito, levando ao acúmulo desta forma oxidada de nitrogênio pois, segundo estudos de Anthonisen *et al.* (1976), a concentração inicial de inibição desses organismos fica na faixa entre 0,1 a 1,0 mg N-NH₃/L.

Porém, de acordo com Turk e Mavinic (1989), a inibição por amônia livre pode não ser permanente em decorrência da adaptação das bactérias oxidantes de nitrito. Os autores observaram que, mesmo com concentração média de amônia livre de 25,5 mg/L e picos de até 40 mg/L, não foi possível deter a diminuição no acúmulo de nitrito.

Çeçen (1996) ressalta que, além do efeito da adaptação das bactérias oxidantes de nitrito, a diminuição da concentração de nitrogênio amoniacoal, causada por sua própria

oxidação, pode tornar inviável manter o acúmulo de nitrito.

Para as bactérias oxidantes de N-amoniaco, a concentração de amônia livre não atingiu níveis inibidores, se for considerado o limite mínimo de 30mg/L, como sugerem Ford e Churchwell (1980). Porém, de acordo com Anthonisen *et al.* (1976), esses organismos podem ser inibidos se submetidos a concentrações de 10 a 150 mg N-NH₃/L e, neste caso, a concentração máxima calculada para o reator está dentro da faixa de inibição.

Çeçen (1996) afirma que, mais importante que a concentração de OD, é a relação OD/NH₃, que favorece o acúmulo de nitrito quando se torna menor que 10. Neste trabalho, a relação OD/N-NH₃ se manteve menor que 10 em todas as etapas (Figura 5.20), o que pode ter facilitado a remoção de nitrogênio via nitrito.

Figura 5.20 – Razão OD/N-NH₃ ao longo do ciclo
a – Nitrogênio afluente 125 mg N/L; b – Nitrogênio afluente 250 mg N/L

Para N-afluente de 250 mg/L, durante quase todo o ciclo o valor de OD/N-NH₃ manteve-se menor que 10. Apenas no final do ciclo ultrapassou este limite, pois a concentração de OD era controlada entre 2,0 e 2,5 mg O₂/L e a concentração de N-amoniaco estava muito próxima do limite de detecção do método.

De todos os fatores analisados como possíveis responsáveis pela inibição da oxidação de nitrito, a concentração de amônia livre, a concentração de oxigênio dissolvido e a razão OD/NH₃ podem ter sido os responsáveis pela remoção via nitrito durante operação do reator com N-amoniaco afluente de 125 e 250 mg N/L.

5.2 – Resultados e discussão relativos à operação do reator com N-amoniaco afluente de 500mg/L

Antes de apresentar os resultados, uma breve descrição da operação do reator com esta concentração de N-amoniaco afluente faz-se necessária, já que, no Capítulo 4, Materiais e Métodos, apresentou-se a descrição dos fatores que eram comuns a todas as etapas. As diferenças são apresentadas antes do início da apresentação dos resultados para facilitar a consulta das particularidades de cada etapa.

5.2.1 – Particularidades operacionais do reator quando submetido à concentração afluente de nitrogênio 500mg/L

O reator foi operado com tempo de ciclo de 24 horas e concentração afluente de nitrogênio de $499 \pm 9,8$ mg/L. Durante a operação, foram estabelecidas 4 fases distintas: Fase 1 – aeração intermitente, com períodos aeróbios e anóxicos com duração de 1 hora cada; Fase 2 – período de aeração de 20 horas, seguido de 4 horas anóxicas; Fase 3 – aeração intermitente, com períodos aeróbios de 11 horas e anóxicos com duração de 1 hora cada; Fase 4 - aeração intermitente, com períodos aeróbios de 11 horas e anóxicos com duração de 1 hora cada, porém, diferencia-se da Fase 3 pela concentração de oxigênio dissolvido.

Para controlar a concentração de oxigênio dissolvido durante o período aeróbio, como nas etapas anteriores, escolheu-se o limite máximo e mínimo da concentração de OD que determinava a abertura e o fechamento da válvula. Para as fases 1, 2 e 3, a faixa escolhida foi de 2 a 2,5 mg/L de OD. Para a Fase 4, a faixa escolhida foi de 4 a 5 mg/L.

A Tabela 5.7 resume a distinção das 4 fases de operação do reator durante operação com N-afluente de 500 mg N/L.

Tabela 5.7 – Fases de operação do reator com N-afluente de 500mg/L

Fase com N-amoniaco afluente de 500 mg/L	Tempo de ciclo (h)	Período de aeração (h)	Período anóxico (h)	Concentração de OD (mg/L)
1	24	1	1	2,0 a 2,5
2	24	20	4	2,0 a 2,5
3	24	11	1	2,0 a 2,5
4	24	11	1	4,0 a 5,0

5.2.2 - Oxigênio dissolvido durante operação do reator com N-amoniaco afluente de 500 mg N/L

Observou-se que o sistema de controle de entrada de ar foi eficiente para manter a concentração de oxigênio dissolvido dentro da faixa escolhida durante os períodos aeróbios, ou seja, OD entre 2,0 a 2,5 mg/L para as fases 1, 2 e 3, e, entre 4 e 5 mg/L para a fase 4. Os valores registrados, ao longo de um ciclo de 24 horas, compõem a Figura 5.21.

Figura 5.21 – Perfil temporal da concentração de oxigênio dissolvido durante operação com N-afluente 500 mg N /L
a – Fase 1; b – Fase 2; c – Fase 3; d – Fase 4

Apesar de operar com maior concentração de oxigênio na Fase 4, nota-se que esta concentração diminuía rapidamente após a interrupção da entrada de ar. Deste modo, possibilitava o processo de desnitrificação, essencial para remoção efetiva do nitrogênio oxidado no período aeróbio.

5.2.3 – Valores de pH e alcalinidade

Nas etapas anteriores, com concentração de N-afluente de 125 e 250 mg/L, a alcalinidade utilizada para preparação do substrato foi igual àquela estequiometricamente necessária para oxidação do N-amoniaco. Porém, para N-amoniaco afluente de 500 mg N/L, não foi possível manter a mesma proporção, pois, embora o pH afluente ficasse próximo de 8, como na etapa anterior, o pH do efluente ficou acima de 9. Para evitar que o pH elevado dificultasse a atividade dos organismos, foi usada alcalinidade igual à metade da requerida estequiometricamente.

A Tabela 5.8 apresenta os valores de alcalinidade total afluente e efluente durante a operação do reator submetido à concentração de N-amoniaco afluente de 500 mg N/L.

Tabela 5.8 – Alcalinidade total afluente e efluente durante operação do reator com N-afluente de 500 mg N/L

Fase com N-amoniaco afluente de 500 mg N/L	Tempo de ciclo (h)	Concentração de OD (mg/L)	Período de aeração (h)	Alcalinidade total afluente média (mg CaCO ₃ /L)	Alcalinidade total efluente média (mg CaCO ₃ /L)
1	24	2,0 a 2,5	1	1690 ± 24	274 ± 30
2	24	2,0 a 2,5	20	1850 ± 24	328 ± 5
3	24	2,0 a 2,5	12	1745 ± 25	272 ± 31
4	24	4,0 a 5,0	12	1726 ± 34	151 ± 29

Os valores de alcalinidade efluente das fases 1, 2 e 3, foram semelhantes, porém, a alcalinidade total efluente da Fase 4 foi menor comparada às demais. Isto pode ter ocorrido devido à maior quantidade de nitrogênio amoniaco oxidado nesta última etapa.

A alcalinidade utilizada na preparação do substrato, embora menor que a requerida estequiometricamente, foi suficiente para manter o pH na faixa de trabalho desejada. Os valores mínimos e máximos de pH observados durante os perfis temporais das quatro etapas de operação, com N-afluente 500 mg N/L estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Valores mínimos e máximos de pH durante operação do reator com N-afluente de 500 mg N/L

Fase com N-amoniacoal afluente de 500 mg/L	Tempo de ciclo (h)	Concentração de OD (mg/L)	Período de aeração (h)	pH mínimo observado	pH máximo observado
1	24	2,0 a 2,5	1	7,9	8,2
2	24	2,0 a 2,5	20	7,8	8,2
3	24	2,0 a 2,5	12	7,8	8,1
4	24	4,0 a 5,0	12	7,5	7,9

O objetivo era manter os valores de pH entre 7 e 8 durante a operação do reator. Com a redução na adição de alcalinidade, surgiu a preocupação com a possível redução dos valores de pH durante a nitrificação. Porém, os valores apresentados durante os perfis temporais (Figura 5.22) indicam que os valores de pH ficaram dentro da faixa esperada.

Figura 5.22 – Perfil temporal dos valores de pH durante operação do reator com N-amoniacoal afluente de 500 mg N/L

a – Fase 1; **b** – Fase 2; **c** – Fase 3; **d** – Fase 4

Na Fase 1 (Figura 5.22a), houve a preocupação com os valores de pH nas últimas horas do ciclo. Por trabalhar com uma hora de aeração e uma sem aeração, parte da alcalinidade utilizada na nitrificação seria devolvida na desnitrificação. Porém, nas últimas horas do ciclo, grande parte da alcalinidade poderia ter sido consumida, não sendo

suficiente para tamponar o sistema nas últimas horas aeradas. Os valores de pH permaneceram dentro da faixa esperada, talvez porque nem todo nitrogênio afluente chegou a ser nitrificado.

Nas fases de operação 2, 3 e 4, devido aos longos períodos aerados, o reator deveria ter ficado mais suscetível à diminuição dos valores de pH. Porém, os valores de pH permaneceram dentro da faixa desejada.

5.2.4 – Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal durante operação do reator com N-amoniacal afluente de 500 mg N/L

A eficiência do reator foi calculada considerando-se as formas de nitrogênio: nitrito, nitrato e amoniacal, no afluente e no efluente do reator. Na Tabela 5.10, estão expostos os valores de eficiência de remoção de nitrogênio em cada uma das fases de operação do reator com N-afluente de 500 mg N/L.

Tabela 5.10 – Eficiência de remoção de nitrogênio nas 4 fases de operação do reator submetido à concentração afluente de N-amoniacal 500 mg N/L

Etapa com N-amoniacal afluente de 500 mg N/L	Tempo de ciclo (h)	Período de aeração (h)	Período anóxico (h)	Concentração de OD (mg/L)	Eficiência média (%)	Desvio padrão (un)
1	24	1	1	2,0 a 2,5	44	7,6
2	24	20	4	2,0 a 2,5	64	4,1
3	24	11	1	2,0 a 2,5	62	8,4
4	24	11	1	4,0 a 5,0	85	1,2

Durante a Fase 1, obteve-se a menor eficiência. Provavelmente, este resultado deve-se ao tempo destinado à desnitrificação, pois, nesta etapa, a cada hora de aeração seguia-se uma hora de não aeração. Como a desnitrificação é mais rápida que a nitrificação, o período anóxico pode ter sido superdimensionado em comparação ao período aeróbio.

Na Fase 2, o tempo de ciclo foi mantido, porém, o período de aeração foi de 20 horas sendo 4 horas destinadas à desnitrificação. Esta alteração nos períodos aeróbio e anóxico possibilitou aumentar a eficiência do reator, provavelmente devido ao maior tempo dedicado à nitrificação.

Na Fase 3, o reator foi operado com períodos de aeração de 11 horas, seguidos de uma hora para desnitrificação e, apesar da alteração, sua eficiência foi muito semelhante à eficiência alcançada na etapa 2, talvez devido à soma dos períodos destinado à nitrificação ser muito semelhante à duração do período aerado da fase 2.

A Fase 4 foi realizada com a finalidade de se observar se ocorreria aumento na eficiência de remoção de nitrogênio frente às alterações introduzidas nesse ensaio. Nesta etapa, a faixa escolhida para a concentração de oxigênio dissolvido ficou entre 4 e 5 mg/L. Como resultado, o reator apresentou seu melhor desempenho comparado a todas as outras etapas com concentração de N-amoniacal de 500 mg N/L.

A Figura 5.23 mostra o perfil temporal das concentrações de nitrogênio inorgânico, N-amoniacal, nitrito e nitrato.

Figura 5.23 – Perfil temporal das concentrações de N-inorgânico (*), N-amoniacal (Δ), nitrito (▲) e nitrato (■) durante operação com N-afluente de 500 mg N/L
a – Fase 1; b – Fase 2; c – Fase 3; d – Fase 4

Pelos perfis temporais das Figuras 5.23a e 5.23b, observa-se a influência da duração do período de aeração no tempo de ciclo necessário, pois, na etapa 1, a soma de todos os períodos de aeração resultou em 12 horas para nitrificação; e na etapa 2, tem-se 20 horas. Provavelmente, a maior eficiência foi consequência do maior tempo destinado à nitrificação.

A influência da concentração de oxigênio dissolvido pode ser notada pela comparação dos perfis temporais representados nas Figuras 5.23c e 5.23d, pois mantendo-se todas as características operacionais, com exceção da concentração de oxigênio dissolvido, o reator apresentou maior eficiência na Fase 4. Aparentemente, para se conseguir a mesma eficiência nos demais modos de operação, seria necessário aumentar o tempo de ciclo.

Pela observação da Figura 5.23, nota-se que o tempo de ciclo necessário deve ser encontrado em função, além da concentração de N-afluente, dos parâmetros operacionais: OD, duração dos períodos aeróbios e duração dos períodos anóxicos.

Um fator que pode prejudicar a eficiência na remoção de N-amoniacoal é a concentração de ácido nitroso. A estimativa da concentração de ácido nitroso é feita em função da concentração de nitrito, temperatura e pH, sendo que a condição mais crítica ocorre com altos valores da concentração de nitrito, baixos valores de pH, e baixos valores de temperatura.

Observando-se a Figura 5.24, verifica-se que em todas as fases de operação com N-amoniacoal afluente de 500 mg N /L a concentração de ácido nitroso foi inferior aos limites considerados inibidores para a nitrificação, 0,2 mg N-HNO₂/L segundo Anthonisen *et al.* (1976), e também para a desnitrificação, 0,13 mg N-HNO₂/L, segundo Abeling e Seyfried (1992).

Figura 5.24 – Perfil temporal das concentrações de ácido nitroso durante operação com N-amoniacal afluyente de 500 mg N/L
a – Fase 1; **b** – Fase 2; **c** – Fase 3; **d** – Fase 4

Quanto à concentração de nitrito, a operação do reator com aeração intermitente possibilita o controle indireto da concentração deste composto em função do período aerado. Na Fase 1 de operação com N-afluyente de 500 mg N/L, o período de aeração de uma hora impediu que a concentração de nitrito atingisse valores elevados. Desta forma, colaborou para menores valores de ácido nitroso.

Para as Fases 2, 3 e 4, os períodos de aeração foram mais longos, possibilitando elevados valores de concentração de nitrito. Porém, os elevados valores de pH foram responsáveis pela baixa concentração de ácido nitroso.

5.2.5 - Concentração de nitrito e nitrato

Considerando-se NO_t a soma das concentrações N-nitrito e N-nitrato, observou-se que a razão $\text{NO}_2^-/\text{NO}_t$, que aumentou gradualmente durante a operação com N-afluyente de 125mg/L, foi mantida durante a operação com N-amoniacal afluyente de 500mg/L.

Os perfis temporais das concentrações de nitrito e nitrato, realizados nos mesmos dias dos perfis temporais das concentrações de N-inorgânico, evidenciam que o nitrito permaneceu como forma de nitrogênio oxidada predominante, como pode ser visto na Figura 5.25.

Figura 5.25 – Perfil temporal das concentrações de nitrito (▲) e nitrato (■) durante operação com N-amoniaco afluente de 500 mg/L
a – Fase 1; b – Fase 2; c – Fase 3; d – Fase 4

Pela observação dos perfis temporais representados na Figura 5.25, nota-se que a soma de nitrito e nitrato não se igualam ao nitrogênio amoniacal removido. Esse resultado indica a possível ocorrência de nitrificação/desnitrificação simultâneas, o que também pode explicar a baixa concentração de nitrito observada nos perfis temporais apresentados na Figura 5.25a e 5.25c, deste modo, a baixa concentração de oxigênio dissolvido durante os períodos aeróbios, que pode ter favorecido a desnitrificação, assim a velocidade de consumo de nitrito pode ter sido semelhante a velocidade de produção deste, possibilitando um pequeno acúmulo desta forma de nitrogênio.

A elevada concentração de nitrito na fase 4 (Figura 5.25d) ocorreu provavelmente

em função da maior concentração de oxigênio dissolvido. Porém, na fase 2 (Figura 5.25b) a concentração de OD deveria ter sido baixa como nas fases 1 e 3, mas o medidor de OD provavelmente estava descalibrado e, possivelmente registrou valores abaixo do real, de modo que o reator pode ter perdido a calibração e registrando um valor abaixo dos reais, de modo que o reator pode ter trabalhado com concentração de OD mais elevada.

O período destinado à desnitrificação possibilitou a efetiva remoção do nitrogênio oxidado. A diminuição da concentração de nitrito ocorreu rapidamente após a interrupção da entrada de ar, o que pode indicar que a duração dos períodos aeróbios não afetou negativamente a remoção de nitrito. Além disso, assim que se reiniciava a aeração, a concentração de nitrito começava a aumentar, indicando que o período anóxico não havia afetado negativamente a atividade dos organismos nitrificantes.

Com o objetivo de promover a remoção de nitrogênio via nitrito, Yoo *et al.* (1999) recomendam tempo de aeração de 72 minutos. Segundo os autores, períodos de aeração mais prolongados possibilitaria adaptação das bactérias oxidantes de nitrito, inibidas pela alternância de ambiente aeróbio e anóxico.

Neste experimento, a duração dos períodos aerados não comprometeu a predominância de nitrito como forma oxidada de nitrogênio. Pela observação da Figura 5.23b, verifica-se que, embora com 20 horas de aeração, a concentração de nitrato permaneceu significativamente menor que a concentração de nitrito. Provavelmente a duração do período de aeração não é um parâmetro operacional fundamental para o estabelecimento e manutenção da remoção curta de nitrogênio nas condições ambientais estudadas.

Neste estudo, a baixa concentração de oxigênio dissolvido não se mostrou essencial para promover o acúmulo de nitrito na fase aerada, pois, observando-se o perfil temporal da Figura 5.23d, nota-se que, apesar de operar com elevada concentração de OD, comparada à concentração recomendada de 1 a 2 mg/L (GARRIDO *et al.*, 1996) e de 1,3 mg/L (YOO *et al.*, 1999), foi possível manter a remoção de nitrogênio via nitrito. Porém, é importante ressaltar que a concentração ideal de oxigênio dissolvido em um reator pode ser muito diferente da concentração ideal em outro.

A desvantagem da baixa concentração de OD é a possibilidade de comprometer a remoção de nitrogênio, pelo não suprimento de oxigênio suficiente para oxidar o N-

amoniacal, conforme observado por Garrido *et al.* (1996) para concentração de OD menor que 1 mg/L. Entretanto, a operação a valores elevados de OD poderia comprometer a remoção via nitrito, mas, diferente disto, neste experimento observou-se melhor eficiência de remoção de nitrogênio, sem comprometer a remoção via nitrito, quando a concentração de OD ficou entre 4 e 5 mg/L.

5.2.6 – Fatores que podem ter estimulado a remoção de nitrogênio via nitrito durante operação com N-afluente de 500 mg/L

Os resultados obtidos com os perfis temporais das concentrações de nitrito e nitrato evidenciaram que, nem a duração do período aeróbio, nem a elevada concentração de OD, possibilitaram oxidação do nitrito. Diante disso, restam três fatores que podem promover a remoção curta de nitrogênio: inibição por amônia livre, razão OD/NH₃, ou a seleção de microrganismos imposta pela estratégia de operação dos reatores.

Os valores das concentrações de amônia livre foram calculados de acordo com Anthonisen *et al.* (1976) e compõem a Figura 5.26.

Na Fase 1 (Figura 5.26a), observam-se valores elevados da concentração de amônia livre no início do ciclo. Porém, esta concentração logo diminuiu e não sofreu mais grandes alterações. Os altos valores iniciais devem-se à temperatura mais baixa no início do ciclo e, também, valores mais elevados de pH. Quanto à pequena variação nos valores de amônia livre observada nas horas seguintes, esta pode ter ocorrido devido ao uso de aeração intermitente, pois a nitrificação ocorrida no período aeróbio reduzia a alcalinidade, que era parcialmente devolvida ao meio no período anóxico através da desnitrificação. Assim, é possível que os valores de pH sofram menor alteração e pequenas elevações nos valores de pH causam grandes acréscimos nos valores das concentrações de amônia livre.

Figura 5.26 – Perfil temporal das concentrações de amônia livre durante operação do reator com N-afluente de 500mg N/L
a – Fase 1; **b** – Fase 2; **c** – Fase 3; **d** – Fase 4

Na Fase 2 (Figura 5.26b), diferente da Fase 1, observa-se a diminuição gradual dos valores da concentração de amônia livre em função do pH, que diminui durante as 20 horas de aeração. Após o período anóxico, observam-se valores mais altos da concentração de amônia livre, alteração ocorrida devido à elevação dos valores de pH no período anóxico.

A influência dos valores de pH pode ser observada também na Fase 3 (Figura 5.26c), o que explica o aumento brusco dos valores das concentrações de amônia livre que acontece justamente com o período anóxico, pois, a equação utilizada para estimativa da concentração de amônia livre é exponencial em função do pH.

Os menores valores de concentração de amônia livre observados no perfil temporal da Fase 4 (Figura 5.26d) devem-se aos menores valores de pH ocorridos durante o perfil.

Pela observação do perfil temporal de amônia livre (Figura 5.26), nota-se que a concentração de amônia livre foi elevada em todas as etapas, muito acima da concentração recomendada para inibir a oxidação de nitrito sugerida por Surmacz-Górska *et al.* (1997), que é de 1 a 6 mg/L durante estudo com reator de lodo ativado em escala de bancada, e de 1

a 5 mg/L segundo Abeling e Seyfried (1992) que trabalharam com biomassa imobilizada. Se forem consideradas estas recomendações, a concentração de amônia livre pode ter sido responsável pela remoção de nitrogênio via nitrito.

Porém, Turk e Mavinic (1989) relatam a ocorrência da adaptação dos organismos oxidantes de nitrito e, conseqüentemente, perda do acúmulo de nitrito com concentração média de amônia livre de 25,5 mg/L e picos de até 40 mg/L em um reator de lodos ativados. Comparado a esta capacidade de adaptação, nota-se, no perfil temporal das concentrações de amônia livre, valores significativamente abaixo, porém que não comprometeram a remoção de nitrogênio via nitrito.

Quanto a relação OD/NH_3 , descrita por Çeçen (1996) como fator que favorece o acúmulo de nitrito quando se torna menor que 10, esta se manteve abaixo deste limite em todas as fases de operação com N-amoniacal afluyente de 500 mg N/L (Figura 5.27), o que pode ter facilitado a remoção de nitrogênio via nitrito.

Figura 5.27 – Perfil temporal das razões OD/NH_3 durante operação do reator com N-afluyente de 500mg N/L

a – Fase 1; **b** – Fase 2; **c** – Fase 3; **d** – Fase 4

Durante operação do reator com N-afluente de 500mg N/L prevaleceu a remoção via nitrito, porém permaneceu também a dúvida sobre qual parâmetro operacional é essencial para o estabelecimento desta via, já que durante esta fase trabalhou-se com alta concentração de amônia livre e baixa relação OD/NH₃. Diante disto, fez-se necessária a realização da Etapa 4 com intenção de diminuir a concentração de amônia livre e aumentar a razão OD/NH₃.

5.3 – Resultados e discussão relativos à operação do reator com N-amoniaco afluente de 40mg/L

O principal objetivo desta etapa foi diminuir a concentração de N-amoniaco para verificar a possibilidade de remoção via nitrito mesmo em baixas concentrações de amônia livre.

5.3.1 - Particularidades operacionais do reator quando submetido à concentração afluente de nitrogênio 40 mg N /L

O reator foi operado com tempo de ciclo de 6 horas e concentração afluente de nitrogênio amoniaco de $40 \pm 1,4$ mg N/L. O período de operação pode ser dividido em quatro fases, de acordo com a concentração de oxigênio dissolvido e da temperatura (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 – Descrição das fases de operação do reator submetido a N-amoniaco afluente de 40 mg/L

Fase	Tempo de ciclo (h)	Duração do período de aeração	OD (mg/L)	Temperatura (°C)
1	6	intermitente 1 hora	2,0 a 2,5	21±0,9
2	6	intermitente 1 hora	2,0 a 2,5	27±1,0
3	6	intermitente 1 hora	4,0 a 5,0	26±1,0
4	6	4 horas aeração 1,5 hora anoxia	4,0 a 5,0	27±1,2

5.3.2 - Eficiência de remoção de nitrogênio durante operação com N-afluente de 40 mg/L

Como nas demais etapas, a eficiência foi calculada considerando-se a soma das concentrações de N-amoniacal, nitrito e nitrato afluente e efluente (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 - Valores da eficiência em cada fase de operação durante operação do reator com N-afluente de 40 mg N/L

Fase	Eficiência (%)
1	$46 \pm 3,5$
2	$49 \pm 7,6$
3	$96 \pm 3,2$
4	$97 \pm 1,1$

Pela observação da Tabela 5.12, verifica-se que a diferença nas condições operacionais das Fases 1 e 2 é basicamente a temperatura, porém, este estudo não teve a intenção de estudar a interferência deste parâmetro entretanto, devido a problemas com o controle de temperatura da câmara, foi inevitável a operação com temperaturas mais baixas, o que resultou em pequena redução na eficiência do reator.

A comparação entre os valores de eficiência encontrados nas Fases 2 e 3 evidencia que, na Fase 3, o reator apresentou desempenho muito superior quanto à remoção de nitrogênio. A pequena diferença de temperatura e o mesmo procedimento operacional adotado nestas fases, leva a crer que a baixa concentração de oxigênio dissolvido tenha limitado o desempenho do reator na Fase 2.

A diferença entre as fases 3 e 4 deve-se ao período de aeração. Na Fase 3, a soma dos períodos de aeração dedicados à oxidação de N-amoniacal foi de 3 horas e, na Fase 4, de 4,5 horas. Mesmo assim, o desempenho do reator nas Fases 3 e 4 foi praticamente igual.

Para observar a remoção de nitrogênio ao longo do tempo, realizaram-se perfis temporais da concentração de nitrogênio inorgânico de todas as fases de operação com N-afluente de 40 mg N/L.

Considerou-se que a concentração de N-inorgânico é numericamente igual à soma das concentrações de nitrito, nitrato e N-amoniacal. Os valores das concentrações de N-inorgânico, N-amoniacal, nitrito e nitrato, a partir das análises de amostras retiradas ao

longo do ciclo, compõem a Figura 5.28.

Pode-se observar que os perfis temporais das concentrações de N-inorgânico nas Fases 1 e 2 são muito semelhantes (Figura 5.28a e 5.28b) e que, na primeira metade do ciclo, ocorre a maior diminuição da concentração de N-inorgânico. Na segunda metade do ciclo, esta concentração pouco se alterou.

Durante as Fases 3 e 4, além do melhor desempenho do reator quanto à diminuição da concentração de nitrogênio, a redução da concentração de N-inorgânico foi mais homogênea ao longo do ciclo.

Figura 5.28 - Perfil temporal das concentrações de N-inorgânico (*), N-amoniacal (Δ), nitrito ($\blacktriangle$) e nitrato ($\blacksquare$) durante operação com N-afluente de 40 mg N/L.
a – Fase 1; b – Fase 2; c – Fase 3; d – Fase 4

5.3.3 - Remoção de nitrogênio via nitrito durante operação do reator com N-afluente 40 mg N/L

Durante as Fases 1, 2 e 3, ocorreu a remoção de nitrogênio via nitrito, sendo que, durante a Fase 3, obteve-se desempenho satisfatório. Deste modo, a Fase 4 não teve a intenção de aumentar a eficiência, mas de verificar a estabilidade da remoção de nitrogênio via nitrito diante do aumento duração do período aerado e elevada concentração de oxigênio.

O reator apresentou comportamento semelhante em relação às concentrações de nitrito e nitrato nas Fases 1 e 2, indicando que a diferença de temperatura entre estas duas etapas não influenciou a predominância de nitrito como forma oxidada de nitrogênio. Os perfis temporais das concentrações de nitrito e nitrato foram realizados nos mesmos dias que os perfis temporais da concentração de N-inorgânico (Figura 5.29).

Figura 5.29 - Perfil temporal da concentração das concentrações de nitrito (▲) e nitrato (■) durante operação do reator com N-afluente de 40 mg/L
a – Fase 1; b – Fase 2; c – Fase 3; d – Fase 4

É importante notar que, na Fase 3, o aumento da concentração de oxigênio dissolvido para valores entre 4 e 5 mg O₂/ L não foi suficiente para promover a remoção de nitrogênio via nitrato. Nota-se que o nitrito predominou como forma de nitrogênio oxidada (Figura 5.29).

A Fase 4 possibilitou verificar se o curto período de aeração era o fator limitante para a remoção de nitrogênio via nitrato. Assim, o período de aeração do reator foi prolongado para 4 horas contínuas. Embora os valores de nitrato tenham esboçado uma recuperação, o nitrito manteve-se como forma oxidada de nitrogênio.

A recuperação da nitratação esboçada na Fase 4, embora não tenha comprometido a remoção via nitrito, pode ser um indicativo da possibilidade de recuperar a capacidade de oxidação do nitrito.

5.3.4 - Fatores que podem ter estimulado a remoção de nitrogênio via nitrito durante operação com N-afluente de 40 mg/L

Observou-se que, ao longo de todas as etapas de operação do reator, foi possível manter a remoção via nitrito. Para verificar se a concentração de amônia livre foi o fator essencial à remoção via nitrito, a concentração de N-amoniacoal foi reduzida para 40 mg/L, a concentração de OD foi elevada, porém esta via permaneceu.

A partir dos perfis temporais da concentração de N-amoniacoal, temperatura e pH, calculou-se a concentração de amônia livre, construindo o perfil temporal (Figura 5.30).

Anthonisen *et al.* (1976) relataram acúmulo de nitrito com concentração de amônia livre acima de 0,3 mg/L. Pela observação dos perfis temporais das concentrações de amônia livre, Figura 5.30a e 5.30b, estas concentrações ficaram próximas de 1mg/L. Deste modo, esta concentração poderia ter sido inibidora para a oxidação de nitrito.

Figura 5.30 - Perfil temporal da concentração de amônia livre durante operação do reator com N-afluente de 40 mg/L
a – Fase 1; **b** – Fase 2; **c** – Fase 3; **d** – Fase 4

Para as Fases 3 e 4, observa-se que as concentrações de amônia livre diminuem rapidamente, de modo que a concentração poderia ser considerada inibidora apenas no início do ciclo, comprometendo a remoção de nitrogênio via nitrito. Além disso, poderia ainda ocorrer a adaptação dos organismos oxidantes de nitrito, como descrito por Turk e Mavinic (1989), que relatam perda do acúmulo de nitrito com concentração média de amônia livre de 25,5 mg/L e picos de até 40 mg/L.

Quanto a razão OD/NH_3 , o perfil temporal mostra que, para as Fases 1 e 2 de operação com N-afluente de 40 mg/L, a razão OD/NH_3 esteve abaixo de 10, o que, segundo Çeçen (1996), pode favorecer a remoção via nitrito. Porém, para as Fases 3 e 4, esta razão tornou-se maior que dez e mesmo assim esta via permaneceu estável (Figura 5.31).

Figura 5.31 – Perfil temporal das razões OD/NH₃ durante operação com N-afluente de 40mg N/L
a – Fase 1; **b** – Fase 2; **c** – Fase 3; **d** – Fase 4

Nas Fases 1 e 2, tanto a baixa concentração de oxigênio, a concentração de amônia livre, a razão OD / NH₃ e o curto período de aeração poderiam ter sido responsáveis pela remoção via nitrito.

Já para a Fase 3, a concentração de OD foi mais alta, a concentração de amônia livre atingiu níveis que podem ser considerados inibidores apenas no início do ciclo e, mesmo assim, valores muito menores que a concentração de 25,5 mg/L, para a qual Turk e Mavinic (1989) observaram a ocorrência de adaptação dos organismos com perda do acúmulo de nitrito.

Para a Fase 4, além da alta concentração de OD, da baixa concentração de N-amoniacoal e da alta razão OD/NH₃, o reator foi operado com período de aeração longo, bem maior que os 72 minutos recomendados por Turk e Mavinic (1989) para promover a remoção via nitrito.

Com estas observações, o reator pode ter possibilitado a remoção via nitrito ou pelas suas características geométricas ou pela seleção de organismos que possibilitaram esta via, embora o perfil temporal das concentrações de N-nitrito e N-nitrato (Figura 5.29) possa esboçar a possibilidade de recuperação da capacidade de oxidação de nitrito.

5.4 - Exames microbiológicos

Exames microbiológicos foram realizados com o intuito de estimar a dimensão das populações de organismos nitrificantes e desnitrificantes, compará-los nas diferentes condições operacionais do estudo. Nas condições operacionais de N-afluente de 125 e 250 mgN/L, foram caracterizadas cepas bacterianas possivelmente vinculadas à remoção de nitrogênio no reator em estudo. Na condição operacional de N-afluente de 250 mgN/L, a caracterização da biomassa nos permitiu inferir sobre os possíveis organismos mais frequentes participantes no ciclo do nitrogênio no sistema em estudo.

5.4.1 – Estimativa da população de organismos nitrificantes e desnitrificantes

A microbiota nitrificante e desnitrificante foram estimadas no final de cada etapa (Tabela 5.13). Com estes resultados, foi possível verificar se a remoção via nitrito ocorria em virtude da ausência de organismos capazes de oxidar nitrito a nitrato e, além disso, verificar a sensibilidade dos organismos, através da dimensão da população, quanto às alterações na concentração de N-amoniaco afluente e da concentração de oxigênio dissolvido.

Tabela 5.13 – Número Mais Provável de organismos nitrificantes e desnitrificantes

condição operacional	Nitrificantes				Desnitrificantes	
	N-afluente	OD	oxidantes	oxidantes	Via nitrito	Via nitrato
			de N-amoniaco	de nitrito		
	(mg N/L)	(mg/L)	$\left(\frac{NMP}{mg\ SSV} \right)$	$\left(\frac{NMP}{mg\ SSV} \right)$	$\left(\frac{NMP}{mg\ SSV} \right)$	$\left(\frac{NMP}{mg\ SSV} \right)$
1	125	2,0 a 2,5	7,4E+06	6,1E+06	1,3E+06	8,5E+05
2	250	2,0 a 2,5	3,9E+05	2,7E+04	9,4E+05	1,2E+06
3	500	2,0 a 2,5	5,0E+04	1,7E+00	2,6E+04	1,8E+03
4	500	4,0 a 5,0	1,6E+06	2,4E+02	4,3E+05	2,1E+04
5	40	2,0 a 2,5	3,5E+05	8,5E+02	4,7E+05	4,7E+05

A Figura 5.32 facilita a visualização das variações dos valores estimados para as populações de bactérias nitrificantes e desnitrificantes presentes no reator durante as alterações operacionais descritas na Tabela 5.13.

Figura 5.32 – Log da razão entre o NMP das células e a concentração de SSV nas condições operacionais descritas na Tabela 5.13 - (□) organismos oxidantes de N-amoniaco, (△) organismos oxidantes de nitrito, (○) organismos desnitrificantes via nitrito, (+) organismos desnitrificantes via nitrato

Nota-se, para a primeira condição (amostra 1), a mesma ordem de grandeza para a razão do número de células pela concentração de SSV tanto para organismos nitrificantes quanto para desnitrificantes. A partir da segunda condição, torna-se evidente a maior sensibilidade dos organismos oxidantes de nitrito, o que é um fator positivo diante do interesse em promover a remoção de nitrogênio via nitrito.

O reator operou com remoção curta de nitrogênio desde a primeira etapa (amostra 1), quando a razão NMP células/mg SSV dos organismos oxidantes de nitrito apresentavam a mesma ordem de grandeza da razão calculada para os organismos oxidantes de amônia, evidenciando que a presença de organismos capazes de oxidar nitrito não compromete a remoção curta de nitrogênio.

A semelhança na ordem de grandeza da população dos organismos oxidantes de amônia e dos oxidantes de nitrito evidencia que a imobilização da biomassa, comparada ao crescimento suspenso, embora possa proporcionar maior facilidade de permanência dos organismos oxidantes de nitrito no reator, não comprometeu a predominância do nitrito como a forma de nitrogênio oxidada, indicando a possibilidade de usufruir-se de todas as vantagens da biomassa imobilizada sem comprometer a nitrificação parcial.

A amostra 2 evidencia redução na população de todos os organismos monitorados. Isto pode ter ocorrido devido ao aumento da concentração de nitrogênio amoniacal afluente ou em razão de uma diminuição gradual em função do tempo de operação.

A amostra 3 (reator operado com N-afluente de 500mg/L e OD de 2,0 a 2,5) apresentou o menor valor para a razão entre o NMP de células e a concentração de sólidos

voláteis. Aparentemente, a alta concentração de N-amoniacal e o baixo valor de OD foram prejudiciais tanto ao crescimento dos organismos nitrificantes quanto ao crescimento dos organismos desnitrificantes. Porém, os organismos oxidantes de nitrito apresentaram maior sensibilidade à elevada concentração de N-amoniacal.

A amostra 4 sugere a possibilidade de recuperação da população de organismos nitrificantes e desnitrificantes. Dois fatores podem, isoladamente ou não, ter sido responsáveis por esta aparente recuperação: o tempo, que pode ter possibilitado adaptação dos organismos à alta concentração de nitrogênio, ou a concentração de oxigênio dissolvido, que pode ter sido um fator limitante ao crescimento destes organismos.

A amostra 5 mostra a tendência de voltar às dimensões das populações encontradas na etapa 1. Porém, a população de organismos oxidantes de nitrito ainda foi menor que as demais.

5.4.2 - Isolamento e seqüenciamento do DNA 16S de cepas bacterianas das amostras retiradas do reator durante operação com N-afluente de 125 e 250 mgN/L

A partir das maiores diluições das amostras com resultado positivo do ensaio de NMP, foram isoladas 8 cepas de bactérias potencialmente responsáveis pela remoção do nitrogênio (via nitrito e via nitrato). A Tabela 5.14 mostra as condições de operação do reator associadas às cepas isoladas e a Figura (5.33) as imagens das cepas isoladas observadas por microscopia ótica de contraste de fase.

Tabela 5.14 - Seqüenciamento do DNA das cepas isoladas a partir das mais altas diluições do NMP. O número de referência segue o banco de dados (NCBI-blast) para cada cepa isolada.

Fase de operação do reator	Concentração N-amoniacal (mg.l ⁻¹)	Cepa isolada do NMP via nitrito	Cepa isolada do NMP via nitrato
Fase 1	125	<i>Acinetobacter johnsonii</i> 27597198*	<i>Pseudomonas saccharophila</i> 14091482*
Fase 2	250	<i>Zooglea resiniphila</i> 23504764*	<i>Zooglea resiniphila</i> 23504764*

* Número de referencia do banco de dados NCBI (aproximadamente 600 pares de base)

Figura (5.33) – Cepas isoladas identificadas como: a - *Acinetobacter johnsonii*, b- *Pseudomonas saccharophila*, c - *Zoogloea resiniphila* (aumento de 1500 X)

O gênero *Acinetobacter* está também envolvido com a remoção de fósforo em sistemas de lodos ativados (WAGNER *et al.* 1994). Em sistemas operados com alternância de ciclos anaeróbio/aeróbio, tais organismos utilizariam nitrato como aceitor final de elétron (KUBA *et al.*, 1993; DABERT *et al.*, 2001). Tal metabolismo é também descrito para o grupo das pseudomonas (MERZOUKI *et al.*, 1999).

O seqüenciamento do DNA da amostra retirada durante a operação com N-amoniaco afluente de 250 mg evidenciou a presença de *Zoogloea resiniphila* para ambas as vias de desnitrificação. Tais organismos também foram isolados de amostra de material polimérico aderido às paredes internas do reator e nos espaços intersticiais das espumas. *Z. resiniphila* é capaz de utilizar nitrito e nitrato em ambientes anóxicos com produção de N₂ (BERGEY's, 1994).

5.4.3 – Resultados do seqüenciamento do DNA total (16S ribossomal) da amostra de biomassa retirada do reator durante operação com N-afluente de 250 mgN/L

Da amostra de biomassa retirada no final do período de operação com N-afluente de 250mg/L, uma fração foi utilizada para a extração do DNA total. Foram clonadas 142

colônias, das quais 60 clones foram colhidos aleatoriamente e analisados. A análise dos 60 clones seqüenciados gerou uma tabela de frequência utilizada para inferir sobre a distribuição dos organismos na população original do reator. Dessa forma, a partir dos organismos identificados, foi possível fazer inferências a respeito de sua fisiologia.

Os organismos identificados, encontrados com maior frequência relativa aos 60 clones analisados, bem como seu número de identificação no NCBI e seu índice de similaridade compõem a Tabela 5.15.

Tabela 5.15 - Organismos identificados da amostra de DNA total - O número de referência segue o banco de dados (NCBI-blast).

Gênero e/ou espécie	Fisiologia	Frequência relativa ao total de clones analisados (%)	Número de identificação NCBI	Índice de similaridade (%)
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Oxidação de N-amoniacal	28,3	BX321856*	98
Bactéria não cultivada em laboratório	Desnitrificante	28,3	AJ412669*	99
Bactéria não cultivada em laboratório(PHOS-HE36)	Remoção de fósforo e respiração de nitrato	8,3	AF314435*	99
uncultured eubacterium	Desnitrificante	5,0	AJ412669*	98
<i>Thauera mechernichensis</i>	Desnitrificante aeróbia	5,0	Y17590*	97
<i>Thauera</i> sp. 27	Desnitrificante aeróbia		AY838760*	97
Bactéria não cultivada em laboratório	ANAMMOX	5,0	AB194898*	97

* Número de referência do banco de dados NCBI (aproximadamente 600 pares de base)

Os resultados de frequência relativa dos clones analisados indicam maior porcentagem das bactérias oxidantes de N-amoniacal a nitrito (28%) e desnitrificantes (28%). Não foram identificados clones de bactérias oxidantes de nitrito. Porém, como

foram analisados apenas 60 clones de um total de 142, este resultado não elimina a possibilidade da presença destes organismos no reator; apenas indica que, provavelmente, estão em menor número de acordo com os resultados da análise de NMP.

Observa-se que 28 % da população apresentou índice de similaridade de 98 % com *Nitrosomonas europaea*, de acordo com Wiesmman (1994), espécie capaz de oxidar N-amoniacal a nitrito encontrada com maior frequência em sistemas de tratamento de esgoto. Os valores de pH, oxigênio e da concentração de N-amoniacal interferem na seleção da comunidade microbiana de bactérias nitrificantes no reator (PRINCIC *et al.*, 1998). Durante operação do reator em questão, os valores de pH ficaram próximos de 8 que, segundo Suzuki *et al.* (1974), é o valor ótimo para crescimento de bactérias da espécie *Nitrosomonas europaea*.

A presença de desnitrificantes aeróbias, poderia justificar a baixa concentração de nitrito nos períodos aeróbios e, também, a concentração de nitrito desproporcional à remoção de nitrogênio. Segundo ZHAO *et al.* (1999), o processo de remoção de nitrogênio por nitrificação e desnitrificação simultâneas (SND), baseado na nitrificação heterótrofa e desnitrificação aeróbia, é provavelmente a principal causa de perda de nitrogênio em sistemas de tratamento de efluentes domésticos. Porém, os autores ressaltam que a SND baseada na nitrificação autotrófica e desnitrificação em micro sítios anóxicos, causadas pela limitação na transferência de oxigênio, não deve ser descartada.

A presença de organismos relacionados à oxidação anaeróbia de nitrogênio (ANAMMOX) não era esperada, pois estes organismos são sensíveis à presença de oxigênio e o reator operava com aeração intermitente. Porém, de acordo com Jetten *et al.* (1999), a atividade destes organismos cessa com a presença de oxigênio, mas o efeito inibidor é reversível, e esta atividade é reiniciada no período anóxico. Além disso, durante a operação do reator, o pH foi mantido próximo de 8 e a temperatura próxima de 30 °C. Estes valores estão dentro da faixa ideal para crescimento de bactérias relacionadas ao processo ANAMMOX de acordo com Jetten *et al.* (1999).

A atividade dos organismos responsáveis pelo processo ANAMMOX é severamente inibida pela adição de matéria orgânica como o etanol (JETTEN *et al.*, 1999), substância que foi utilizada neste experimento para suprir a necessidade de fonte de carbono e doador de elétrons para o processo de desnitrificação. Porém, a relação C/N de apenas 3, aliada à

possibilidade de existência de micro sítios onde a transferência de massa era limitada, podem ter possibilitado o crescimento destes organismos.

5.5 - Perda de massa e volume do leito de espuma utilizado para imobilização da biomassa

Inicialmente, os cubos de espuma preenchiam todo o volume do cesto de inox do reator. Porém, durante o período de operação, notou-se diminuição gradual do volume da espuma no cesto, de modo que o meio suporte não preenchia todo o volume a ele destinado. Este fato poderia ser resultado da compressão do leito, devido ao peso da biomassa aderida e da água retida. Entretanto, os valores decrescentes de massa seca da amostra de espuma (Figura 5.34) indicaram que tal hipótese não era satisfatória.

Figura 5.34 – Massa seca da espuma ao longo do período de operação

Notou-se que a massa seca da espuma da última amostragem foi próxima de 50% da massa da amostra inicial. Além disso, na primeira metade do período de operação, a diminuição da massa seca foi menor comparada à diminuição ocorrida no período final, indicando que mudanças nas condições operacionais do reator poderiam ter favorecido a degradação da espuma.

As principais mudanças que ocorreram ao longo do período de operação do reator foram: aumento da concentração de N-amoniaco afluente; aumento na concentração de

oxigênio dissolvido além da formação de espaços que possibilitassem movimentação dos cubos de espuma.

O movimento do meio líquido, incrementado pelo movimento ascendente das bolhas de ar, pode ter favorecido o desgaste dos cubos, diminuindo assim o seu volume no reator. O longo período de operação, associado ao aumento gradual da fase líquida, facilitou a movimentação do leito suporte, o que pode explicar a maior degradação na segunda metade do período de operação.

Além da alteração na massa das amostras de espuma, observou-se também mudança quanto à forma das mesmas, com o arredondamento das arestas dos cubos e, até mesmo, sua transformação em esferas (Figura 5.35).

Figura 5.35 - Formas da espuma encontrada no leito

A alteração na forma do meio suporte indica que o desgaste por cisalhamento pode ter sido o principal responsável pelas perdas de massa e volume. Caso a degradação fosse de origem química ou biológica, provavelmente seriam observadas espumas de formas irregulares e variadas e, não com tal simetria.

O problema mais evidente do desgaste do meio suporte e, conseqüentemente, das perdas de volume e massa, refere-se à possível diminuição da quantidade de biomassa no reator. Em virtude das condições operacionais e das características físicas do reator, a imobilização pode ser fator essencial para a permanência de microrganismos no sistema, conseqüentemente, a menor quantidade de microrganismos pode resultar em a diminuição da eficiência do sistema.

Com o isolamento de organismos desnitrificantes foram identificados organismos do gênero *Pseudomonas*, citados como capazes de utilizarem polímeros como fonte de carbono e energia (HOWARD, 2002; GU, 2003).

O maior desgaste da espuma do leito no período final de operação do reator, quanto havia maior liberdade de movimento dos cubos de espuma de poliuretano, aliada à informação da alteração de formas cúbicas para esféricas e regulares, leva a crer que o desgaste seja resultado de ação física. Porém, o isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas* não permite excluir a possibilidade de participação de processos biológicos na degradação do leito. Deste modo, é possível que a associação de processos biológicos e da ação física tenha reduzido o volume e a massa do leito de poliuretano.

Pelas perdas de massa e volume fica evidente a necessidade de reposição de espuma do meio suporte para, com isto, evitar a redução da biomassa no reator que pode levar a diminuição da eficiência do sistema.

5.6 – Concentração de sólidos no reator

Como descrito no capítulo 4, Materiais e Métodos, amostras de sólidos aderidos foram retiradas para determinação de SST e SSV, Tabela 5.15. Observou-se que os cubos de espuma de poliuretano utilizados para imobilização da biomassa apresentaram boa capacidade de retenção de biomassa, conforme pode ser constatado pela grande quantidade de sólidos voláteis retidos.

Para se observar a diferença entre as concentrações de sólidos não devem ser utilizados como parâmetros os valores de SVT e SVA, pois a massa dos cubos de espuma diminuiu ao longo do período de operação. Desta forma, os valores que melhor representam a concentração de sólidos para efeito comparativo é a razão entre SVA e massa de espuma da amostra, Tabela 5.16.

Tabela 5.16 – Concentração de sólidos

Concentração N-amoniacoal	SVT da água de lavagem da amostra da espuma	massa da amostra da espuma	SVA no reator	Concentração de sólidos
(mg/L)	(mg/l)	(mg)	(mg/l)	$\frac{\text{mg SVA}}{\text{mg espuma}}$
125	1285	231	3632	0,6
250	2016	205	5699	1,0
500	1984	188	5608	1,1
40	1144	130	3233	0,9

Obviamente, a biomassa imobilizada nos cubos de espuma não representa toda a biomassa presente no reator, pois, além da biomassa crescida em suspensão, foi visível o crescimento e permanência de organismos ocupando o espaço entre o cesto e fundo do reator, junto à placa porosa.

Durante operação com N-afluente de 250 mg N/L, observou-se a formação de um material diferenciado que ficou acumulado na parte superior do reator. O aspecto visual era de camadas sobrepostas de material que apresenta certa elasticidade e resistência (Figura 5.36). Este fenômeno não se repetiu em nenhuma outra condição operacional.

Figura 5.36 – Lodo acumulado acima do cesto do reator
a – Aspecto geral do material acumulado na parte superior do reator, b – Observação do material por microscopia óptica, aumento 1500X.

A determinação de ST (Sólidos Totais) e SVT (Sólidos Voláteis Totais) confirmaram a expectativa de grande concentração de sólidos neste material, Tabela 5.17, e a observação microscópica mostrou grande concentração de células nesse material.

Tabela 5-17 – Sólidos presentes no lodo acumulado acima do cesto de inox do reator

Sólidos Totais (g/L)	Sólidos Voláteis Totais (g/L)
28,9	25,5

5.7 - Velocidade de remoção de nitrogênio

Para o cálculo da velocidade de utilização do substrato considerou-se o consumo de N-inorgânico como a soma das três formas de nitrogênio monitoradas : amoniacal, nitrito e nitrato, deste modo a velocidade de remoção de nitrogênio engloba as etapas de nitrificação e desnitrificação (Tabela 5.18).

Tabela 5.18 - Velocidade de remoção de nitrogênio

Etapa	Fase	N-afluente (mg/L)	OD (mg/L)	Duração do período aerado (h)	Velocidade de remoção nitrogênio (mg N/L*h)	SVA no reator (g/L)	Velocidade remoção nitrogênio (mg N/ g SVA*d)
1	-	125	2,0 a 2,5	intermitente 1h	3,9	3,6	1,1
2	-	250	2,0 a 2,5	intermitente 1h	7,4	5,7	1,3
3	1	500	2,0 a 2,5	intermitente 1h	5,3	5,6	0,9
	2		2,0 a 2,5	20 h	8,8	5,6	1,6
	3		2,0 a 2,5	intermitente 11 h	7,5	5,6	1,3
	4		4,0 a 5,0	intermitente 11 h	12,2	5,6	2,2
4	1	40	2,0 a 2,5	intermitente 1 h	2,2	3,2	0,7
	2		2,0 a 2,5	intermitente 1 h	1,8	3,2	0,5
	3		4,0 a 5,0	intermitente 1 h	4,9	3,2	1,5
	4		4,0 a 5,0	4 h	4,0	3,2	1,2

A velocidade apresentada na Etapa 3 Fase 1 e Fase 3 confirma a influencia da duração dos períodos aeróbios e anóxicos no desempenho do reator, mostrando que talvez esta velocidade seja útil para escolha da extensão destes períodos no ciclo.

Pela comparação dos valores de velocidade de remoção de nitrogênio durante as etapa 3, Fases 3 e 4, evidencia-se que a baixa concentração de oxigênio limitou a velocidade de remoção de nitrogênio na Fase 3, confirmando o que foi discutido sobre os diferentes valores de eficiência nesta fase. O que também aconteceu na Etapa 4, Fases 2 e 3.

A velocidade de remoção de nitrogênio, evidencia a importância dos parâmetros operacionais OD e duração dos períodos aeróbios e anóxicos, no desempenho do reator, deste modo, em função da concentração de nitrogênio do substrato, pode realizar testes para escolha do modo de operação, já que em todas estas condições foi possível a remoção de nitrogênio via nitrito.

A Tabela 5.19 auxilia a comparação dos valores das velocidades de remoção de nitrogênio das fases com a mesma condição operacional, exceto pela concentração de N-amoniacal.

Tabela 5.19 – Velocidade de remoção de nitrogênio durante as fases de operação do reator com aeração intermitente de 1 hora e OD entre 2 e 2,5.

Etapa	Fase	N-afluente (mg/L)	Velocidade remoção nitrogênio mg N/ g SSV
4	1	40	0,7
1	-	125	1,1
2	-	250	1,3
3	1	500	0,9

Aparentemente este modo de operação ofereceu melhor desempenho com N-afluente de 250 mg/L, indicando influencia da concentração de nitrogênio na velocidade de remoção, o que contribui para consolidar a importância desta característica do substrato na escolha do tempo de ciclo.

A velocidade de remoção de nitrogênio, como visto até agora, foi influenciada, pela concentração afluente de N-amoniacal, bem como pelos parâmetros operacionais: concentração de OD, duração do período aeróbio e duração do período anóxico, apresentando o valor mínimo 0,043 kg N-NH₄⁺/m³ /d, durante operação do reator com N-amoniacal afluente de 40 mg/L e valor máximo 0,296 kg N-NH₄⁺/m³ /d.

Sliekers *et al.* (2002) estudaram a remoção autotrófica de nitrogênio utilizando N-amoniacal e nitrito como substrato, processo denominado CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite) que tem a baixa concentração de oxigênio como fator limitante à oxidação do nitrito. Os autores relatam velocidade de remoção de nitrogênio de 0,064 kg N/m³ /d, valor próximo aos encontrados neste experimento

6 – CONCLUSÕES

Devido às várias condições em que o reator foi operado são apresentadas inicialmente as conclusões gerais e, na seqüência, são apresentados os resultados de cada etapa como na discussão dos resultados.

6.1 - Conclusões gerais

O reator mostrou-se eficiente para prover a nitrificação parcial seguida pela desnitrificação. Ao longo do período de operação, o nitrogênio na forma de nitrito tornou-se a forma oxidada predominante e foi possível manter este acúmulo de nitrito em todos os períodos aeróbios dos ciclos e durante todo o período de operação do reator.

Embora a literatura registre a possibilidade de adaptação dos organismos oxidantes de nitrito a valores de concentração de amônia livre bem maiores, comparados aos valores máximos a que estiveram submetidos os organismos neste estudo, o acúmulo de nitrito se manteve durante todos os meses de operação e os valores de concentração de nitrato foram insignificantes.

A imobilização da biomassa embora, comparada ao crescimento suspenso, possa proporcionar maior facilidade de permanência dos organismos oxidantes de nitrito no reator, não comprometeu a predominância do nitrito como a forma de nitrogênio oxidada, indicando a possibilidade de usufruir de todas as vantagens da biomassa imobilizada sem comprometer a nitrificação parcial.

Os resultados da estimativa da população das bactérias oxidantes de nitrito e de nitrogênio amoniacal, evidenciaram que, embora as condições operacionais levem

naturalmente a redução de organismos capazes de oxidar o nitrito, a ausência destes organismos não é essencial para a remoção curta de nitrogênio.

Os perfis temporais das concentrações de nitrogênio, bem como os valores de eficiência, evidenciaram a influência da concentração de OD, da duração dos períodos aeróbios e, também, da duração dos períodos anóxicos no tempo de ciclo necessário para alcançar a meta de remoção de nitrogênio.

Os perfis temporais realizados durante operação com concentração de nitrogênio amoniacal de 500 e de 40 mg/L evidenciaram que, as condições de aeração e a duração dos períodos aeróbios e anaeróbios podem reduzir ou aumentar o tempo de ciclo necessário para a remoção de nitrogênio de modo que, ensaios devem ser realizados para evitar que a concentração de oxigênio não atue como limitante na oxidação do nitrogênio amoniacal e, também, escolher um período de desnitrificação que não seja superdimensionado.

A influência da concentração afluyente de nitrogênio amoniacal ficou evidente na comparação dos valores de velocidade de remoção de nitrogênio. Durante operação do reator nas mesmas condições operacionais, OD de 2,0 a 2,5 e aeração intermitente com períodos aeróbios e anóxicos com duração de uma hora, a maior velocidade ocorreu com N-amoniacal afluyente de 250 mg/l.

A alternância dos períodos de aeração e não aeração não resultou em problemas operacionais, pois assim que a aeração era interrompida iniciava-se a desnitrificação, e quando novamente liberada reiniciava a oxidação de N-amoniacal.

6.2 - Conclusões referentes a cada etapa

As conclusões obtidas nas Etapas 1 e 2 são apresentadas em conjunto devido a sua maior similaridade operacional e, a seguir, são apresentadas as conclusões referentes às etapas de operação do reator com concentração afluyente de nitrogênio amoniacal de 500 e de 40 mg/L.

6.2.1 - Conclusões referentes às Etapas 1 e 2 – operação do reator com concentração de nitrogênio amoniacal afluyente de 125 e 250 mg N/L.

O reator mostrou-se eficiente no processo de remoção de nitrogênio durante operação com N-afluyente de 125 e 250 mg N/L, de modo que, no final do ciclo, as formas de nitrogênio monitoradas estavam abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados.

A concentração de amônia livre, concentração de oxigênio dissolvido e a razão OD/NH₃, alcançaram valores considerados inibidores, deste modo, podem ter sido responsáveis pela remoção via nitrito nas etapas 1 e 2.

Durante o ensaio para verificação da possível utilização de N-amoniacal como doador auxiliar de elétrons na remoção via nitrito, todos os reatores do ensaio apresentaram praticamente a mesma eficiência, indicando que a remoção por esta via não pôde ser quantificada, ou as condições operacionais não possibilitaram esta alternativa, ou sua velocidade é lenta o suficiente para não ser notada diante da possível fonte endógena e da matéria orgânica remanescente.

O seqüenciamento do DNA de cepas de bactérias desnitrificantes da amostra retirada durante a operação com N-amoniacal afluyente de 125 mg/L evidenciou a presença de *Acinetobacter johnsonii* das cepas isoladas da desnitrificação via nitrito e *Pseudomonas saccharophila* da cepa isolada da desnitrificação via nitrato, respectivamente.

O seqüenciamento do DNA da amostra retirada durante a operação com N-amoniacal afluyente de 250 mg/L evidenciou a presença de *Zoogloea resiniphila* para ambas as vias de desnitrificação.

Observou-se que aproximadamente 28 % dos clones analisados da amostra de DNA total retirada no final da operação com N-amoniacal afluyente de 250 mg/L, foram identificados com *Nitrosomonas europea*.

Os resultados de frequência relativa dos clones analisados indicam maior porcentagem das bactérias oxidantes de N-amoniacal a nitrito porém, não foram identificados clones de oxidantes de nitrito. Entretanto, este resultado não extingue a possibilidade da presença destes organismos no reator, apenas indica que, provavelmente, estão em menor número de acordo com os resultados da análise de NMP.

A presença de bactérias desnitrificantes aeróbias, que representaram 5% dos organismos identificados, pode ter colaborado para a baixa concentração de nitrito nos períodos aeróbios.

Durante operação do reator com nitrogênio amoniacal afluente de 125 e 250 mg/L, o perfil das concentrações das formas de nitrogênio mostrou que o tempo de ciclo adotado foi excessivo. Para a concentração inicial de 125mg/L praticamente todo o nitrogênio foi removido nas primeiras 15 horas, já para a concentração inicial de 250mg/L após 19 horas não se detectou nenhuma das formas de nitrogênio monitoradas.

O ensaio destinado a estimativa da velocidade de desnitrificação via nitrito e via nitrato evidenciou que a maior velocidade específica de desnitrificação foi observada no reator onde ocorreu a desnitrificação curta (via nitrito), indicando economia no tempo de reação.

6.2.2 - Conclusões referentes à Etapa 3 – operação do reator com concentração de nitrogênio amoniacal afluente de 500 mg N/L.

A comparação dos valores de eficiência alcançados nas fases 1, 2 e 3, evidenciou a influência dos períodos aeróbios e anóxicos no desempenho do reator, provavelmente, o tempo dedicado a desnitrificação na fase 1 foi excessivo comparado ao tempo dedicado a nitrificação, prejudicando o desempenho do reator.

A eficiência do reator na remoção de nitrogênio mostrou-se sensível à concentração de oxigênio dissolvido. Pela comparação dos valores de eficiência notou-se que a baixa concentração de oxigênio dissolvido, mantida visando a remoção via nitrito, limitou a capacidade de oxidação de N-amoniacal.

Maiores concentrações de OD proporcionaram maior eficiência sem comprometer a remoção de nitrogênio via nitrito evidenciando que, nestas condições operacionais, a baixa concentração de oxigênio dissolvido não se mostrou como fator essencial para a remoção curta de nitrogênio via nitrito.

A remoção curta de nitrogênio via nitrito foi estável mesmo com 20 horas contínuas de aeração, indicando que o curto período de aeração não é essencial para a remoção curta

de nitrogênio.

A elevada concentração de OD e o longo período de aeração indicam que, a concentração de amônia livre pode ter sido responsável pela remoção via nitrito durante operação com N-amoniaco afluente de 500 mg/L.

6.2.3 - Conclusões referentes à Etapa 4 – operação do reator com concentração de nitrogênio amoniacal afluente de 40 mg N/L.

A operação com N-amoniaco de 40 mg/L evidenciou que, mesmo operando o reator com baixas concentrações de amônia livre e concentrações de oxigênio dissolvido maiores que as recomendadas na literatura para a remoção via nitrito, é difícil recuperar a atividade das bactérias oxidantes de nitrito.

Nas Fases 1 e 2, tanto a baixa concentração de oxigênio, a concentração de amônia livre, a razão OD/NH₃ e o curto período de aeração podem ter sido responsáveis pela remoção via nitrito.

Já para a Fase 3, a concentração de OD foi mais alta, apenas no início do ciclo a concentração de amônia livre atingiu níveis que podem ser considerados inibidores e, mesmo assim, não se observou adaptação dos organismos com perda do acúmulo de nitrito.

Para a Fase 4, além da alta concentração de OD, da baixa concentração de N-amoniaco, da alta razão OD/NH₃ o reator foi operado com período de aeração longo, mesmo assim manteve-se a remoção de nitrogênio via nitrito. Esta rota pode ter sido favorecida, ou pelas características geométricas do reator ou pela seleção de organismos que possibilitaram esta via, embora, o pequeno aumento da concentração de nitrato talvez indique a possibilidade de recuperação da capacidade de oxidação de nitrito a nitrato.

7 – SUGESTÕES

Como sugestões para trabalhos futuros propõe-se investigar:

A formação de óxido nítrico nos períodos aerados do reator, principalmente quando este é operado com baixa concentração de oxigênio dissolvido.

A perda de nitrogênio na forma de amônia livre, principalmente quando o reator opera com alta concentração de nitrogênio amoniacal e elevado pH.

A perda de massa e volume dos cubos de espuma de poliuretano utilizado como meio suporte para imobilização da biomassa.

Estudar a formação do material, aparentemente polimérico, que apareceu durante a operação do reator com concentração de N-amoniacal afluyente de 250 mg N/L

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELING, U.; SEYFRIED, C. F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater. Nitrogen removal via nitrite. *Water Science Technology*, v.26, n.5-6, p.1007-1015.

AESoy, A.; ODEGAARD, H.; BACH, K.; PUJOL, R.; HAMON, M. (1998). Denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR)- Experiments with different carbon source. *Water Research*, v. 32, n. 5, p. 1463-1470.

ALEXANDER, M. (1982) Most Probable Number Method for Microbial Populations. In: Page, A, Lee, Miller, RH, Keeney, DR. Chemical and microbiological properties. Wisconsin: American Society of Agronomy, p.815-830.

AL-GHUSAIN, I.; HUANG, J.; HAO, O.; LIM, B. S. (1994). Using pH as a real-time control parameter for wastewater treatment and sludge digestion processes. *Water Science and Technology*, v. 30, n. 4, p. 159-168.

AL-GHUSAIN, I.; HAMODA, M. F.; EL – GHANY, MOHAMED ABD. (2002). Nitrogen transformations during aerobic/anoxic sludge digestion. *Bioresource Technology*, v. 85, p. 147-154.

ALICIAN, V. Q. (1986). Optimum temperature shift for nitrobacter winogradskyi, effect of dissolved oxygen and nitrite concentration. *Water Research*, v. 20. n 5, p. 611-617

ANGENENT L.T. AND DAGUE R.R. (1995). A Laboratory-Scale Comparison of the UASB and ASBR Processes. In: 50th Purdue Ind. Waste Conference Proceedings, Ann Arbor Press, Chelsea, Michigan, p. 365-377.

ANTHONISEN, A. C., LOEHR, R. C., PRAKASAM, T. B. S. SRINATH, E. G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF*, v. 48, n. 5, p. 835-852.

APHA; AWWA; WPCF (1998). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 19th. Ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington DC, USA.

BAE, W., BAEK, S., CHUNG, J., LEE, Y. (2002). Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation*, v.12, p.359-366.

BARNES, D.; BLISS, P. J. (1983). Biological control of nitrogen in wastewater treatment. Cambridge, Great Britain.

BÉLINI F.; MARTINEZ, J. (2002) Nitrogen transformations during biological aerobic treatment of pig slurry: effect of intermittent aeration on nitrous oxide emissions. *Bioresource Technology*, n. 83, p. 225-228

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. (1994). Holt, J.G. *et al.* ed. Williams & Wilkins. USA.

BOSMA, T. N. P.; MIDDELDORP, P. J. M.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A. J. B. (1997). Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environment Science Technology*, v. 31, p. 248-252.

ÇEÇEN, F. (1996). Investigation of partial and full nitrification characteristics of fertilizer wastewater in a submerged biofilm reactor. *Water Science Technology*. v 34, n. 11, p. 77-85.

CERVANTES, F. J.; DE LA ROSA, D.; GÓMEZ, J. (2001). Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresource Technology*. v. 79, p. 165-170.

CIUDAD, G.; RUBILAR, O.; MUÑOZ, P.; RUIZ, G.; CHAMY, R.; VERGARA, C.; JEISON, D. (2005). Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1715-1719.

COSTA, C.; DIJKEMA, C.; FRIEDRICH, M.; GARCÍA-ENCINA, P.; FERNÁNDEZ-POLANCO, F.; STAMS, A. J. M. (2000). Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Appl. Microbiol Biotechnol.* v 53. p. 754-762.

CUBAS, S. A.; FORESTI, E.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. (2001). Influence of the liquid-phase mass transfer on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass. 9th world Congress Anaerobic Digestion. Anaerobic Conversion for sustainability. Antwerpen – Belgium. p 847-852.

DABERT, P.; SIALVE, B., DELGENÈS, J-P; MOLETTA, R.; GODON, J-J. (2001). Characterization of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl. Microbiol. Biotech.* v. 55, p. 500-509.

DILALLO, R. & ALBERTSON, O.E. (1961) Volatile Acids by Direct Tritation. *Journal WPCF*, n. 33, p. 356-365.

ETCHEBEHERE, C.; ERRAZQUIN, I.; BARRANDEGUY, E.; DABERT, P.; MOLETTA, R.; MUXI, L. (2001). Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *Microbiology Ecology*, v. 35, p. 259-265.

FORD, D. L.; CHURCHWELL, J. (1980). Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewater. *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 52, n 11, p. 2726-2746.

FOCHT, DD, JOSEPH, H. (1973). An Improved Methods for the Enumeration of Denitrifying Bacteria. *Soil Science Society Of America* **37**: 698-699.

GARRIDO, J. M.; VAN BENTHUM, W. A. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. (1996). Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 53, p. 168-178.

GEE, C. S.; KIM, J. S. (2004). Nitrite accumulation followed by denitrification using sequencing batch reactor. *Water Science and technology*, v. 49, n. 5-6, p. 47-55.

GIESEKE, A.; ARNZ, P.; AMANN, R.; SCHRAMM, A. (2002). Simultaneous P and N removal in a sequencing batch biofilm reactor: insights from reactor - and microscale investigation. *Water Research*, v. 36, p. 501-509.

GLASS, C.; SILVERSTEIN, J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research*, v. 32, n. 3, p.831-839.

GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA- based microbial community composition. *Appl. and Environm. Microbiol.*, **66**: 5488-5491.

GU, J. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 52, p. 69-91.

HAGOPIAN, D. S.; RILEY, J. G. (1998). A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural engineering*, v. 18, p 223-244.

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

HAO, O.; HUANG, J. (1996). alternating aerobic-anoxic process for nitrogen removal: process evaluation. *Water Environment Research*, v. 68, n. 1, p 83-93.

HIRL, R.J.; IRVINE, R.L. (1996). Reductive dechlorination of perchloroethylene (PCE) using anaerobic sequencing batch biofilm reactors (ASBR). IN: 51st Purdue Ind. Waste Conference Proceedings, Ann Arbor Press, Chelsea, Michigan, p. 289 – 295.

HOUBRON, E.; TORRIJOS, M.; CAPDEVILLE, B. (1999). An alternative use of biogas applied at the water denitrification. *Water Science Technology*, v. 40, n. 8, p. 115-122.

- HOWARD, G. T. (2002). Biodegradation of polyurethane: a review. *International biodeterioration and biodegradation*, v. 49, p 245-252.
- HWANG, B.; HWANG, K.; CHOI, E.; CHOI, D.; JUNG, J. (2000). Enhanced nitrite build-up in proportion to increasing alkalinity/NH₄ ratio of influent in biofilm reactor. *Biotechnology Letters*, n. 22, p. 1287 - 1290.
- IRVINE, R. L.; BUSCH, A. W. (1979). Sequencing batch biological reactors- an overview. *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 51, n. 2, p 235-243.
- IRVINE, R. L.; MILLER, G.; BHAMRAH, A. S. (1979). Sequencing batch treatment of wastewater in rural areas. *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 51, n 2, p 244-253.
- ITOKAWA, H.; HANAKI, K.; MATSUO, T. (2001) Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. *Water Research*, v. 35, n. 3, p. 657-664.
- JETTEN, M. S. M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; SCHALK, J.; VAN DONGEN, U. G. J. M.; VAN DE GRAAF, A. A.; LONEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; KUENEN, J. G. (1999). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, n. 22, p. 421-437.
- JIANLONG, W.; NING, Y. (2003). Partial nitrification under limited dissolved oxygen condition. *Process biochemistry*, v. 39, n. 1, p. 1223-1229.
- JUN, B.; TANJI, Y.; UNNO, H. (2000). Stimulating accumulation of nitrifying bacteria in porous carrier by addition of inorganic carbon in a continuous-flow fluidized bed wastewater treatment reactor. *Journal Bioscience and Bioengineering*, v. 89, p. 334-339.
- KATSOGIANNIS, A. N., KORNAROS, M, LYBERATOS, G. (2003) Enhanced nitrogen removal in SBRs bypassing nitrate generation accomplished by multiple aerobic/ anoxic phase pairs. *Water Science Technology*, v.47, n.11, p.53-59.
- KOTLAR, E.; TARTAKOVSKY, B.; ARGAMAN, Y.; SHEINTUCH, M. (1996). The nature of interaction between immobilized nitrification and denitrification bacteria. *Journal of biotechnology*, n. 51, p. 251-258.
- KUBA, T., SMOLDERS, G., LOOSDRECHT, M.C.M. VAN, HEIJNEN, J.J. (1993). Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic- anoxic sequencing batch reactor. *Water Science. Technology*, v. 27, p. 241-252.
- MERZOUKI, M.; DELGENÈS, J-P; BERNET, N.; MOLETTA, R.; BENLEMLIH, M. (1999). Polyphosphate –accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Current Microbiology*, n. 38, p. 9-17.

METCALF & EDDY inc. *Wastewater engineering: Treatment, disposal and reuse*. (1991). Singapore: McGraw Hill International Editions: 3rd ed.

MULDER, J. W., VAN KEMPEN, R. (1997) N-removal by SHARON. *Water Quality International*, n. 2, p. 30-31

MULLER, E. B.; STOUTHAMER, A. H.; VAN VERSEVELD, H. W. (1995). Simultaneous NH₃ oxidation and N₂ production at reduced O₂ tensions by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium. *Biodegradation*, n. 6, p. 339-349.

NYBERG, U.; ANDERSSON, B.; ASPEGREN, H. (1996). Long-term experiences with external source for nitrogen removal. *WaterScience Technology*, n.33, 109-116.

NOGUEIRA, R.; MELO, L. F.; PURKHOLD, U.; WUERTZ, S.; WAGNER, M. (2002). Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Research*, v. 36, p. 469-481.

OKAYASU, Y.; ABE, I.; MATSUO, Y. (1997) Emission of nitrous oxide from high-rate nitrification and denitrification by mixed liquor circulation process and sequencing batch reactor process. *Water Science and technology*, v. 36, n. 12, p. 39-45.

PEDDIE, C. C.; MAVINIC, D. S.; JENKINS, J. C. (1990) Use of ORP for monitoring and control of anaerobic sludge digestion. *Journal of Environmental Engineering*, v. 116, n. 3, p. 461 - 471

POLANCO, F.; VILLAVERDE, S.; GARCIA, P. A. (1996). Nitrite accumulation in submerged biofilters – combined effects. *Water Science and Technology*, v. 34, n. 3-4, p. 371-378.

PRINCIC, A.; MAHNE, I.; MEGUSAR, F.; PAUL, E. A.; TIEDJE, J. M. (1998). Effect of pH and oxygen and ammonium concentration on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 10, p. 3584-3590

RA, C. S., LO, K. V., SHIN, J. S., OH, J. S., HONG, B. J. (2000). Biological nutrient removal with an internal organic carbon source in piggery wastewater treatment. *Water Research*, v.34, n.3, p.965-973.

RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; CAMARGO, E. F. M.; ZAIAT, M.; BORZANI, W. (2000). Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 75, 127-132.

RHEE, S.; LEE, J. J.; LEE, S. (1997). Nitrite accumulation in a sequencing batch reactor during the aerobic phase of biological nitrogen removal. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 2, p. 195-198.

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

RUIZ, G., JEISON, D., CHAMY, R. (2003). Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research*, v.37, p.1371-1377.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. (1986) Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. *Journal WPCF*, n. 58, p 406-411.

SASAKI, K.; YAMAMOTO, Y.; TSUMURA, K.; OUCHI, S.; MORI, Y. (1996). Development of 2-reactor intermittent-aeration activated sludge process for simultaneous removal of nitrogen and phosphorus. *Water Science and technology*, v. 34, n. 1-2, p 111-118.

SCHMIDT, E. L.; BELSER, L. W. nitrifying bacteria. In: Page, A. Lee; Miller, R. H.; KEENEY, D. R. (1984). Chemical and microbiological properties. American society of agronomy. Soil Science Society of America, Wisconsin, USA.

SLIEKERS A. O.; DERWORT N.; GOMEZ, J. L. C.; STROUS, M.; KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. M. (2002). Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Research*, v 36, p. 2475–2482

STROTMANN, U. J.; WINDECKER, G. (1997). Kinetics of ammonium removal with suspended and immobilized nitrifying bacteria in different reactor systems. *Chemosphere*, v. 35, n.12, p. 2939-2952.

SO, C.; Young, L. Y. (1999). Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, v 65, p. 2969-2976.

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

SURMACZ-GÓRSKA, J.; CICHON A.; J.;MIKSCH, K. (1997). Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification. *Water Science Technology*, v. 36, n. 10, p. 73-78.

SUZUKI, I.; DULAR, U.; KWORK, S.C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *Journal of Bacteriology*, v. 120, p. 556-558.

TIEDJE, J.M. (1982). Denitrification. In: Page, A. Lee; Miller, R. H.; Keeney, D. R. Chemical and microbiological properties. Wisconsin: American Society of Agronomy, p.815-830.

TURK, O.; MAVINIC, D. (1989). Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Water Resource*, v. 23, n. 11, p. 1383-1388.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; JETTEN, M. S. M. (1998). Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Science Technology*, v. 38, n. 1, p. 1-7.

VILLAVERDE, S.; GARCIA-ENCINA, P. A.; LACALLE, M. L.; FERNANDEZ-POLANCO, F. (2000) New operational strategy for SBR technology for total nitrogen removal from industrial wastewaters highly loaded with nitrogen. *Water Science Technology*, v.41, n.12, p. 85-93.

POLLICE, A.; TANDOI, V.; LESTINGI, C. (2002). Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water Research*, 36, p. 2541-2546.

WAGNER, M.; ERHART, R.; MANZ, W.; AMMAN, R.; LEMMER, H. WEDI, D.; SCHLEIFER, K.H. (1994). Development of an rRNA- targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Applied and Environment Microbiology*, v. 60, n. 3, p. 792-800.

WAREHAM, D. G.; MAVINIC, D. S.; HALL, K. (1994). Sludge digestion using ORP-regulated aerobic-anoxic cycles. *Water Resource*, v. 28, n. 2, p. 373-384.

WIESMANN, U. (1994). *Biological nitrogen removal from wastewater*. In: Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 51, A. Fiechter(ed). Berlin,, NY: Springer-Verlag,. p.113-154.

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

YOSHINARI, T.; KNOWLES, R.(1976) Acetylene Inibition of Nitrous Oxide Reduction by Denitrifying Bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, n.69, p. 705-710.

ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. (1994) Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho; *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Química*, v.11, n. 2, p. 33-42.

ZHAO, H. W.; MAVINIC, D. S.; OLDHAM, W. K.; KOCH, F. A. (1999). Controlling factors for simultaneous nitrification and denitrification in two-stage intermittent aeration process treating domestic sewage. *Water Resource Technology*, v. 33, n. 4, p. 961-970.