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

JÉSSICA COSTA LOPES

**Desempenho de reator de leito estruturado submetido à aeração
intermitente, na remoção de nitrogênio e fósforo de esgoto sanitário
utilizando glicerol fermentado como fonte de carbono**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos - SP

2017

JÉSSICA COSTA LOPES

**Desempenho de reator de leito estruturado submetido à aeração
intermitente, na remoção de nitrogênio e fósforo de esgoto sanitário
utilizando glicerol fermentado como fonte de carbono**

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

Orientador: Prof. Tit. Eugênio Foresti

São Carlos

2017

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

L864d Lopes, Jéssica Costa
Desempenho de reator e leito estruturado submetido à aeração intermitente, na remoção de nitrogênio e fósforo de esgoto sanitário utilizando glicerol fermentado como fonte de carbono / Jéssica Costa Lopes; orientador Eugênio Foresti. São Carlos, 2017.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Desnitrificação. 2. remoção biológica de fósforo. 3. glicerol. 4. relação C/N. 5. fermentação. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharela **JÉSSICA COSTA LOPES.**

Título da dissertação: "Desempenho de reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente, na remoção de nitrogênio e fósforo de esgoto sanitário utilizando glicerol fermentado como fonte de carbono"

Data da defesa: 16/05/2017.

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovada

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

APROVADA

Prof. Dr. **Ariovaldo José da Silva**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

APROVADA

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

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

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Dedico este trabalho à minha querida avó Ana Fernandes (in memoriam) por sempre acreditar em mim, me incentivar nas escolhas do futuro, por todos os ensinamentos e por ser uma matriarca inspiradora para família.

AGRADECIMENTO

A Deus, por sempre abençoar as minhas decisões e me estimular a viver buscando sempre o bem e me proporcionando saúde.

Ao meu pai Valter, por ser minha grande inspiração e meu motor de sempre busca algo melhor para nossa família, como forma de agradecimento por tudo que ele já fez.

À minha mãe Delma, pela educação, pela determinação, pela disciplina em tudo que faz e por sempre incentivar a acreditar em nós mesmos e pela formação do meu caráter. Como também, pelo carinho, atenção e companheirismo em vários momentos de minha vida.

Às minha irmãs Fabiane e Fernanda, por serem minha referência de vida e profissionalismo. Vocês são meus exemplos para buscar o melhor sempre. Também pela amizade e irmandade sempre presente. Em todos os momentos preocupadas com o meu bem, sendo como outras mães na minha vida.

Ao meu grande amor Allan, melhor amigo e maior incentivador em todas as oportunidades que apareceram na minha vida e mesmo que a insegurança estava ao meu lado, foi capaz de arranca-la acreditando que eu era capaz. Em nenhum momento nesta caminhada, mesmo com a distância, deixou de acreditar em nós, o que me torna cada vez mais realizada tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Amo você por ser exatamente como é, meu orgulho.

Ao meu orientador Prof. Eugenio Foresti, por todo ensinamento não somente profissional, como também pessoal. Obrigada por ser uma pessoa tão acolhedora, querida, prestativa e preocupada. Você é um ser humano incrível que com toda certeza irei me inspirar na minha carreira profissional. Minha admiração por você é cada vez maior.

À Prof^a Márcia Damianovic pela participação em vários momentos da pesquisa, com sugestões de grande relevância e empolgação magnífica com meu projeto, não me deixando desanimar quando os problemas apareciam.

Ao Prof. Júlio César Gonçalves e à professora Ariana Campos pela iniciação na vida científica e incentivo à carreira acadêmica.

À Carlinha, ao Rodrigo, ao Leandro e à Renata pelos ensinamentos no laboratório, pelas trocas de informações, pela preocupação com meu projeto, por abdicarem o tempo de vocês para me auxiliar em análises e soluções de problemas e por me estimularem sempre a encontrar uma alternativa de melhoria na pesquisa. À atenção de vocês comigo, não há como agradecer, são pessoas que levarei como exemplo sempre.

Aos amigos do tempo de escola Fernanda, Camilla, Gabriela, Mayara e Taciano pelos grandes momentos compartilhados por toda essa vida que vivenciamos juntos e por sempre ouvirem minhas preocupações com o reator.

Às amigas de faculdade Andreza, Bárbara e Larissa, que se tornam irmãs em São Carlos, ao amadurecermos juntas, dividindo o mesmo teto no nosso “Lar doce lar. Só nós sabemos o quanto essa caminhada longe de casa foi difícil para cada uma e q nós fomos o alicerce fundamental para conseguirmos concluir essa caminhada. Obrigada por todos os momentos de

risadas, de artes na cozinha e por toda a cumplicidade que só a convivência diária pode proporcionar a uma amizade.

Aos amigos do mestrado Alejandra, André, Carol Granatto, Elias, Inaê, Jéssica Soares, Julliana Mirian, Leonardo (obrigada por me salvar de todos os apuros no laboratório, haha), Mayara, Moara, Pamela, Raíssa, Sayuri, Tainá, Wesley. Foi muito importante poder contar com a amizade de vocês nesses 2 anos.

Obrigada especial para a Mariê, “minha IC”, que mais me ensinou que aprendeu, haha! Muito obrigada pelo carinho, amizade, troca de experiências de vida, gordices, risadas, desesperos e caronas. Você sabe que já faz parte da família e nosso início juntas foi fundamental para o amadurecimento do projeto. Amo você!

Aos demais companheiros de trabalho no LPB Alana, Ana Flávia, Bruno Giz, Camila, Carol Gil, Cristiane, Drica, Elis, Fabrício, Fiaz, Gui Oliveira, Inês, Juliana Kawanishi, Laís, Lili, Lucas, Mirabelle, Marcus Vinícius, Rachel, Rogério, Vanessa, Thais, Vinicius, Vivian.

Aos técnicos do Laboratório de Processos Biológicos, pelo auxílio com análises e experimentos: Carol Sabatini, Elô Pozzi, Janja e Isabel.

Aos funcionários do prédio da Engenharia Ambiental: Andréia, Fátima, Fernando, Silvana, Seu Edson e Seu Antônio.

À Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento. Ao corpo técnico e administrativo do departamento: Sá, Priscila, Rose e Lú.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”. (Paulo Beleki)

RESUMO

LOPES, J.C. **Desempenho de reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente, na remoção de nitrogênio e fósforo de esgoto sanitário utilizando glicerol fermentado como fonte de carbono.** 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Este trabalho buscou verificar a viabilidade do uso de fermentado de glicerol como fonte externa de carbono para a remoção biológica de nutrientes em um reator de leito estruturado, submetido à aeração intermitente (LEAI). O LEAI foi alimentado com efluente de reator UASB de bancada, usado no tratamento de esgoto sanitário. O reator LEAI possuía volume total de 12,3L e, devido às hastes cilíndricas verticais de espuma de poliuretano usadas como suporte para a biomassa, o volume útil foi de 8,6 L. Inicialmente, o reator foi operado sob aeração contínua com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas e razão de recirculação de efluente igual a 3 para desenvolvimento de biomassa nitrificante no reator. Após a eficiência de nitrificação atingir 80%, o reator passou a ser operado com TDH de 12 horas e sob aeração intermitente, mantendo-se a razão de recirculação igual a 3. Foram então realizadas 4 fases em modo contínuo sob aeração intermitente (tempo de aeração/tempo sem aeração) de 2h/1h sem glicerol, 3h/1h sem glicerol, 2h/1h com glicerol, 3h/1h com glicerol. A adição de glicerol fermentado ocorreu somente durante os períodos não aerados. Em todas as fases, a DQO média efluente ao sistema variou entre 26 ± 8 e 59 ± 14 mg.L⁻¹. Em relação à remoção de nitrogênio total (como NTK), verificou-se a baixa eficiência de remoção nas fases em que não houve a adição do fermentado, atingindo $49,6 \pm 13,5\%$ (2h/1h) e $29,2 \pm 10,1\%$ (3h/1h). Entretanto, nas fases em que houve a inserção do glicerol, as eficiências de remoção de N-total foram superiores, obtendo-se $64,9 \pm 21,6\%$ (2h/1h) e $69,5 \pm 11,7\%$ (3h/1h). Não foi observada remoção de fósforo em nenhuma das fases em que o reator foi operado com alimentação contínua. A fim de verificar a eficácia do fermentado de glicerol na remoção de N e P, o sistema foi modificado para que o reator LEAI operasse em bateladas sequenciais (RSB). Nessa etapa da pesquisa, observou-se o estabelecimento da comunidade acumuladora de fósforo no sistema, obtendo-se eficiência de remoção de fósforo de $56,1 \pm 8,5\%$. A eficiência de remoção de nitrogênio total também aumentou, atingindo $86,2 \pm 6,2\%$. Concluiu-se que o fermentado do glicerol apresenta potencial significativo para uso como fonte exógena de carbono no processo de remoção de fósforo e N-total. Concluiu-se também que, embora o glicerol fermentado contenha compostos favoráveis à remoção de fósforo em reatores de leito

estruturado, a alimentação contínua do reator com aeração intermitente, não promove as condições ideais para o estabelecimento de processo estável de remoção de fósforo. No entanto, a elevada eficiência de oxidação de NTK, de remoção de matéria orgânica e de desnitrificação, aliadas à baixa produção sólida, mostram que o LEAI é uma alternativa interessante em comparação às tecnologias praticadas atualmente para pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Contudo, quando a remoção de fósforo é necessária, a operação do reator em bateladas sequenciais é a alternativa viável.

PALAVRAS-CHAVE: Desnitrificação, remoção biológica de fósforo, relação DQO/N, relação C/P, fermentação.

ABSTRACT

LOPES, J.C. **Performance of a structured bed reactor subjected to intermittent aeration in the removal of nitrogen and phosphorus from sewage using fermented glycerol as carbon source.** 2017. 114 f. Dissertation (Master's Degree) – School of Engineering in São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2017.

This work aimed to verify the viability of the use of fermented glycerol as an external carbon source for the nutrient biological removal in structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). The SBRRIA was fed effluent from UASB reactor bench scale, used in the treatment of domestic sewage. The SBRRIA reactor had a total volume of 12.3L and, due to the vertical cylindrical strips of polyurethane foam used as biomass support, the useful volume was 8.6 L. Initially, the reactor was operated under continuous aeration with hydraulic retention time (HRT) of 24 hours and effluent recirculation ratio of 3 for the development of nitrifying biomass in the reactor. After the nitrification efficiency reach 80%, the reactor started to be operated at the HRT of 12 h under intermittent aeration, maintaining the recirculation ratio equal to 3. Four phases were then carried out continuously under intermittent aeration (aeration / time without aeration) of 2h / 1h without glycerol, 3h / 1h without glycerol, 2h / 1h with glycerol, 3h / 1h with glycerol. The addition of fermented glycerol occurred only during time without aeration. In all phases, the average COD effluent of the system ranged between 26 ± 8 and 59 ± 14 mg.L⁻¹. Low removal efficiency of total nitrogen (as TKN) was verified in the phases without addition of the fermented glycerol, reaching $49.6 \pm 13.5\%$ (2h / 1h) and $29.2 \pm 10.1\%$ (3h / 1h). However, the efficiency of total nitrogen removal efficiency was higher when fermented glycerol was added during the non-aerated period, attaining $64.9 \pm 21.6\%$ (2h / 1h) and $69.5 \pm 11.7\%$ (3h / 1h). No phosphorus removal was observed in any of the previous phases in which the reactor was operated under continuous feeding. In order to verify the feasibility of fermented glycerol in the removal of N and P, the system was modified so that the LEAI reactor operated in sequential batch mode (SRB). At this stage of the research, the establishment of the phosphorus accumulating community in the system was observed and phosphorus removal efficiency attained $56.1 \pm 8.5\%$. The efficiency of total nitrogen removal also increased up to $86.2 \pm 6.2\%$. It was concluded that the fermented glycerol presents significant potential for use as an exogenous carbon source in the process of phosphorus and nitrogen removal. It can be also concluded that fixed bed reactors can remove phosphorus from wastewaters using fermented glycerol presenting compounds favorable to the development of phosphorus accumulating

microorganisms (PAO). However, reactors subjected to continuous feeding and intermittent aeration do not promote good conditions for the establishment of stable phosphorus removal process. Nevertheless, the high efficiency of TKN oxidation, organic matter removal and denitrification, coupled with low solid production, show that SBRRIA is an interesting alternative for the post-treatment of anaerobic reactor effluents. However, when phosphorus removal is required, sequential batch reactor operation is the viable alternative.

KEYWORDS: Denitrification, biological phosphorus removal, C/N ratio, C/P ratio, fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conversões possíveis entre os compostos nitrogenados.....	28
Figura 2 - Representação do biofilme com gradiente de oxigênio formando zonas aeradas e anóxicas.	34
Figura 3 - Variação da concentração de fosfato e matéria orgânica no efluente, em um tratamento biológico anaeróbico seguido de aeróbico	37
Figura 4 - Glicerol como co-produto em processos.	38
Figura 5 - Rotas metabólicas do glicerol.	40
Figura 6 - Esquema representativo do sistema UASB + LEIA.	43
Figura 7 - Reator UASB (direita) seguido do reator LEAI (esquerda).	45
Figura 8 - Fluxograma experimental do LEAI.	52
Figura 9 - Concentrações de N-amoniacal, N-nitrato e N-nitrito durante a etapa de adaptação.	58
Figura 10 - Variação da concentração de N-total afluente, efluente e eficiência de remoção durante as fases experimentais operadas em modo contínuo.	59
Figura 11 - Variação da concentração de NTK afluente, efluente e eficiência de oxidação....	61
Figura 12 - Composição do efluente do LEAI e remoção de N-total ao longo do procedimento experimental.	64
Figura 13 - Variação da concentração de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção. ...	65
Figura 14 - Comportamento do composto fósforo ao longo de todo período operacional.....	67
Figura 15 - Perfil do reator sob condição de duas horas aerando e uma hora sem aerar.....	69
Figura 16 - Perfil do reator sob condição de três horas aerando e uma hora sem aerar.	71
Figura 17 - Variação da concentração de N-total afluente, efluente e eficiência de remoção durante a operação em batelada sequencial.	73
Figura 18 - Variação da concentração de NTK afluente, efluente e eficiência de oxidação para RSB.....	74
Figura 19 - Composição do efluente do RSB e remoção de N-total.	75
Figura 20 - Variação da concentração de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção no RSB.....	76
Figura 21 - Remoção do fósforo e eficiência de remoção na 6ª fase operacional.	77
Figura 22 - Perfil do reator operando em batelada sequencial.	79
Figura 23 - Gráfico Box-plot da distribuição da eficiência de remoção de N-total em todas as fases experimentais.	84

Figura 24 - Gráfico Box-plot da distribuição da eficiência de desnitrificação em todas as condições operacionais.....	85
Figura 25 - Gráfico Box-plot da distribuição da eficiência de remoção de DQO.	86
Figura 26 - Gráfico Box-plot da distribuição da eficiência de remoção de fósforo.....	86
Figura 27 - Imagens da microscopia óptica realizada na fase V: (a) emaranhado de bactérias filamentosas; (b) <i>Zoogléia sp.</i> ; (c) Bacilos; (d) cocos.....	88
Figura 28 - Imagens da microscopia óptica realizada na Fase VI: (a) bactérias filamentosas; (b) detalhamento do acúmulo de elementos no interior das filamentosas; (c) <i>Zoogléia sp.</i> ; (d) protozoários da classe rotífera.	90
Figura 29 - Imagens da microscopia óptica após aplicação da técnica Coloração de Neisser realizada na fase V: (a) e (b) destaque para Neisser negativo; (c) e (d) destaque para Neisser positivo.	91
Figura 30 - Imagens da microscopia óptica após aplicação da técnica Coloração de Neisser realizada na fase VI: (a) e (b) destaque para tetrades acumuladores de Poli-p; (c) e (d) destaque para cocos acumuladores de Poli-P.	92
Figura 31 - Imagens da microscopia óptica após aplicação da Coloração de PHB realizada na fase V: (a) e (b) destaque para Coloração de PHB positiva; (c) e (d) organismos negativos e positivos para coloração de PHB.	93
Figura 32 - Imagens da microscopia óptica após aplicação da Coloração de PHB realizada na fase VI: (a) e (b) destaque para Coloração de PHB positiva; (c) e (d) organismos negativos e positivos para coloração de PHB.	94
Figura 33 - Ensaio 1 para o decaimento de 20 g.L ⁻¹ de glicerol.	109
Figura 34 - Ensaio 2 para o decaimento de 20g.L ⁻¹ de glicerol.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relações DQO/N para desnitrificação.	33
Tabela 2 - Características físicas dos reatores biológicos.	44
Tabela 3 - Valores médios dos parâmetros do esgoto sanitário coletado próximo ao Campus II, USP-São Carlos.	46
Tabela 4 - Caracterização do fermentado de glicerol.	47
Tabela 5 - Característica da espuma de poliuretano.	48
Tabela 6 - Condições de aeração e não aeração operados no reator LEAI.	49
Tabela 7 - Condição de operação do RSB na sexta fase de operação do reator.	50
Tabela 8 - Periodicidade das análises do sistema.	53
Tabela 9 - Relação DQO/N, concentrações médias de N-total afluente e efluente e eficiência de remoção de N-total ao longo do período experimental.	59
Tabela 10 - Variações das concentrações de NTK e NH_4^+ afluente, efluente e eficiência de oxidação de NTK.	63
Tabela 11 - Teores de NO_2^- e de NO_3^- e eficiência de nitrificação e de desnitrificação.	63
Tabela 12 - Variações das concentrações de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção.	66
Tabela 13 - Relação DQO/N, concentrações médias de N-total afluente e efluente e eficiência de remoção de N-total ao longo da operação em bateladas sequenciais.	73
Tabela 14 - Concentrações médias de N-total afluente e efluente e eficiência de oxidação de NTK ao longo da operação em bateladas sequenciais.	75
Tabela 15 - Variações das concentrações de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção no RSB.	76
Tabela 16 - Valores médios de pH e alcalinidade em cada período operacional.	80
Tabela 17 - Balanço de massa referente à alcalinidade consumida e gerada em cada fase.	81
Tabela 18 - Concentração média de ST, STV, STF em todas as fases experimentais.	82
Tabela 19 - Concentração média de SST, SSV, SSF em todas as fases experimentais.	82
Tabela 20 - Diferença estatística entre as eficiências de remoção de N-total, de fósforo e DQO.	87
Tabela 21 - Composição do meio de macronutrientes para a batelada do glicerol.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anammox	Anaerobic Ammonium Oxidation
AGV	Ácidos graxos voláteis
AI	Aeração intermitente
APHA	<i>American public health association</i>
AT	Alcalinidade total
ATP	Adenosina trifosfato
AVT	Ácidos voláteis totais
BOA	Bactérias oxidadoras de amônio
BON	Bactérias oxidadoras de nitrogênio
CoA	Coenzima-A
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EPA	Environmental Protection Agency
EQ.	Equação
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
GOH	Glicerol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LEAI	Leito estruturado com aeração intermitente
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
NDS	Nitrificação e Desnitrificação Simultânea
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
OD	Oxigênio Dissolvido
PA	Pureza analítica
PDO	1,3-propanediol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHB	Polihidroxibutirato
Poli-P	Polifosfato
PT	Fósforo Total.
Q _A	Vazão de alimentação

RSB	Reator sequencial em batelada
S_0	Concentração afluenta
SHS	Departamento de Hidráulica e Saneamento
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TRC	Tempo de retenção Celular
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

k'_0	Constante cinética específica do modelo de ordem zero
cm	Centímetro
R^2	Coeficiente de correlação
M	Concentração molar
d	Dia
g	Grama
°C	Graus Celsius
h	Hora
μm	Micrômetro
W	Massa de NO _x por massa de SSV
C_0	Massa inicial de NO _x por massa de SSV
m	metro
mg	miligrama
min	minuto
N-NH ₄ ⁺	Representa a massa de nitrogênio em amônia.
N-NO ₂ ⁻	Representa a massa de nitrogênio em nitrito.
N-NO ₃ ⁻	Representa a massa de nitrogênio em nitrato.
N-org	Representa a massa de nitrogênio em compostos orgânicos da amostra.
kg	Quilograma
F/M	Relação alimento/microrganismo
C/N	Relação carbono/nitrogênio
DQO/N	Relação DQO/nitrogênio
rpm	Rotações por minuto
pH	Potencial Hidrogeniônico
t	tempo
θ_c	Tempo de retenção celular ou idade do lodo
t_0	Tempo inicial
Q_A	Vazão de alimentação
S_0	Concentração afluente
Q_R	Vazão de recirculação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVO	25
2.1 Objetivo principal	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 Fontes e formas de nutrientes em efluente sanitário.....	26
3.2 Sistemas de remoção biológica de nitrogênio	27
3.2.1 Nitrificação e Desnitrificação convencional	28
3.2.2 Nitrificação e Desnitrificação Simultânea (NDS)	33
3.3 Sistemas biológicos de remoção de fósforo	36
3.4 Glicerol	38
3.4.1 Fermentação do Glicerol.....	39
3.5 REATORES DE FLUXO CONTINUO E REATOR SEQUENCIAL EM BATELADA	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 APARATO EXPERIMENTAL.....	42
4.1.1. Reatores Biológicos.....	42
4.1.2 Alimentação.....	45
4.1.2.1 Esgoto Sanitário.....	45
4.1.2.2 Glicerol Fermentado	46
4.1.3 Material Suporte do reator LEAI	47
4.1.4 Inóculos.....	48
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	48
4.2.1. Operação em modo contínuo	49
4.2.2. Operação em batelada sequencial	50
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	53
4.3.1 Análises Físico-Químicas	53
4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	54
4.4.1 Microscopia óptica.....	54

4.4.1.1 Coloração de Neisser	54
4.4.1.2 Coloração de Polihidroxibutirato (PHB).....	55
4.5 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE MONITORAMENTO DO SISTEMA.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 FASE DE ADAPTAÇÃO	57
5.2 OPERAÇÃO DO REATOR EM MODO CONTÍNUO	58
5.2.1 Remoção de compostos nitrogenados	58
5.2.2 Remoção de DQO	65
5.2.3 Remoção de fósforo	67
5.2.4 Perfis temporais do reator em modo contínuo.....	68
5.3 OPERAÇÃO EM BATELADAS SEQUENCIAIS	72
5.3.1 Remoção de compostos nitrogenados	72
5.3.2 Remoção de DQO	76
5.3.3 Remoção de fósforo	77
5.3.4 Perfil temporal do RBS	78
5.4 pH E ALCALINIDADE	80
5.5 ANÁLISE DE SÓLIDOS	82
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ENTRE AS EFICIÊNCIAS DE NITRIFICAÇÃO, DESNITRIFICAÇÃO E REMOÇÃO DE N-TOTAL, de DQO e DE FÓSFORO	83
5.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	88
6 CONCLUSÕES	95
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	97
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE I - OBTENÇÃO DO FERMENTADO DE GLICEROL A PARTIR DA DECOMPOSIÇÃO ÁCIDA EM ENSAIO EM BATELADA E CINÉTICA DE DECAIMENTO.....	107

1 INTRODUÇÃO

A redução da qualidade das águas é um preocupante problema ambiental, em decorrência das atividades antrópicas desordenadas sem o tratamento adequado dos resíduos e efluentes residuais dos processos. Conforme Tundisi (2003), os despejos sem um tratamento prévio e a destruição das áreas alagadas têm gerado uma contínua deterioração da qualidade e quantidade da água, dificultando ainda o atendimento das normas regulamentadoras vigentes relacionadas com as diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos d' água (CONAMA 357, 2005) e com os padrões de lançamento dos efluentes (CONAMA 430, 2011).

Tem-se, como exemplo de problemas ambientais, o lançamento de águas residuárias que contêm macronutrientes como o nitrogênio e fósforo, os quais são nutrientes importantes para os processos biológicos. Essas substâncias ocasionam o enriquecimento do meio e assim favorecem o crescimento de uma diversidade de seres vivos. Contudo, o excesso dos mesmos estimula o crescimento exacerbado de algas e acarreta na eutrofização do meio no qual está contido (e.x. lagos e lagoas).

De acordo com Calijuri (2006) e Ahn (2006), na perspectiva ambiental, a eutrofização dos corpos d' águas causa a depleção do oxigênio dissolvido (OD), altera a qualidade da água e a diversidade biológica local, modifica o pH e favorece a floração das cianobactérias e a produção de toxinas. No âmbito econômico, desfavorece o comércio de peixes, ocasiona problemas estéticos e recreacionais e dificulta o tratamento da água (BURKE *et al.*, 2004). Além do mais, no setor de saúde pública, o câncer de estômago e a doença conhecida como metahemoglobinemia estão relacionadas com a presença de nitrato. Em particular, nesta última, o nitrato inibe a movimentação de oxigênio (O₂) nas células do corpo (EPA, 2009).

As estações de tratamento de efluentes (ETE), na década de 70, não dispunham de tratamento eficaz para a remoção destes nutrientes, visto que as ETEs priorizavam a remoção de matéria orgânica carbonácea. Então, a partir da década de 80, a preocupação em remover macronutrientes tem sido significativa, visando evitar e/ou minimizar os problemas associados aos mesmos, intensificando a busca por sistemas de pós-tratamento que eliminem os compostos nitrogenados. Entre os novos sistemas de pós-tratamento desenvolvidos recentemente, encontram-se alguns que utilizam microrganismos específicos para remover, de maneira eficiente, altas cargas de nitrogênio (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

Os compostos nitrogenados podem ser removidos por uma variedade de processos físico-químicos e biológicos. De acordo com EPA (2009) a remoção biológica de nitrogênio

torna-se mais viável, em função do seu menor custo em comparação com os processos físico-químicos.

A remoção biológica dos compostos nitrogenados envolve o processo de conversão da amônia para nitrito e nitrato, conhecido como nitrificação, seguido pela desnitrificação, na qual há a transformação do nitrato a nitrogênio gasoso, sendo o último liberado para a atmosfera. O intuito de retirar o nitrogênio total do meio aquoso é alcançado por meio de sistemas de vários reatores (sistema tradicional), nos quais há a ocorrência dos processos de nitrificação aeróbia seguida pela desnitrificação em condições anóxicas. Outra configuração do sistema refere-se a um único reator em que aconteça simultaneamente a nitrificação e desnitrificação (SEN; DENTEL, 1998).

A remoção biológica de fósforo ocorre por meio da variação do ambiente em anaeróbio (ausência de oxigênio livre ou combinado) e aeróbio para que, assim, ocorram as condições necessárias para o desenvolvimento dos organismos acumuladores de fósforo, sendo que este elemento é eliminado através do descarte de lodo em excesso.

Atualmente, tem-se estudado processos biológicos para remoção simultânea de nitrogênio e fósforo, sendo a matéria orgânica um dos fatores limitantes para a desnitrificação heterotrófica e para a liberação de fósforo na zona anaeróbia e assimilação da biomassa aeróbia (TAM *et al.*, 1992; ISAACS e HENZE, 1995; AHMED, Z. *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009). Nestes casos, em que a matéria orgânica não é suficiente para promover a remoção satisfatória de nutrientes do sistema, deve-se inserir uma fonte externa de carbono para auxiliar na ocorrência dos processos.

Como fonte carbonácea, já foram utilizados diversos compostos como: metanol, etanol, ácido acético e glicerol. O glicerol tem sido exposto como uma fonte de carbono com potencial, visto que é economicamente viável em comparação com as outras fontes, e é um subproduto originado da produção de biodiesel. Esse combustível conta com incentivo constante para sua produção no Brasil, favorecendo a disponibilidade do glicerol no mercado (CARNEIRO, 2015, CYPLIK *et al.*, 2013, BODÍK *et al.* 2009).

Diante do exposto, será verificada a viabilidade de um sistema de bancada composto por reator UASB, alimentado com esgoto sanitário, seguido de um reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente na remoção de DQO, nitrogênio e fósforo. A fonte de carbono para a desnitrificação e remoção biológica do fósforo será o produto obtido da fermentação de glicerol.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo principal

O objetivo geral desta pesquisa foi verificar a viabilidade do glicerol fermentado como fonte exógena de carbono em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (LEAI) e recirculação do efluente, operado tanto em modo contínuo quanto em batelada sequencial, como unidade de pós-tratamento de efluente de reator UASB, na remoção simultânea da matéria orgânica residual e de nutrientes de esgoto sanitário.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a melhor condição operacional do reator, entre as selecionadas no projeto, com o intuito de se obter, assim, as maiores eficiências de remoção de nitrogênio, de matéria orgânica e de fósforo.
- Verificar a dinâmica das formas de nitrogênio no interior dos reatores com base nos resultados dos perfis temporais de concentração desses compostos em cada fase operacional.
- Avaliar a diversidade microbiana presente no reator em cada fase operacional, tanto da biomassa aderida ao meio suporte, quanto em suspensão no interior do reator.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fontes e formas de nutrientes em efluente sanitário

Nos efluentes sanitários, há concentrações de nitrogênio e fósforo, sendo estes macronutrientes presentes em diversas formas. O nitrogênio orgânico e amoniacal são os principais compostos nitrogenados que chegam às estações de tratamento de águas residuárias, os quais são provenientes tanto de esgoto de residências como de atividades agrícolas e industriais (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999; SANTOS, 2009).

Essa matéria nitrogenada pode ser dividida em duas categorias: não-biodegradável e biodegradável. Para o tratamento biológico destas, consideram-se as conversões da fração biodegradável do nitrogênio, a qual é subdividida em: amônia (NH_4^+), nitrogênio orgânico solúvel e nitrogênio orgânico particulado. O nitrogênio orgânico particulado é hidrolisado a nitrogênio orgânico solúvel. A predominância dessas formas varia com o pH do meio (METCALF; EDDY, 2003; SANTOS, 2014).

As formas oxidadas nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) não são comumente encontradas no esgoto sanitário. Contudo, a concentração de Nitrogênio Total *Kjeldahl* (NTK - soma do nitrogênio orgânico e amoniacal) geralmente está no intervalo de 40 a 60 mg/L, e corresponde a 6 a 12% da DQO afluente (SANTOS, 2009).

As transformações correspondentes entre os compostos nitrogenados da forma orgânica para a forma molecular gasosa ocorrem por meio de reações de amonificação, assimilação, nitrificação e desnitrificação, as quais são as bases do tratamento das formas nitrogenadas em um sistema de tratamento de esgoto.

Na amonificação, microrganismos facultativos em ambiente anaeróbio ou aeróbio decompõem compostos orgânicos nitrogenados levando-os ao composto amoniacal. Na nitrificação, microrganismos autótrofos e heterótrofos, em ambiente aeróbio, oxidam o amônio a nitrito e nitrato. Por fim, na desnitrificação, o nitrato é reduzido biologicamente a óxidos gasosos de nitrogênio sob as seguintes condições: ausência de oxigênio dissolvido ou em baixas concentrações e presença de uma fonte de carbono. Assim, esses compostos gasosos são finalmente reduzidos para N_2 , o qual pode ser liberado para atmosfera.

Em relação ao elemento fósforo, Hammer (1979) descreveu que, na composição média do esgoto sanitário bruto, encontra-se 10 mg/L de fósforo total, sendo que, para seu tratamento e consequente atendimento aos padrões exigidos na legislação, utiliza-se tanto a precipitação química (método químico), como técnicas de remoção biológica que se baseiam

na capacidade de alguns microrganismos em acumularem, dentro de suas células, o fosfato. Como constituinte da biomassa no interior do sistema, essas bactérias passam a compor o lodo em excesso que, ao ser removido, promove a remoção de fósforo (SIDAT; KASAN; BUX, 1999; WANG *et al.*, 2008).

3.2 Sistemas de remoção biológica de nitrogênio

Os efluentes domésticos e industriais, advindo de atividades antrópicas lançam altas cargas de nitrogênio no corpo hídrico, ocasionando, como consequência, um desequilíbrio no corpo receptor. A remoção deste nutriente pode ocorrer tanto por processos físico-químicos quanto biológicos. Dentre os processos físico-químicos destacam-se: *stripping* da amônia, cloração com *breakpoint*, troca iônica e osmose reversa. Nos processos biológicos, têm-se os sistemas de lodos ativados, nitrificação seguida de desnitrificação, nitrificação/desnitrificação simultânea e os baseados no processo *ANAMMOX* (METCALF; EDDY, 2003; KIELING, 2004).

Do ponto de vista econômico, a remoção biológica tem se mostrado a mais viável e por isso é amplamente utilizada. Neste contexto, conhecer o metabolismo microbiano do nitrogênio é fundamental para o tratamento destes compostos nitrogenados (GRAY, 1989).

O nitrogênio está disponível mais frequentemente na forma de amônia (NH_3) ou íon amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e nitrogênio gasoso (N_2). As substâncias orgânicas nitrogenadas podem ser degradadas por sistemas microbianos, gerando NH_4^+ , enquanto o N_2 atmosférico pode ser convertido em NH_3 , por bactérias fixadoras de nitrogênio. O NO_3^- pode ser convertido para N_2 , sendo eliminado na atmosfera, ou em NH_4^+ para sua utilização na síntese de compostos necessários (HENZE *et al.*, 2002). Tal situação está representada na Figura 1.

(compostos intermediários podem ser formados em menores concentrações) (METCALF; EDDY, 2003; SCHMIDELL; REGINATTO, 2007). Vale ressaltar que a desnitrificação heterotrófica ocorre somente se houver carbono orgânico disponível no meio.

O processo de nitrificação ocorre sob ação de bactérias pertencendo a dois gêneros mais frequentes, o *Nitrosomonas*, responsável pela conversão do íon amônio a nitrito, conforme evidenciado na equação (1), representando as bactérias que oxidam o amônio (BOA), e o *Nitrobacter* responsável pela oxidação de nitrito a nitrato (BON), como explicito na equação (2) (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

Esses microrganismos utilizam o CO₂ para síntese e compostos inorgânicos amoniacal para obter energia e são autótrofos e quimiolitotróficos. Assim, tratam-se de organismos com crescimento lento, ocasionando, como consequência, uma lenta velocidade de transformação.

Na reação representada pela equação (1), tem-se a hidroxilamina NH₂OH como composto intermediário e a mesma apresenta um $\Delta G^{0'} = -287 \text{ KJ/reação}$, sendo, então, uma reação termodinamicamente favorável. (HENZE *et al.*, 2002).

A equação (2) demonstra a geração do nitrato, a qual apresenta $\Delta G^{0'} = -76 \text{ KJ/reação}$. Fazendo o somatório da equação (1) e da equação (2), tem-se a reação global representativa do processo de nitrificação (equação 3).

Observa-se que, na oxidação completa do íon amônio a nitrato, há liberação de H⁺ no meio, o qual consome a alcalinidade, e pode reduzir o pH, limitando, assim, a velocidade do processo (equação 4).

A partir da equação (4), é possível verificar a quantidade equivalente em massa de oxigênio requerida durante a nitrificação, o qual equivale a 4,57 g O₂/gN-NH₄⁺ e a alcalinidade equivale a 7,14 g CaCO₃/gNH₄-N.

Uma vez que a acumulação de nitrito é raramente observada, pode concluir-se que a taxa de conversão de nitrato controla a velocidade de reação global. A nitrificação é dependente da quantidade e do tipo de organismos nitrificantes presentes. A massa de células desses organismos faz parte da composição dos sólidos suspensos voláteis (BARNARD, 2006).

A equação estequiométrica de oxidação do nitrogênio amoniacal não considera que uma porção deste é utilizada para a síntese de novas células microbianas, a qual apresenta a composição típica de C₅H₇O₂N. De acordo com a EPA (2009), em termos de crescimento celular, o rendimento da nitrificação calculado pela liberação de energia teórica das reações varia entre 0,06 a 0,20 gSSV/ gNH₄⁺-N (grama de sólidos suspensos voláteis por grama de nitrogênio como amônio removido do resíduo). Esses valores baixos para o fator de conversão do substrato nitrogenado em células é devido ao crescimento lento dos microrganismos e sugerem a utilização de reatores com reciclo de células, com a finalidade de incrementar a velocidade das reações (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

Segundo Eckenfelder e Argaman (1991), o valor de 0,15 gSSV/ gN-NH₄⁺ oxidado é frequentemente usado para elaboração de projeto. Assim, a reação global empírica que inclui oxidação e síntese é representada na equação (5).

Para esta equação estequiométrica, verifica-se que 4,33 g O₂ são oxidadas, 0,15 g de novas células são formadas, 7,14 g de alcalinidade são utilizadas e 0,08 g de carbono inorgânico são consumidos, valores estes ligeiramente inferiores ao obtido sem a consideração da síntese celular. Conforme Schmidell e Reginatto (2007), tal situação indica que o carbono inorgânico utilizado para o crescimento celular também age como um agente oxidante, reduzindo o consumo de oxigênio.

Diversos fatores internos e externos podem influenciar na nitrificação, como temperatura, pH e OD.

A taxa de crescimento das BOA e das BON são particularmente sensíveis à temperatura do meio em que vivem. A nitrificação ocorre nos efluentes domésticos em

temperaturas de 4 a 45°C, com uma velocidade de crescimento ótimo entre 35 a 42°C (EPA, 2009).

Em relação ao pH, um fator importante a ser considerado é o grau de adaptação que o sistema tenha alcançado. Verifica-se que grandes oscilações no pH têm sido prejudiciais para o desempenho da velocidade da nitrificação (METCALF; EDDY, 2003). A adaptação geralmente permite a reação efetiva entre o pH de 7 a 8 (BARNARD, 2006).

Microrganismos nitrificantes são aeróbios obrigatórios e, por isso, a concentração de OD tem um efeito significativo na taxa de crescimento desses organismos. Assim, a redução de OD diminui a taxa de ocorrência da nitrificação. Normalmente, o oxigênio dissolvido favorece a nitrificação entre a faixa de 2 a 3,5 mg/L, visto que concentrações inferiores a 1 mg/L podem reduzir a nitrificação em até 50% (METCALF; EDDY, 2003).

O processo de desnitrificação envolve a redução do nitrato (ou nitrito) ao gás N₂, apresentando, como condição de contorno, a ausência do OD. O ambiente biológico é denominado anóxico, quando apresenta uma pequena concentração ou ausência de OD, mas com a presença de formas oxidadas de nitrogênio. Neste processo, bactérias usam o oxigênio contido nas moléculas orgânicas nitrogenadas para metabolizar carbono orgânico (BARNARD, 2006).

Diversos microrganismos, heterótrofos e autótrofos, realizam a conversão de NO₃⁻ a N₂, destacando-se o gênero *Pseudomonas*, que são bactérias heterótrofas facultativas que utilizam o NO₃⁻ como receptor de elétrons, necessitando de uma fonte de carbono orgânico para operar como doadores de elétrons, em condições anóxicas (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007). Esse material orgânico pode ser endógeno (proveniente da própria água residuária) ou exógeno (adicionado externamente), como por exemplo, o metanol, etanol, ácido acético e o glicerol (METCALF; EDDY, 2003, BARNARD, 2006).

Essa redução de nitrato à nitrogênio gasoso apresenta compostos intermediários, alguns dos quais são tóxicos. A sequência do processo pode ser vista na equação (6).

De acordo com Ritmann e McCarty (2001), essas formas intermediárias são catalisadas por diferentes enzimas, conforme as reações representadas a seguir:

Sabe-se que, para a ocorrência da desnitrificação, é necessária a presença de um doador de elétrons na forma orgânica. Os doadores de elétrons mais utilizados são: matéria orgânica biodegradável do afluentes do esgoto (equação 11), respiração endógena (equação 12) e fonte de carbono externa, representada pela equação 13 (METCALF; EDDY, 2003).

Em todas as reações de desnitrificação heterotrófica, o equivalente da alcalinidade é produzido por meio do equivalente de NO_3^- reduzido. Nos sistemas em que ocorre a desnitrificação na ausência de fontes exógenas de doador de elétrons, verifica-se que a matéria orgânica biodegradável é escassa, prevalecendo a respiração endógena. Com isso, o carbono pode não ser suficiente para o processo de desnitrificação, sendo necessária a presença de uma fonte externa de carbono, como metanol, etanol e glicerol (CARNEIRO, 2015).

Segundo Her e Huang (1995), a estrutura química e o peso molecular das fontes de carbono relacionam-se com a eficácia do processo de desnitrificação e com a relação C/N ótima ou DQO/N ótima. Essa relação representa a fração mínima requerida para uma desnitrificação quase completa (92-97%), visto que a eficiência de remoção de nitrato aumenta linearmente com o aumento da relação C/N ou da DQO/N, até esta razão atingir um valor ótimo, quando o sistema é operado em bateladas sequencias. A partir deste valor, a eficiência do sistema se estabiliza e, dependendo do tipo de fonte de carbono utilizada, se esta

relação aumentar, pode inibir ou até mesmo fazer cessar o processo de desnitrificação (CALLADO; FORESTI, 2002).

A quantidade real de carbono necessária para o processo de desnitrificação completa (relação C/N ótima ou DQO/N) depende de diversos fatores, que incluem as condições operacionais do reator e o doador de elétron (METCALF; EDDY, 2003). Diferentes valores para esta relação são encontrados na literatura, dos quais alguns se encontram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Relações DQO/N para desnitrificação.

Fonte de Carbono	Relação DQO/N ótima	Referência
Metanol	2,3	NARKIS <i>et al.</i> , 1979
Glicerol	3,1	GRABINSKA-LONIESKWA <i>et al.</i> , 1985
Glicose	4,2	ISAACS; HENZE, 1994
Acetato	1,9	HER; HUANG, 1995
Efluente de resíduo suíno	2,2	CHOI <i>et al.</i> , 1996
Efluente de aterro sanitário	1,8	BAE <i>et al.</i> , 1997
Esgoto Sanitário	5,3	CHIE-CHIEN TSENG <i>et al.</i> , 1998
Glicerol	1,7	BODÍK <i>et al.</i> , 2009

Como fatores limitantes do processo de desnitrificação tem-se a concentração de oxigênio dissolvido, que pode inibir completamente o processo para concentrações superiores que 0,2 mg/L. No entanto, não há necessidade da condição de anaerobiose para a ocorrência da desnitrificação. Assim, a interrupção da aeração é suficiente para que se estabeleça a ausência de OD (EPA, 2009; SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

Além do mais, tem-se o parâmetro pH, o qual deve apresentar valores elevados, visto que valores inferiores a 7 favorecem a produção mais acentuada de óxidos de nitrogênio, como o óxido nitroso, que é composto altamente tóxico. De acordo com Schmidell e Reginatto (2007), as condições mais favoráveis são o pH no valor de 8 e a temperatura de 35°C, uma vez que, nessas condições, a velocidade específica atinge valores superiores ao indicado para microrganismos autótrofos, favorecendo os heterótrofos.

3.2.2 Nitrificação e Desnitrificação Simultânea (NDS)

Usualmente, os processos de nitrificação e desnitrificação se desenvolvem em reatores diferentes em função de o processo de nitrificação ocorrer em condição aeróbia e o de

desnitrificação se dar na ausência de oxigênio. Contudo, ambos os processos são complementares, visto que a nitrificação produz nitrito ou nitrato, os quais são reagentes na desnitrificação. A nitrificação também reduz o pH do meio, o qual é recuperado juntamente com a alcalinidade pela desnitrificação (MENOUD *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 1998). Assim, verificam-se vantagens da ocorrência de ambos os processos no mesmo reator, ressaltando ainda a viabilidade econômica, uma vez que um número menor de reatores será utilizado.

Há dois fenômenos que descrevem a NDS, sendo estes físicos e biológicos. Do ponto de vista físico, a NDS ocorre no interior do biofilme ou floco formado, em decorrência do gradiente de oxigênio criado na biomassa. A distribuição desigual de oxigênio permite a proliferação de ambos os tipos de bactéria (CHIU *et al.*, 2007). Para que se tenha uma NDS completa, a taxa de oxidação de amônia deve se equivaler à taxa de desnitrificação. A nitrificação autotrófica é geralmente mais lenta que o processo de desnitrificação. Sendo assim, é necessário que haja substrato orgânico degradável (ZOPPAS, 2012).

Nessa configuração do sistema, as bactérias nitrificantes se desenvolverão nas regiões onde houver elevadas concentrações de oxigênio e as desnitrificantes em baixas concentrações de oxigênio (Figura 2). Esse biofilme se forma aderindo ao suporte e, com sua multiplicação, forma-se um gradiente de oxigênio dissolvido (SANT'ANNA JUNIOR, 2010).

Figura 2 - Representação do biofilme com gradiente de oxigênio formando zonas aeradas e anóxicas.

Fonte: ONO, 2007.

Como fatores limitantes, tem-se a concentração de OD, visto que a entrada do substrato nas camadas mais internas do biofilme depende da transferência de massa de oxigênio dissolvido (YUAN; GAO, 2010). Além do mais, tem-se a espessura do biofilme, o qual, em decorrência da força de cisalhamento, pode ter sua espessura reduzida e, assim, dificultar a presença das zonas anóxicas.

Pochana e Keller (1999) verificaram a redução da dimensão média do floco de lodo ativado de 80 para 40 μm , em função do aumento da velocidade de mistura, e constataram uma redução na eficiência do processo via NDS de 31%. Também observaram que baixas concentrações de OD desaceleravam a nitrificação e favoreciam a desnitrificação, confirmando que o OD é um fator crítico no processo de NDS, sendo necessário verificar seu nível adequado no reator.

A explicação biológica da NDS está no fato de que alguns microrganismos possuem a habilidade de nitrificar de forma heterotrófica e desnitrificar em ambiente aeróbio. Contudo, essa verificação contradiz a concepção tradicional da engenharia sobre esses processos (MÜNCH; LANT; KELLER, 1996).

Chen *et al.* (2011) utilizaram biomassa proveniente de um biorreator aeróbio que tratava lixiviado, da qual isolaram três gêneros de bactérias capazes de nitrificar de maneira heterotrófica e desnitrificar em meio aeróbio, sendo elas as *Agrobacterium sp.*, *Achromobacter sp.* e *Comamonas sp.*

De acordo com Holman e Wareham (2005), os fenômenos físicos e biológicos tendem a ocorrer ao mesmo tempo nos reatores, pois constataram em um processo de NDS, realizado em um reator em batelada no qual se variavam os parâmetros carga orgânica, OD e concentração de NH_4^+ , um único fenômeno (ou físico ou biológico) não seria suficiente para a remoção de nitrogênio.

Diversos fatores afetam a eficiência de um sistema com NDS, destacando-se três que influem diretamente: a fonte de matéria orgânica biodegradável, o tamanho dos flocos de lodos e concentração de OD. Quanto mais facilmente biodegradável a matéria orgânica, maior será a eficiência da desnitrificação; quanto maior o floco de lodo, maior a remoção de nitrogênio total e o aumento de OD pode prejudicar o processo de NDS (MOURA, 2014; POCHANA; KELLER, 1999).

3.3 Sistemas biológicos de remoção de fósforo

O fósforo é um nutriente necessário para a síntese de compostos bioquímicos das células bacterianas. Com isso, em um sistema biológico de tratamento de efluentes, a quantidade de fósforo incorporada à biomassa equivale de 0,02 a 0,06 mgP/mgSSV (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

O mecanismo biológico de remoção de fósforo é baseado tanto na capacidade das bactérias heterotróficas aeróbias em armazenar quantidade excessiva de fósforo, na forma de polifosfato (reserva energética para sobreviverem na ausência de oxigênio), quanto na habilidade das mesmas em utilizar os substratos de fermentação simples produzidos na zona anaeróbia e assimilá-los como produtos de armazenamento dentro das células. Este último mecanismo descrito envolve a liberação de fósforo. Ademais, na zona aeróbia, a energia é produzida pela oxidação dos produtos do armazenamento durante o crescimento celular (STENSEL, 1991).

As bactérias acidogênicas, ao degradarem a matéria orgânica em ambiente anaeróbio, formam, como produtos, os ácidos graxos de cadeia curta ou ácidos voláteis (ácido acético, butírico e propiônico). Esses ácidos orgânicos servem de substrato para as bactérias, denominadas Poli-P, as quais apresentam a capacidade de acumular o fosfato na forma de polifosfatos, formando o produto polihidroxibutirato (PHB). As energias das ligações do polifosfato, existentes no interior da célula dessas bactérias, são utilizadas para regenerarem o ATP, possibilitando a síntese do PHB no interior das células no ambiente anaeróbio. Enquanto a regeneração ocorre, o fósforo inorgânico é liberado para o exterior da célula, aumentando assim a concentração deste nutriente no meio. Com isso, as bactérias Poli-P resistem a períodos de anaerobiose até o momento em que a sua reserva de polifosfato for suficiente para regenerar o ATP e produzir o PHB (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

Em uma outra etapa, na presença de oxigênio ou em condição anóxica, a matéria orgânica do efluente é degradada pelos mesmos microrganismos, gerando energia para o crescimento celular. Ao mesmo tempo, ocorre a oxidação do PHB, fato que demonstra que, na fase aeróbia, uma quantidade maior de fósforo é assimilada para produção dos fosfatos do que a liberado na fase anaeróbia. Na Figura 3 observa-se que, para um tratamento eficaz, deve-se ter uma etapa anaeróbia seguida pela etapa aeróbia, visto que permite a seleção dos microrganismos capazes de acumular o fósforo no lodo, e assim, quando estes estiverem em excesso, serão retirados do sistema (remoção de parte da biomassa) (METCALF; EDDY, 2003; SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

Figura 3 - Variação da concentração de fosfato e matéria orgânica no efluente, em um tratamento biológico anaeróbio seguido de aeróbio

Fonte: adaptado SCHMIDELL E REGINATTO (2007).

De acordo EPA (2009), é essencial que haja fontes de carbono que forneçam quantidades suficientes de acetato e propionato para a remoção de fósforo. Em geral, uma relação de DQO/P_{total} mínima de 40 ou DBO_5/P_{total} de 18 é requerida para reduzir a concentração de fósforo efluente para menos que 1 mg.L^{-1} . Stensel (1991) aponta que são requeridos de 7 a 9 mg de acetato para remover 1 mg de fósforo. Barnard (2006) cita que uma relação mínima de $DQO_{solúvel}/P_{total}$ de 18 a 20 é o suficiente para promover uma remoção biológica de fósforo satisfatória.

Carneiro (2015) testou a viabilidade do glicerol bruto, como fonte de carbono, na remoção de compostos nitrogenados e de fósforo. Para a configuração analisada, o autor verificou que não foi possível remover significativamente o fósforo por via biológica, pois não houve o desenvolvimento das bactérias Poli-P no reator e não ocorreu a liberação efetiva de ortofosfato no meio, durante a fase não aerada, evidenciando que não ocorreu a presença de uma fase anaeróbia que propiciasse a geração de ácidos graxos voláteis de cadeia curta.

Diante deste estudo, pretende-se utilizar o glicerol fermentado para disponibilizar com uma maior facilidade os ácidos presentes na rota metabólica do glicerol e então obter uma remoção significativa do fósforo.

Em suma, o processo de remoção do fósforo dita que, na etapa anaeróbia, os organismos acumuladores de fósforo armazenam ácidos voláteis, como polihidroxibutirato (PHB), liberando, fosfato para o meio líquido, a partir da quebra das moléculas de polifostato. Essas moléculas são armazenadas no interior destes organismos, com a finalidade de obter de energia. Na etapa aeróbia, estes microrganismos metabolizam a reserva interna de PHB para

remover o fósforo presente no meio líquido, que é armazenado em excesso por estes microrganismos como polifosfato. Assim, o fósforo é removido efetivamente quando essa massa de microrganismos acumuladores de fósforo sai do sistema (VAN LOODSDRECHT *et al.*, 1997; WEF, 2010).

Visto que na remoção biológica o fósforo é retirado do meio líquido e é incorporado ao lodo (fração sólida), pode se destinar esse lodo rico neste nutriente à recuperação de solos degradados, sendo utilizado como adubo. Uma vez que este fornece ao solo os nutrientes necessários para o desenvolvimento de culturas, contudo é necessário o conhecimento de sua composição (análise do lodo), a fim de verificar a ausência de riscos de toxidades às plantas, ao homem e de poluição ambiental.

3.4 Glicerol

O glicerol é um dos principais subprodutos da conversão de óleos vegetais em biodiesel. A busca pela utilização de combustíveis alternativos favoreceu o aumento progressivo da produção de biodiesel, e acarretou, como consequência, o excesso de glicerol nos processos (ABAD; TURON, 2012).

Esse subproduto pode ser obtido como coproduto por meio de três processos: transesterificação com um álcool, como o metanol, para produção de biodiesel, hidrólise do biodiesel para a produção de ácidos graxos e por meio da reação de saponificação no processo de manufaturas de sabões, como exposto na Figura 4 (LOPES, 2001; CARNEIRO 2015).

Figura 4 - Glicerol como co-produto em processos.

Fonte: Adaptado YAZDANY E GONZALEZ, 2007.

Após a reação de transesterificação, aproximadamente 10% da carga de alimentação é convertida em glicerol (LUQUE et al., 2008, THOMPSON; HE, 2006).

O uso do glicerol tem se difundido nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. No entanto, o glicerol contém resíduos que necessitam de purificação para serem utilizados em tais aplicações industriais. A viabilidade econômica mundial de biodiesel, sem qualquer tipo de subsídios, ainda está sendo debatida. A valorização do glicerol tem potencial para melhorar a rentabilidade do biodiesel em um cenário mais amplo da biorrefinaria (ABAD; TURON, 2012).

O uso de glicerol como fonte de carbono não é uma técnica nova, mas está se tornando um campo emergente. As fermentações utilizando o glicerol podem apresentar taxas relativas de crescimento lento e rendimentos mais baixos do que as outras fontes como a glicose. Contudo, a produção de metabólitos compensaria as baixas produtividades volumétricas, como o 1,3-propanodiol, ácidos graxos poliinsaturados, hidrogênio e etanol. Com isso, um rendimento econômico positivo pode ser alcançado quando se considerando uma aplicação em escala industrial (ABAD; TURON, 2012).

3.4.1 Fermentação do Glicerol

O metabolismo dos microrganismos fermentadores de glicerol está associado à capacidade do mesmo em utilizar o glicerol como uma fonte de carbono. Assim, o sistema representativo dessa ação é demonstrado por modelos metabólicos. O modelo melhor caracterizado é o do 1,3-propanediol (1,3-PD), no qual a habilidade de utilizar glicerol está relacionada à síntese deste elemento. Both (2005) e Sun (2003) verificaram a associação da bactéria *Enterobacteriaceae* com o modelo em questão e constataram que, nestes organismos, há duas rotas paralelas responsáveis pela dissimilação do glicerol: a oxidativa e a redutora (Figura 5).

A via oxidativa é descrita pelo processo de desidrogenação (retirada de hidrogênio) do glicerol, por meio da qual forma-se um composto conhecido como dihidroxiacetona que, após sofrer fosforilação, pode ser convertido a piruvato ou a succinato. Posteriormente, o piruvato pode ser convertido a acetato, etanol e 2,3-butenodiol, e o succinato a propionato. As reações que levam à formação de compostos a partir do piruvato variam de acordo com as condições ambientais e com as enzimas que mediam a reação, ou seja, com o organismo, podendo originar compostos mais simples, sendo válido destacar que, nessa etapa da reação, há a

geração de hidrogênio (CLOMBURG; GONZALEZ, 2013; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

A rota redutora converte o glicerol em 1,3-PD através da ação de uma coenzima associada ao NADH_2 . O NADH_2 que é consumido, durante a reação, é liberado no ambiente por meio da formação de células novas, proporcionando assim um equilíbrio redox para as células na ausência de receptores de elétrons. No entanto, conforme Clomburg; Gonzalez (2013), a fermentação do glicerol utilizando *Escherichia coli* e *Paenibacillus macerans*, não gerou o 1,3-PD, pois, nestes organismos, a capacidade de utilizar glicerol em condições de fermentação está ligada à síntese de 1,2-propanodiol e etanol como meio de facilitar o equilíbrio redox e geração de ATP.

Figura 5 - Rotas metabólicas do glicerol.

Fonte: adaptado CARNEIRO, 2015; ALBUQUERQUE, 2014.

Ao longo da ocorrência da fermentação em um reator, o saldo global redox no interior da célula é um fator determinante para expressar os rendimentos e produtividades que podem ser alcançados durante a síntese de um produto, a partir de uma fonte de carbono. Assim, verifica-se que a estequiometria das reações químicas é ferramenta essencial no desenvolvimento de balanços de massa em reatores utilizados no controle da poluição ambiental. (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; SILVA, 2009).

Estudos analisaram a aplicabilidade do glicerol como fonte de carbono no processo de desnitrificação, em que o glicerol transfere uma parcela de elétrons para o nitrato (receptor de elétrons), liberando energia para que outra parcela de elétrons do glicerol gere novas células (AKUNNA et al., 1993; BODÍK et al., 2009, CARNEIRO, 2015).

Carneiro (2015) verificou que a aplicação do glicerol bruto, como fonte de carbono, em um reator de biomassa suspensa para o tratamento de um efluente sintético, fez com que o sistema apresentasse eficiência de remoção de N-total de 91% e de fósforo de 10%. Como doador de elétrons para a desnitrificação, o glicerol foi efetivo, diferentemente do fósforo. No seu trabalho, o autor justifica que o tempo de exposição do glicerol aos microrganismos não foi suficiente para equiparar com a taxa de remoção do fósforo. Assim, a fermentação do glicerol antes de inseri-lo no sistema é sugestão que visa facilitar o contato dos organismos com os produtos da fermentação e assim favorecer o processo.

3.5 REATORES DE FLUXO CONTINUO E REATOR SEQUENCIAL EM BATELADA

De acordo com Von Sperling (2014), o reator de fluxo contínuo configura-se de forma a apresentar um fluxo com entradas e saídas contínuas, podendo ser em fluxo em pistão (em que as partículas passam pelo tanque e são descarregadas na mesma sequência em que entraram) ou de mistura completa (em que as partículas que entram no tanque se misturam imediatamente a toda massa líquida do reator).

Todavia, os reatores sequenciais em batelada (RSB) são modificações do sistema de lodos ativados convencional, onde ocorrem todas as etapas do tratamento através do estabelecimento de ciclos de operação com durações definidas. A massa biológica permanece no reator durante todos os ciclos, eliminando dessa forma a necessidade de decantadores separados e das elevatórias de recirculação do lodo (PICKBRENNER, 2002).

Ambos os tipos de reatores quando se dispõem de flexibilidade de condições, como a aeração intermitente do sistema, desenvolvem fases ou ciclos, que permitem o estabelecimento de processos que promova a remoção biológica de nutrientes. Na literatura

existem diversos trabalhos que demonstram a eficiência do uso de reatores contínuos nos processos de nitrificação, desnitrificação e remoção biológica de fósforo (HOOPER *et al.*, 1997; CHIU *et al.*, 2007; BARANA *et al.*, 2013; SANTOS, 2014; MOURA, 2014; CARNEIRO, 2015; SILVA, 2016). Da mesma forma, Monteggia (1980), Heck (1980), Cybis (1992), Pinto (1998), Finger (2000), Santos (2001), He *et al.* (2016) e Wang *et al.* (2016) descreveram sistemas operados em bateladas sequenciais eficientes na remoção biológica de nutrientes.

Os sistemas contínuos tem como vantagem a ausência de problemas com a adaptação dos microrganismos, visto que não há períodos de descanso onde a biomassa permanece sem alimento (KETCHUM, LIAU E IRVINE, 1979). Assim como, a facilidade do controle de qualidade dos produtos devido ao controle automático do processo, sem a utilização de diversos equipamentos complexos como requeridos no RSB, minimizando a probabilidade de falhas mecânicas.

Contudo, os RSB são mais vantajosos por apresentar a facilidade de equalização das vazões e cargas afluentes, principalmente em sistemas onde as flutuações horárias do esgoto bruto são conhecidas, visto que esses reatores absorvem essas variações quando se preenchem (IRVINE E RICHTER, 1976).

De acordo com Irvine e Richter (1976), o RSB se destaca também, por apresentar um sistema que não tem interferências na etapa de sedimentação por problemas de curtos-circuitos existentes em sistemas de alimentação contínua, devido à entrada e saída de líquidos. Podem, também, apresentar um melhor controle das taxas de reação e permitir, assim, alcançar com mais facilidade a qualidade do efluente requerida por meio da aplicação de maiores tempos de reação.

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 APARATO EXPERIMENTAL

4.1.1. Reatores Biológicos

O sistema operacional foi construído nas dependências do Laboratório de Processos Biológicos (LPB), localizado na Área 2 do Campus da Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos. Este foi composto por dois reatores de acrílico em série: um Reator UASB, seguido por um reator de leito estruturado com aeração intermitente (LEAI). O reator

UASB possuía forma prismática, com altura total de 70 cm e volume total de 11,15 L. O reator LEAI possuía forma cilíndrica, com diâmetro interno de 13 cm, altura de 93 cm e 12,30 L de volume total. A Figura 6 representa esquematicamente o sistema descrito.

Figura 6 - Esquema representativo do sistema UASB + LEIA.

Fonte: Autor.

Inicialmente, o sistema foi operado em escoamento ascendente e alimentação contínua, com a entrada do esgoto doméstico localizada na base do reator UASB, do qual o efluente era direcionado ao reator LEAI e a saída do efluente tratado localizada na parte superior deste último reator, a 83 cm da base. A saída de recirculação do LEAI estava situada a 70 cm da base e a entrada da recirculação na base do reator. No decorrer das primeiras fases, ambos os reatores foram operados sob alimentação contínua. Somente na fase final, o reator LEAI foi adaptado para permitir sua operação como RSB, visando obter melhores eficiências de remoção. As características físicas dos reatores estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características físicas dos reatores biológicos.

PARÂMETRO FÍSICO	UASB	LEAI
Altura útil (cm)	65	83
Diâmetro (cm)	-	13
Volume total (L)	11,15	12,30
Volume útil (L)	9,15	8,60
Porosidade do leito (%)	-	70

Fonte: Autor.

O UASB foi alimentado com uma bomba peristáltica dosadora, da marca ProMinent, modelo Concept B, com vazão média de $1,00 \text{ L.h}^{-1}$, resultando em TDH médio de 9 horas. O LEAI recebia o efluente do UASB por meio de outra bomba de mesma marca e modelo que o primeiro reator, operando com uma vazão média de $0,70 \text{ L.h}^{-1}$ obtendo TDH médio de 12 horas. O LEAI era provido de uma bomba de recirculação (marca ProMinent, Modelo Concept B) com vazão de $2,1 \text{ L.h}^{-1}$ ($Q_r/Q=3$), valor este definido a partir do trabalho de Moura (2014), que utilizou na pesquisa este mesmo modelo de reator. Esse autor observou que tal razão foi suficiente para garantir condições de mistura no interior do reator que limitaram a amplitude da variação nas características do efluente.

A aeração do LEAI foi realizada pela injeção de ar vinda de um compressor acoplado a uma mangueira de saída de ar, que estava conectada a uma pedra porosa para distribuir o fluxo de gás no leito por meio de micro bolhas e facilitar, assim, a transferência de massa. O compressor estava conectado a um temporizador, que permitiu a programação de diferentes tempos de aeração, conforme descrito no procedimento experimental (item 4.2).

Utilizou-se a aeração intermitente para proporcionar a ocorrência tanto da nitrificação quanto da desnitrificação e remoção de fósforo, sendo que na fase aerada a concentração de OD foi mantida entre 2,5 a $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Adotou-se o leito fixo estruturado, visto que este favorece o escoamento e facilita o acesso dos compostos nitrogenados e do oxigênio à superfície do biofilme.

Os reatores foram mantidos em câmara escura para evitar proliferação de algas e foram, inicialmente, mantidos em um câmara climatizada a $30 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Contudo, em virtude de problemas com a manutenção de temperatura pela câmara, posteriormente, a partir do 88º dia de operação, adotou-se um sistema de serpentinas e termostatos para garantir a temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 7 - Reator UASB (direita) seguido do reator LEAI (esquerda).

Fonte: Autor.

4.1.2 Alimentação

O sistema foi alimentado com esgoto sanitário, que era bombeado para reator UASB, cujo efluente era destinado ao reator LEAI.

O reator LEAI, além do esgoto sanitário, teve como alimentação, na fase sem aeração, o fermentado do glicerol, visando à ocorrência da desnitrificação, etapa que necessita de uma fonte externa de carbono, para servir de doador de elétrons e auxiliar na transformação de N-NO_3^- em N_2 e auxiliarem no processo de remoção de fósforo. Esse fermentado era inserido no reator LEAI com auxílio de uma bomba de baixa vazão, a qual estava ligada a um timer, e sua entrada era situada próxima à zona recirculação, buscando a melhor distribuição do glicerol no reator.

4.1.2.1 Esgoto Sanitário

O esgoto sanitário era proveniente do reservatório que recebe o efluente real advindo de um emissário municipal, localizado na Universidade de São Paulo, situada na cidade de

São Carlos, ao lado do prédio da Engenharia Ambiental e próximo ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB). A caracterização desse esgoto foi realizada previamente por Moura, Damianovic e Foresti (2012), monitorando 3 perfis diferentes, em abril, julho e novembro. Os autores observaram que as máximas concentrações de DQO ocorriam na parte da manhã, principalmente próximo às 12h00. As características principais do esgoto sanitário estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios dos parâmetros do esgoto sanitário coletado próximo ao Campus II, USP-São Carlos.

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

Fonte: Moura, Damianovic e Foresti (2012).

A variação da qualidade do esgoto e a escala do reator possibilitará testar o sistema em situação real.

4.1.2.2 Glicerol Fermentado

O glicerol (Glicerol PA de 99,5% de pureza, C₃H₈O₃) foi selecionado para ser utilizado como fonte externa de carbono no processo de desnitrificação e a matéria orgânica excedente auxiliar na remoção do fósforo. A fermentação deste substrato foi realizada antes de ser inserido no reator LEAI, uma vez que o glicerol, ao fermentar, se transforma em compostos mais facilmente assimiláveis tanto pelos organismos desnitrificantes quanto pelos organismos acumuladores de fósforo. A caracterização das concentrações médias do fermentado do glicerol está descrita na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização do fermentado de glicerol.

Compostos	Concentração (mg.L ⁻¹)
1,3-PDO ⁽¹⁾	311,83
Ácido acético	1081,16
Ácido butírico	227,62
Ácido capróico	0,20
Ácido cítrico	3,76
Ácido etanol	3676,22
Ácido fórmico	1159,77
Ácido iso butírico	9,79
Ácido iso valérico	7,62
Ácido láctico	1305,24
Ácido málico	28,50
Ácido metanol	78,49
Ácido n-Butanol	50,77
Ácido propiônico	208,80
Ácido succínico	315
Ácido valérico	5,93
Total de compostos gerados	8149,77

⁽¹⁾1,3 PDO: 1,3 propanodiol.

Fonte: Autor.

A fermentação foi realizada em bateladas simples e utilizou-se a concentração inicial de glicerol equivalente a 20 g.L⁻¹, conforme descrito no Apêndice I, onde se encontram os procedimentos e resultados da obtenção do fermentado do glicerol.

4.1.3 Material Suporte do reator LEAI

Como meio suporte para o reator LEAI, foram utilizadas 13 estruturas cilíndricas de espuma de poliuretano, cada uma com 3 cm de diâmetro e altura de 60 cm, cuja disposição no interior do reator pode ser visualizada no corte C-C da Figura 6. Hastes verticais de PVC foram utilizadas para a fixação das estruturas cilíndricas às grades situadas nas extremidades do reator. A Tabela 5 descreve as características do meio suporte.

Tabela 5 - Característica da espuma de poliuretano.

Espuma de Poliuretano	
Forma	Cilíndrica
Densidade (g.L^{-1})	22
Porosidade da espuma (%)	92

Fonte: adaptado SILVA *et al.* (2006).

4.1.4 Inóculos

Inoculou-se o reator UASB com lodo anaeróbico da estação de tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar, localizada no município de Tietê, estado de São Paulo, que apresentou as respectivas concentrações iniciais em termos de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (SVT) de 52 gST.L^{-1} e $40,5 \text{ gSVT.L}^{-1}$.

De acordo com Santos (2014), inoculou-se o reator LEAI, com uma mistura (50% em volume) de lodo biológico anaeróbico da estação de tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar e lodo proveniente de um sistema de lodos ativados com atividade nitrificante, da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP). Este último, apresentou as seguintes concentrações de sólidos: $5,7 \text{ gST.L}^{-1}$ e $1,5 \text{ gSVT.L}^{-1}$.

O lodo foi imobilizado nas estruturas de espuma, conforme a metodologia proposta por Zaiat *et al.* (1994). As estruturas de espuma de poliuretano foram inseridas em recipiente plástico, juntamente com a mistura de lodos, de forma a garantir o contato do lodo com todo o meio suporte. Após um período de 2 horas, retirou-se o excesso de lodo das espumas, e, em seguida inseriu-se no reator.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após a inoculação, o reator UASB foi operado durante uma semana com TDH de aproximadamente 24 h e vazão de alimentação (QA) de $0,38 \text{ L.h}^{-1}$. Adotou-se esse procedimento para que houvesse afluente suficiente para o reator LEAI, conectado em série a partir do segundo dia de operação.

No reator LEAI, inoculou-se o lodo no material suporte que foi fixado no reator, conforme o corte na Figura 6. Deu-se, então, a partida no sistema, iniciando-se a adaptação do lodo. Nos tempos 0 e 1 de dia de operação do sistema, este reator foi mantido somente em recirculação, após enchê-lo com esgoto real. A partir do dia 2, este foi conectado em série

com o reator UASB e operado com TDH de 24 h, com razão de recirculação equivalente a 3, e sob condições de aeração contínua até constatar-se a ocorrência de nitrificação (transformação de NH_4^+ no afluente em NO_3^- no efluente) superior a 80%. Tal situação foi alcançada no 7º dia de operação, com QA de $0,36 \text{ L.h}^{-1}$. Com isso, essa etapa visou a promover o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela nitrificação autotrófica, visto que os mesmos apresentam uma velocidade de crescimento menor que os demais organismos. Conforme Nocko (2008), a concentração de OD permaneceu entre o intervalo de 2,0 a $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

4.2.1. Operação em modo contínuo

Após a fase de adaptação, o reator LEAI passou a ser operado continuamente com aeração intermitente e TDH de 12 horas, preservando-se a razão de recirculação de 3. Este foi operado sob diferentes tempos de aeração e não aeração visando a melhoria da eficiência de remoção de DQO, N-total e PO_4^{3-} . A Tabela 6 sintetiza as diferentes fases de operação e suas condições operacionais.

Tabela 6 - Condições de aeração e não aeração operados no reator LEAI.

Fases de operação	Períodos de aeração intermitente (aerado / não aerado)	Inserção de fermentado de glicerol	Duração (dias)
I	2h/1h	Não	35
II	3h/1h	Sim	42
III	2h/1h	Não	35
IV	Aeração contínua	Não	21
V	3h/1h	Sim	44

Fonte: Autor.

Durante a aeração intermitente, a concentração de oxigênio dissolvido no meio permaneceu em torno $2,0$ a $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ nos períodos aerados e próxima a zero nos períodos não aerados, permitindo a ocorrência da NDS. Na etapa não aerada, da fase III e fase V foi inserido o fermentado do glicerol a uma vazão de $0,25 \text{ mL.h}^{-1}$.

4.2.2. Operação em batelada sequencial

Na última fase operacional, visando obter melhor eficiência no tratamento, optou-se por retirar a alimentação contínua do reator LEAI, inseriu-se um reservatório ($v = 15$ L com um sistema de extravasamento) intermediário entre os reatores, e assim, fez-se com que o reator LEAI operasse como um RSB.

O sistema de serpentina regulador de temperatura foi mantido, e o reator foi operado sob condições aeróbias, anaeróbias e anóxicas. Iniciou-se com a fase anaeróbia (ausência de oxigênio e nitrato), para auxiliar na seleção dos microrganismos acumuladores de fósforo. Seguiu-se na fase aeróbia (presença de oxigênio) para a ocorrência do acúmulo de fósforo no interior dos microrganismos acumuladores deste elemento e do processo de nitrificação. E por fim, finalizou-se com a fase anóxica para a ocorrência do processo de desnitrificação.

Durante todos os períodos anaeróbio, aeróbio e anóxico, foi utilizado a recirculação para garantir a mistura completa no reator. Durante a fase aerada, o compressor de ar foi ligado por um temporizador, obedecendo a faixa de OD adotada nas demais fases. No início de cada ciclo, 4 L do efluente eram retirados do reator com o auxílio de uma válvula solenoide acoplada em uma das saídas laterais do reator localizada no meio do mesmo. Em seguida, 4L de água residuária provenientes do reservatório a jusante do reator UASB eram adicionados ao reator. As condições de operação mais detalhadas do RSB foram mostradas na Tabela 7. Vale ressaltar, que ao retirar parte do efluente, uma parcela da biomassa suspensa no meio também saía do reator.

Tabela 7 - Condição de operação do RSB na sexta fase de operação do reator.

Parâmetros	Valores
Período anaeróbico (min)	90
Período aeróbico (min)	120
Período anóxico (min)	150
OD na fase anaeróbica (mg.L^{-1})	< 0,5
OD na fase aeróbica (mg.L^{-1})	$2,5 \pm 0,8$

Fonte: Autor.

No período anóxico foi inserido o fermentado do glicerol $Q = 0,18 \text{ mL.h}^{-1}$, vazão inferior ao inserido nas etapas no modo operacional contínuo. Essa alteração de vazão do glicerol no sistema ocorreu em função da DQO remanescente no sistema ter sido considerada

elevada. Assim, na tentativa de diminuir a concentração de matéria orgânica efluente, tomou-se a decisão de reduzir a carga de entrada. A duração da fase VI foi de 49 dias.

A Figura 8 mostra o fluxograma das condições experimentais avaliadas neste trabalho.

Figura 8 - Fluxograma experimental do LEAI.

(1) Sem glicerol como fonte exógena de carbono

(2) Com glicerol

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Análises Físico-Químicas

As variáveis que foram analisadas durante o experimento estão apresentadas na Tabela 8, tanto para amostras do esgoto sanitário, quanto para as saídas dos reatores UASB e LEAI. O oxigênio dissolvido no meio líquido do reator foi monitorado com sonda de membrana da marca Thermo, modelo Orion 810A+. As amostras efluentes foram previamente filtradas em membrana de fibra de vidro (0,22 μm) para a realização das análises de N-NO_2^- , N-NO_3^- , N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} . Para as análises de DQO e NTK as amostras não foram filtradas. Sólidos totais, suspensos e voláteis foram monitorados quinzenalmente. Na realização do perfil temporal, as amostras foram retiradas do efluente do reator LEAI durante as fases aeradas e não aeradas, em intervalos de 15 a 30 minutos.

Tabela 8 - Periodicidade das análises do sistema.

Parâmetro	Método	Periodicidade (por semana)	Referência
pH	Potenciométrico	2 a 3	APHA (2005) 4500-H ⁺ B
Alcalinidade	Titulométrico	2 a 3	Dillalo e Albertson modificado por Ripley <i>et al.</i> (1961)
Ácidos Voláteis	Cromatografia - HPLC	-	Penteado <i>et al.</i> (2012)
DQO	Espectrofotométrico	2 a 3	APHA (2005) 5220 D
Glicerol	Enzimático	2 a 3	GREENHILL (2003),
N-NO_2^-	Cromatografia de íons	2 a 3	APHA (2005) 4500- NO_2^- C
N-NO_3^-	Cromatografia de íons	2 a 3	APHA (2005) 4500- NO_3^- C
N-NH_4^+	Cromatografia de íons/ Espectrofotométrico	Eventual	APHA (2005) 4110-B, APHA (2005) 4500-F
P-PO_4^{3-}	Cromatografia de íons	2 a 3	APHA (2005) 4500-P E
SST	Gravimétrico	quinzenal	APHA (2005) 2540 D
SSV	Gravimétrico	quinzenal	APHA (2005) 2540 E
SSF	Gravimétrico	quinzenal	APHA (2005) 2540 E
OD	Sonda Thermo	2 a 3	-

Fonte: Autor.

A quantificação da concentração de N-NO_2^- , N-NO_3^- , N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} foi realizada em cromatógrafo de íons Dionex (modelo ICS 5000®), equipado com detector de condutividade e duas colunas diferentes (colunas IonPac® AG23 Anion-Exchange Column e IonPac® CG12A Cation-Exchange Column), operando à temperatura de 30°C. O fluxo adotado foi de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e as fases móveis correspondentes foram: (I) para determinação de ânions: solução de carbonato de cálcio e bicarbonato de cálcio (4,5 e 0,8 mM) e (II) para determinação de cátions: solução de ácido sulfúrico (40 mM). A determinação de N-NH_4^+ foi quantificada pela cromatografia somente nos perfis temporais; nas análises semanais, utilizou-se o método espectrofotométrico.

4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Além das análises físico-químicas do reator LEAI, também foram realizados ensaios microbiológicos em algumas das fases operacionais com o objetivo de caracterizar a morfologia e verificar possíveis variações na microbiologia do reator em decorrência das alterações operacionais.

4.4.1 Microscopia óptica

Para a avaliação microscópica da biomassa, foi utilizado um microscópio óptico de contraste de fase Olympus BX60, acoplado à câmara com captura de imagem Evolution QE e software Image-Pro Plus 4.5. Uma gota de amostra era colocada sobre uma fina camada de Ágar 2% solidificado, disposto entre lâmina e lamínula, a fim de diminuir o movimento das células na amostra.

4.4.1.1 Coloração de Neisser

A técnica de identificação de grânulos intracelulares de polifosfato (reservas energéticas de organismos) é conhecida como Coloração de Neisser. Esta coloração pode ser classificada em dois grupos, o Neisser positivo e o Neisser negativo. A metodologia para aplicação do tratamento foi descrita por Jenkins *et al.* (1993).

Tem-se que para a aplicação do método são necessária duas soluções. A primeira consiste em uma mistura entre as soluções A e B na proporção de 2:1 em volume/volume. A solução A

é composta pelo corante o azul-de-metilo (catiônico), e a B por etanol 95%, por ácido acético glacial e água deionizada. A segunda solução é Bismark Bown diluído.

Após a preparação das soluções, o procedimento padrão para a preparo de lâminas foi executado, no qual depositou-se uma gota da amostra em uma lâmina previamente limpa, e durante um período de 30 minutos a amostra permaneceu em repouso para a evaporação da água. Após secagem natural das amostras em lâmina, inseriu-se a primeira solução na lâmina, e, então, esperou-se 1 minuto de repouso, para na sequencia lavar a lâmina em água corrente. Em seguida, a lâmina foi coberta pela segunda solução, e, após o tempo de 1 minuto a lâmina foi lavada novamente e seca. Após este tratamento, a lâmina foi examinada em óleo de imersão.

A aplicação do tratamento com o corante azul-de-metileno resulta, então, em duas colorações possíveis, coloração azul-violeta, indicando que o organismo identificado é Neisser positivo e, por tanto, acumulador de grânulos de polifosfato ou coloração amarelo-castanha, para Neisser negativo.

4.4.1.2 Coloração de Polihidroxibutirato (PHB)

Os grânulos de PHB, tais como grânulos de polifosfato, são reservas energéticas intracelulares para determinados organismos. De acordo com Jenkins *et al.* (1993), o uso do corante Negro de Sudão B, determina a presença de PHB e consequentemente, possibilita a identificação de organismos acumuladores deste polímero.

Na aplicação deste método, duas soluções são necessárias. A primeira solução consiste em uma mistura de corante Negro de Sudão B com etanol 60%. A segunda solução é composta por safranina dissolvida em água deionizada.

Assim, depositou-se uma gota da amostra em lâmina previamente limpa e deixou por 30 minutos a amostra em repouso para secar. Após secagem natural das amostras em lâmina, cobriu-se a área tomada pela amostra com a primeira solução, e então, esperou o tempo de 10 minutos até que a lâmina fosse lavada rapidamente em água corrente. Em seguida, a lâmina foi coberta pela segunda solução, após o tempo de 10 segundos a lâmina foi lavada novamente e seca.

Após a aplicação dos corantes, a lâmina foi examinada em óleo de imersão, sendo que para casos em que PHB está presente, as células tornam-se escuras, enquanto que na ausência intracelular de PHB o citoplasma apresenta-se em uma coloração magenta.

4.5 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE MONITORAMENTO DO SISTEMA

Para monitorar e verificar o desempenho do sistema, a partir das análises físico-químicas, os cálculos descritos abaixo foram realizados. Para o cálculo das eficiências de oxidação de NTK e de remoção de N-total foram utilizadas as equações (15) e (16), respectivamente. A eficiência de oxidação de NTK foi obtida comparando as concentrações de NTK afluentes e efluentes. A concentração de N-total foi obtida pela soma das concentrações de nitrogênio nas formas de NTK, N-NO_2^- e N-NO_3^- .

$$E_{\text{Ox. NTK}} = \frac{[\text{NTK}]_{\text{AF}} - [\text{NTK}]_{\text{EF}}}{[\text{NTK}]_{\text{AF}}} \cdot 100 \quad (15)$$

Em que:

$E_{\text{Ox. NTK}}$ = Eficiência de oxidação de NTK [%];

$[\text{NTK}]_{\text{AF}}$ = Concentração afluente de NTK [mg.L^{-1}];

$[\text{NTK}]_{\text{EF}}$ = Concentração efluente de NTK [mg.L^{-1}].

$$E_{\text{Rem.N}} = \frac{([\text{NTK}] + [\text{N-NO}_2^-] + [\text{N-NO}_3^-])_{\text{AF}} - ([\text{NTK}] + [\text{N-NO}_2^-] + [\text{N-NO}_3^-])_{\text{EF}}}{([\text{NTK}] + [\text{N-NO}_2^-] + [\text{N-NO}_3^-])_{\text{AF}}} \cdot 100 \quad (16)$$

Em que:

$E_{\text{Rem.N}}$ = Eficiência de remoção de nitrogênio total;

$([\text{NTK}] + [\text{N-NO}_2^-] + [\text{N-NO}_3^-])_{\text{AF}}$ = Soma das concentrações dos compostos nitrogenados afluente [mg.L^{-1}];

$([\text{NTK}] + [\text{N-NO}_2^-] + [\text{N-NO}_3^-])_{\text{EF}}$ = Soma das concentrações dos compostos nitrogenados efluente [mg.L^{-1}].

A eficiência da desnitrificação foi obtida por meio da equação (17).

$$E_{\text{des.}} = \left(1 - \frac{([\text{N-NO}_2^-] + [\text{N-NO}_3^-])_{\text{EF}}}{([\text{NTK}]_{\text{AF}} \cdot E_{\text{Ox. N-NH}_4^+})} \right) \cdot 100 \quad (17)$$

Em que:

$([N-NO_2^-] + [N-NO_3^-])_{EF}$ = Soma das concentrações de $N-NO_2^-$ e NO_3^- efluente $[mg.L^{-1}]$.

Em relação ao parâmetro fósforo, a eficiência de remoção foi obtida por meio da equação (18).

$$E_{Rem.P-PO_4^{3-}} = \frac{[PO_4^{3-}]_{AF} - [PO_4^{3-}]_{EF}}{[PO_4^{3-}]_{AF}} \cdot 100 \quad (18)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FASE DE ADAPTAÇÃO

A etapa de adaptação da biomassa no reator teve como objetivo principal favorecer o desenvolvimento dos microrganismos nitrificantes. Para tanto, o reator LEAI foi submetido à condição de aeração contínua, durante 8 dias, e operou com um TDH médio de $23,0 \pm 0,8$ horas.

De acordo com Moura (2011), 35 dias de operação com aeração contínua e TDH de 24 horas foram necessários para estabelecer condições favoráveis ao desenvolvimento da biomassa nitrificante. Segundo Santos (2014), para acelerar o *start up* do sistema de tratamento com o intuito de remover compostos nitrogenados, lodo aeróbio com característica nitrificante deve ser adicionado ao lodo anaeróbio. No trabalho de Santos (2014), foram necessários 9 dias de operação para se obter nitrificação superior a 50%.

Assim, nesta pesquisa, uma mistura de 50% de lodo anaeróbio e 50% de lodo aeróbio foi utilizada como inóculo, e ao constatar a presença de microrganismos nitrificantes, a fase de adaptação foi finalizada, uma vez que 80% do N-amoniaco havia sido convertido a nitrato. Nos tempos 0 e 1 de dias de operação do reator LEAI, este foi mantido somente em recirculação para promover a fixação do inóculo no material suporte. A Figura 9 demonstra as variações das concentrações efluentes de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ nesse período equivalente ao 7º dia de operação.

Figura 9 - Concentrações de N-amoniacal, N-nitrato e N-nitrito durante a etapa de adaptação.

Fonte: Autor.

Iniciou-se a coleta de dados no 2º dia de operação, pois, foi neste dia que o sistema foi aberto e operado continuamente. Observa-se, na Figura 9, o 7º dia operacional, em que houve um aumento na concentração de N-nitrato ($17,31 \text{ mg.L}^{-1}$) acompanhado por uma redução da concentração de N-amoniacal ($6,43 \text{ mg.L}^{-1}$) e N-nitrito ($0,11 \text{ mg.L}^{-1}$). O decréscimo da concentração de nitrato atingiu 82%, fato este que justificou a mudança de operação do sistema, para um sistema com aeração intermitente e em um TDH reduzido. Além disso, no 7º dia de operação, ocorreu a queda da alcalinidade e do pH como consequência do processo de nitrificação. Assim, o pH do meio estava 5,34 e a alcalinidade igual a zero (0). Com isso, decidiu-se iniciar as operações com aeração intermitente no reator LEAI.

5.2 OPERAÇÃO DO REATOR EM MODO CONTÍNUO

5.2.1 Remoção de compostos nitrogenados

Após a adaptação da biomassa no reator, deu-se início às fases operacionais, descritas na Tabela 6. O reator passou a operar com TDH equivalente a $12,0 \pm 0,6$ horas e aeração intermitente. A razão de recirculação foi mantida igual a 3.

A Figura 10 mostra a variação da concentração de N-total afluente, efluente e a eficiência de remoção de N-total durante todo o período experimental operado em modo contínuo.

Figura 10 - Variação da concentração de N-total afluente, efluente e eficiência de remoção durante as fases experimentais operadas em modo contínuo.

Fonte: Autor.

Analisando a Figura 10, observa-se que as fases I, II e IV apresentaram baixas eficiências de remoção de N-total, o que pode estar relacionado com a baixa disponibilidade de doares de elétrons (matéria orgânica), visto que, nessas fases, não foi adicionada fonte exógena de carbono. Havia uma baixa relação DQO/N e, assim, pouca matéria orgânica para a ocorrência da desnitrificação heterotrófica. Os dados de relação DQO/N presentes em cada fase e as eficiências de remoção de N-total se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 - Relação DQO/N, concentrações médias de N-total afluente e efluente e eficiência de remoção de N-total ao longo do período experimental.

Fases operacionais	DQO/N	N-total (mg.L ⁻¹)		Eficiência de remoção de N-total (%)
		Afluente	Efluente	
I	2,0 ± 1,0	60,6 ± 25,5	29,8 ± 13,5	49,6 ± 13,5
II	2,5 ± 0,7	41,3 ± 14,2	29,3 ± 10,1	29,2 ± 10,1
III	8,5 ± 6,9	119,0 ± 77,2	38,4 ± 21,6	64,9 ± 21,6
IV	3,2 ± 1,7	43,1 ± 17,9	31,3 ± 11,5	24,5 ± 11,5
V	7,8 ± 4,1	78,8 ± 34,2	24,1 ± 11,7	69,5 ± 11,7

Fonte: Autor.

De acordo com He, Xue e Wang (2009), sistemas NDS com bactérias aeróbias heterotróficas e bactérias desnitrificantes necessitam de relação C/N ou DQO/N elevada para

uma eficiente remoção N-total. Para tanto, uma quantidade significativa de matéria orgânica deve estar disponível ao longo do processo de difusão no biofilme. Nesse trabalho, ao utilizarem um reator NDS biológico para tratar água residuária sintética, os autores constataram que, ao adequar a quantidade de matéria orgânica para o sistema, a eficiência de remoção de N-total aumentou 66%, passando de 30,3% para 89,9%. Diante disso, verificaram que o aumento da disponibilidade de matéria orgânica, além de satisfazer as necessidades dos microrganismos aeróbios heterotróficos, servem de substrato aos microrganismos desnitrificantes devido a DQO remanescente no sistema.

Silva (2016), em seu trabalho, operou um reator LEAI como unidade de pós-tratamento de um UASB sem adição de fonte exógena de carbono e, na condição de 2 horas aerando e 1 hora sem aeração, obteve eficiência de remoção de N-total de 26%, eficiência esta inferior à obtida nesta pesquisa sob as mesmas condições.

Na fase II, além da baixa relação DQO/N, a baixa eficiência de remoção N-total pode estar associada também ao fato de que a temperatura não foi mantida constante na faixa de 25°C a 30°C. A câmara que a mantinha constante apresentou defeito e então, após essa constatação, utilizou-se um sistema de serpentina ao redor do reator para a manutenção da temperatura, conforme descrito no item 4.1.1.

Na fase III (2 horas com aeração/ 1 hora sem aeração), o valor DQO/N foi alto em comparação com as relações das fases I e II, e com isso apresentou uma eficiência de N-total superior que ambas.

Barana *et al.* (2013) obtiveram na pesquisa eficiência de remoção de N-total equivalente a 30%, ao operar um reator LEAI sob aeração intermitente (2 horas aerando/1 hora sem aeração), em TDH de 24 horas e relação DQO/N = 7,18. Como observado na Tabela 9, o presente trabalho, na fase III, operou sob mesma condição de aeração que Barana *et al.* (2013), com uma relação DQO/N próxima e em TDH menor. Observa-se que, com menor valor de TDH e uma relação DQO/N ligeiramente superior, a eficiência de remoção de N-total (64,9%) foi mais elevada.

Na fase IV, como a operação foi de aeração contínua, além da DQO/N baixa, um outro fator limitante na remoção de N-total foi a condição a que o sistema estava submetido, pois a aeração favorece o processo de nitrificação, mas não o de desnitrificação. Como o sistema estava submetido à condição de aerobiose, a ação dos microrganismos desnitrificantes foi inativada, gerando acúmulo de N-NO_3^- no sistema.

Comprovando as afirmações de He, Xue e Wang (2009), a comparação entre as fases I e III, e, entre II e V, mostrou que, quando operado com a mesma duração dos períodos de

aeração e não aeração, o aumento da relação DQO/N melhorou a eficiência de remoção de N do sistema.

Em relação à oxidação de NTK, a Figura 11 apresenta a variação de NTK afluyente, efluente e eficiência de oxidação no decorrer das fases experimentais.

Figura 11 - Variação da concentração de NTK afluyente, efluente e eficiência de oxidação.

Fonte: Autor.

Observando a fase I (2 horas aerando/ 1 hora sem aeração; sem adição de fonte exógena de carbono), verificou-se que no 23º dia houve uma queda na eficiência de remoção, a qual permaneceu baixa até o 34º dia. Nessa faixa, o valor mínimo de NTK efluente atingiu o valor de 46 mg.L⁻¹. Constatou-se que a concentração de OD dissolvido não permanecia no intervalo desejável (2,0 a 3,5 mg.L⁻¹). Com isso, foi adotada a estratégia sugerida por Santos (2014) da substituição da pedra porosa, após formular a hipótese de dificuldade de difusão do ar no interior do reator. Além do mais, o aerador utilizado em aquário foi substituído por um compressor de ar, por julgar mais eficiente. Tais medidas foram eficazes até o 42º dia, visto que, após esse dia, a eficiência de oxidação de NTK reduziu novamente. Diante desse fato, além da troca da pedra porosa, optou-se como outra estratégia: aumentar a fase aerada em uma hora, para favorecer os organismos nitrificantes, iniciando, assim, a fase II do procedimento experimental.

A redução do fluxo de OD também justifica a redução na eficiência de remoção de N-total verificada na fase I (Figura 10) e, ao regulá-lo, houve melhorias nesse parâmetro.

No trabalho de Silva (2016), a oxidação de NTK, para a fase de operação semelhante à fase I desta pesquisa, atingiu eficiência de oxidação média de 80%, enquanto na fase I foi obtida eficiência média equivalente a 70%. As hipóteses apresentadas anteriormente podem justificar essa diferença na oxidação de NTK.

A segunda fase operacional (3 horas aerando/1 hora sem aeração; sem adição de fonte exógena de carbono), apresentou eficiência de oxidação superior à primeira, apresentando uma eficiência média de oxidação de NTK de 74%. Tal procedimento foi eficaz até o 77º dia de operação, quando ocorreu a redução da eficiência de 81% para 53%. Como estratégia, a pedra porosa foi novamente substituída, fato este que não contribuiu para recuperação do sistema. Assim, elaborou-se a hipótese de que a relação DQO/N estava baixa e a quantidade de matéria orgânica não era suficiente para auxiliar os microrganismos heterotróficos. Com isso, iniciou-se a inserção do fermentado do glicerol (fonte exógena carbonácea) no sistema, somente na fase de não aeração (Fase III).

Na terceira fase operacional (2 horas aerando/ 1 hora sem aeração; com adição de fonte exógena de carbono) observou-se que, em relação à eficiência de oxidação de NTK, não houve melhoras em relação à fase operacional I (que operou na mesma variação de aeração e não aeração). Em ambas, a eficiência média foi praticamente igual 70% (fase I) e 69% (fase II). Contudo, em relação à remoção de N-total (Tabela 9), houve melhora significativa justificada pelo fato de o aumento de DQO/N ter favorecido o processo de remoção de N-total.

Vale ressaltar que apesar dos valores altos de eficiência, essa fase apresentou os maiores valores médios tanto de NTK ($26,3 \pm 14,6 \text{ mg.L}^{-1}$) quanto de N-total ($38,4 \pm 21,6 \text{ mg.L}^{-1}$). Os valores afluentes desse parâmetro foram superiores que nas demais fases operacionais, em função, possivelmente, de uma sobrecarga orgânica temporária, como um lançamento que ocorreu durante o monitoramento da fase V.

Em relação à fase IV (aeração contínua), verificou-se eficiência de oxidação de NTK significativa e superior às fases I, II, III e V, pois, nessa etapa, o reator foi operado sob aeração contínua, condição essa essencial para o favorecimento da nitrificação, ou seja, da oxidação do NTK. Optou-se pela aeração contínua após ser verificado que houve redução na eficiência de oxidação de NTK para 53% (no 119º dia de operação). Assim, decidiu-se aerar continuamente com o objetivo de favorecer o desenvolvimento dos microrganismos nitrificantes, visto que se observou, no final da etapa III, aumento de biomassa heterotrófica, o

que pode ter inibido ou dificultado a difusividade de OD para as nitrificantes. Tal hipótese foi proposta pelo fato de esses microrganismos apresentarem velocidade de crescimento menor que a dos microrganismos heterotróficos (WIJFFELS e TRAMPER, 1995; ROSTRON *et al.*, 2001).

A oxidação de NTK na fase V (3 horas aerando/ 1 hora sem aeração; com adição de fonte exógena de carbono) apresentou eficácia semelhante à da fase II, demonstrando que a adição de matéria orgânica não interferiu significativamente nessa etapa de oxidação.

Na Tabela 10, as variações de NTK afluente, efluente e a eficiência de oxidação de NTK estão detalhadas.

Tabela 10 - Variações das concentrações de NTK e NH_4^+ afluente, efluente e eficiência de oxidação de NTK.

Fases operacionais	NH_4^+ LEAI (mg.L^{-1})		NTK LEAI (mg.L^{-1})		Eficiência de oxidação de NTK (%)
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	
I	$37,8 \pm 14,6$	$14,6 \pm 11,1$	$59,9 \pm 25,5$	$18,2 \pm 12,9$	$69,9 \pm 14,8$
II	$28,1 \pm 9,3$	$9,5 \pm 7,1$	$40,8 \pm 14,1$	$11,4 \pm 8,8$	$74,4 \pm 14,9$
III	$44,7 \pm 19,5$	$30,1 \pm 20,9$	$91,4 \pm 58,7$	$26,3 \pm 14,6$	$69,1 \pm 9,0$
IV	$29,8 \pm 11,6$	$7,4 \pm 4,2$	$58,4 \pm 27,7$	$10,9 \pm 6,9$	$82,4 \pm 6,2$
V	$39,5 \pm 10,9$	$19,5 \pm 10,9$	$75,7 \pm 32,6$	$21,4 \pm 10,9$	$72,4 \pm 9,7$

Fonte: Autor.

Na Tabela 10, também estão apresentados os valores de N-NH_4^+ afluentes e efluentes. Quando se compara os valores obtidos aos valores padrões de lançamento de efluentes propostos pela CONAMA 410/2011, verifica-se que as concentrações encontradas, em sua maioria, apresenta a concentração pertencente ao limite exigido pela legislação (máximo 20 mg.L^{-1}). Com isso, esse parâmetro após o tratamento no reator LEAI atende a CONAMA 410, exceto na fase III, a qual apresentou problemas com o processo de nitrificação e por isso iniciou-se a fase de aeração contínua.

Tabela 11 - Teores de NO_2^- e de NO_3^- e eficiência de nitrificação e de desnitrificação.

Fases operacionais	Teor de NO_2^- efluente (%)	Teor de NO_3^- efluente (%)	Eficiência de nitrificação (%)	Eficiência de desnitrificação (%)
I	4,66	9,83	$69,9 \pm 14,8$	$68,6 \pm 26,0$
II	13,54	9,10	$74,4 \pm 14,9$	$38,3 \pm 27,1$
III	2,23	3,53	$69,1 \pm 9,0$	$87,0 \pm 19,8$
IV	0,09	28,61	$82,4 \pm 6,2$	$40,0 \pm 27,1$
V	0,09	3,99	$72,4 \pm 9,7$	$72,4 \pm 3,8$

Fonte: Autor.

Na Tabela 11, estão descritos os teores de nitrato e de nitrito, juntamente com a eficiência de nitrificação (oxidação de NTK) e de desnitrificação. Por meio da mesma, evidencia-se que nas fases com maiores eficiências de desnitrificação (Fases III e V), foram observados os menores teores efluentes de NO_3^- e NO_2^- .

Na fase IV em que foi operado sob aeração contínua, verifica-se o maior teor de NO_3^- , maior eficiência de nitrificação e uma das menores eficiência de desnitrificação, comprovando que a presença de oxigênio favorece a somente nitrificação.

Na fase III, como descrito no item 4.2, ocorreu um problema com a manutenção da temperatura, fato este que justifica a baixa eficiência de desnitrificação, juntamente com a ausência de inserção do fermentado do glicerol.

Na Figura 12, tem-se a composição média das espécies nitrogenadas em cada fase operacional juntamente com o a remoção de N-total em cada fase.

Figura 12 - Composição do efluente do LEAI e remoção de N-total ao longo do procedimento experimental.

Fonte: Autor.

Hooper *et al.* (1997) e Chiu *et al.* (2007) observaram que ao submeter o sistema de tratamento a uma baixa relação DQO/N ou C/N, ocorreu o acúmulo de N-NO_2^- e N-NO_3^- , demonstrando que a nitrificação é o processo predominante. Contudo, quando esta relação apresentou um valor elevado, verificaram que todos os componentes nitrogenados intermediários foram identificados em concentrações inferiores, podendo obter valores menores que os limites de detecção dos métodos de análise. Assim, confirma-se que um processo NDS eficiente ocorre quando as taxas de nitrificação e desnitrificação estão em um

equilíbrio harmonioso, acumulando quantidades muito baixas de nitrito e nitrato no sistema (VON MÜNCH; LANT; KELLER,1996; ZENG *et al.*, 2003).

Tal ocorrência foi identificada na pesquisa, como mostra a Figura 12. Na fase V, quando o sistema operou com a maior relação DQO/N (7,8), foram obtidos os menores valores de N-NO_2^- e N-NO_3^- e os maiores valores de remoção de N-total. Todavia, as fases I, II e IV, com relações DQO/N igual a 2; 2,5 e 3,2, respectivamente, mantiveram a maior parcela de N-NO_2^- e N-NO_3^- , tendo ocorrido, portanto, a predominância do processo de nitrificação.

Em relação à fase IV, verifica-se que a aeração contínua favoreceu o processo de nitrificação completa, apresentando a maior composição média de N-NO_3^- da operação em modo contínuo.

5.2.2 Remoção de DQO

A Figura 13 demonstra a variação de DQO ao longo dos 187 dias de operação do sistema em modo contínuo. Nesta estão representados os resultados de DQO presente no efluente real, advindo da rede; de DQO do UASB; de DQO do LEAI e da eficiência global do sistema, esta última, representada pela matéria orgânica removida no UASB e no LEAI.

Figura 13 - Variação da concentração de DQO afluyente, efluente e eficiência de remoção.

Fonte: Autor.

O valor de DQO médio do esgoto, da saída do UASB e da saída do LEAI estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Variações das concentrações de DQO afluyente, efluente e eficiência de remoção.

Fases operacionais	DQO (mg.L ⁻¹)			Eficiência Global de remoção (%)
	Esgoto	UASB	LEAI	
I	243 ± 63	67 ± 16	50 ± 18	79 ± 8
II	311 ± 72	98 ± 18	59 ± 14	80 ± 8
III	463 ± 210	128 ± 24	53 ± 22	87 ± 5
IV	445 ± 185	110 ± 13	26 ± 8	93 ± 3
V	397 ± 233	114 ± 37	40 ± 22	87 ± 8

Fonte: Autor.

Observou-se que o sistema apresentou alta eficiência em toda operação. As menores eficiências de remoção estão associadas com as concentrações de DQO afluyente mais baixas. A variação na concentração de DQO do afluyente ocorreu devido as variações sazonais das características do esgoto.

As parcelas de DQO removida nas fases operacionais I, II, III, IV e V foram de 193, 252, 410, 419 e 357 mg.L⁻¹, respectivamente. Tal comportamento indica estabilidade com relação à remoção de matéria orgânica nessa configuração de reator, visto que, apesar da variação da concentração afluyente, a saída pós LEAI é estável, variando na faixa de 26 a 59 mg.L⁻¹.

Silva (2016) avaliou o comportamento da remoção de DQO e nitrogênio em reator de leito fixo e estruturado, como unidade de pós-tratamento do UASB, operando com aeração intermitente e vazão de recirculação igual a 3, submetendo o sistema a diferentes tempos de detenção hidráulica. O autor obteve faixa de concentração efluente do LEAI entre 26,6 e 46,4 mg.L⁻¹. Tal valor é bem próximo aos obtidos nessa pesquisa.

Moura (2014) operou um LEAI para tratar esgoto doméstico e obteve DQO de saída entre 37 a 53 mg.L⁻¹. Barana *et al.* (2013) também trabalharam com esta configuração de reator, porém, o objetivo foi o pós-tratamento de efluente de abatedouro de aves. Nesse estudo, o reator foi submetido a diferentes condições de aeração intermitente. Observou-se que a eficiência de remoção de DQO permaneceu acima de 88% ao longo de todo o experimento, com DQO efluente na faixa de 24 a 69 mg.L⁻¹.

O LEAI se mostrou eficiente e estável quanto à remoção de matéria orgânica em diversos trabalhos. Neste sistema, a matéria orgânica pode ser removida pela respiração aeróbia na fase aerada ou pela desnitrificação heterotrófica na fase anóxica. Observa-se que a fase IV foi a etapa que resultou na melhor remoção de DQO, fato este associado à condição de aeração contínua, na qual predominam os microrganismos aeróbios.

Os resultados encontrados neste estudo assemelham aos encontrados por Silva (2016), Moura (2014) e Barana *et al.* (2013), no que diz respeito à quantidade de DQO remanescente no sistema. Em se tratando da remoção conjunta de matéria orgânica e nitrogenada, verificou-se, nesses trabalhos, a robustez do sistema, visto que o reator LEAI permite a ocorrência da desnitrificação heterotrófica como um processo concorrente com a oxidação da matéria orgânica tendo O_2 como receptor final de elétrons. Assim, com o controle adequado da OD, pode-se promover a remoção de parte da carga carbonácea pela desnitrificação, reduzindo a necessidade de aporte de oxigênio.

5.2.3 Remoção de fósforo

Durante todas as fases, foram determinadas as concentrações de fósforo afluente e efluente no reator. A Figura 14 apresenta o comportamento do fósforo ao longo da operação do reator.

Figura 14 - Comportamento do composto fósforo ao longo de todo período operacional.

Fonte: Autor.

Observou-se, nas fases I, II, III, IV e V, a ausência de variação significativa na concentração de fósforo afluente e efluente, indicando que o sistema não foi eficiente na remoção deste composto. A deficiência na remoção de fósforo pode estar associada ao fato de que, para que ocorra a remoção deste composto, é necessário que se tenha uma etapa anaeróbia seguida de uma aeróbia, sendo ambas as etapas bem determinadas no reator. Como nas cinco primeiras fases o reator foi operado continuamente, com carga afluente entrando constantemente no reator, é provável que essa condição tenha sido desfavorável para o estabelecimento da população de microrganismos acumuladores de fósforo.

O processo de remoção do fósforo dita que, na etapa anaeróbia, os organismos acumuladores de fósforo armazenam ácidos voláteis, como polihidroxibutirato (PHB), liberando, então, fosfato para o meio líquido, a partir da quebra das moléculas de polifostato. Essas moléculas são armazenadas no interior destes organismos, com a finalidade de obter energia. Na etapa aeróbia, estes microrganismos metabolizam a reserva interna de PHB para remover o fósforo presente no meio líquido, que é armazenado em excesso por estes microrganismos como polifosfato. Assim, o fósforo é removido efetivamente quando essa massa de microrganismos acumuladores de fósforo sai do sistema (VAN LOODSDRECHT *et al.*, 1997; WEF, 2010).

Durante toda a operação do reator em modo contínuo (fases I, II, III, IV e V), a remoção de fósforo não foi constatada. Houve variação significativa da concentração do mesmo, sendo que, em determinados momentos, a concentração de saída apresentava seu valor maior que o de entrada, mesmo em amostras coletadas na fase aeróbia. Como as melhorias não foram suficientes para atender as diretrizes, novos estudos são necessários para aperfeiçoar a remoção deste parâmetro.

5.2.4 Perfis temporais do reator em modo contínuo

Com a finalidade de analisar como as características do efluente se comportavam no decorrer dos períodos de aeração e não aeração, realizou-se o perfil temporal do efluente do reator, avaliando o comportamento das concentrações de OD, DQO, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- e P-PO_4^{3-} . Este perfil foi realizado nas fases III e V, pois foram nestas fases que houve tanto variação da aeração quanto inserção do glicerol fermentado. As amostras foram coletadas em intervalos de 15 a 30 minutos e a concentração de OD também foi verificada. Além desses parâmetros, a temperatura foi monitorada e a mesma se apresentou praticamente constante.

Como dito no item 4.3.2, o fluxo contínuo do reator foi cessado, o seu volume totalmente preenchido e assim iniciou a verificação comportamental dos compostos.

Primeiramente, realizou-se, nos 98º, 99º e 100º dias de operação, a triplicata do perfil do reator, sob condição de duas horas de aeração e uma hora sem aerar (Fase III), a qual está representada, por meio da média, na Figura 15.

Figura 15 - Perfil do reator sob condição de duas horas aerando e uma hora sem aerar.

Fonte: Autor.

Por meio desta figura, ficou evidenciado que o processo de oxidação da amônia, na fase aerada, ocorreu nos 40 minutos iniciais, transformando-a em nitrito, nitrato e alguns compostos intermediários. Também observou-se que, na fase não aerada, houve o consumo quase total de nitrito e nitrato, demonstrando que os organismos desnitrificantes estavam ativos no sistema.

Em relação ao fósforo, foi notório que, na fase aerada, ocorreu a absorção do fosfato do meio e, na fase não aerada, a liberação para a parcela líquida. Diante disso, verifica-se que essa configuração do sistema, não favoreceu a remoção estável deste composto, pois, durante o período aerado, o reator mostrou-se apto para remoção, mas não houve acúmulo na biomassa, pois o fósforo retorna à fase líquida na fase sem aeração. Entretanto, quando se interrompia a aeração, o efluente apresentava concentração de fósforo mais elevada que a do afluente. Uma possível explicação é que, a alimentação contínua sob aeração intermitente apresenta, na saída do tratamento, efluente também na fase anaeróbia/anóxica, na qual o fósforo é liberado para o meio. Além disso, a alimentação contínua não permite o estabelecimento de condições anaeróbias e anóxicas estáveis no reator, requeridas no processo de remoção de fósforo.

Analisando a DQO neste perfil, verificou que, na fase aerada, houve o consumo de uma parcela significativa de matéria orgânica, não ficando disponível então, o suficiente para o processo de desnitrificação. Assim, a inserção da fonte exógena de carbono mostrou-se indispensável.

Ao inserir glicerol fermentado no reator, observou a elevação imediata da DQO, e o seu consumo no decorrer da desnitrificação. Contudo, verificou que a concentração de fermentado inserido estava em excesso, pois, ao fim do ciclo sobrou DQO remanescente.

Por fim, em relação a Figura 15, observou que, durante a fase aerada, o OD foi mantido próximo a $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$, valor este pertencente ao intervalo requerido neste trabalho para este parâmetro. Quando a aeração foi cessada, houve a rápida redução do OD disponível e o favorecimento dos processos anóxicos.

Nos dias 165, 166 e 167 de operação, realizou-se o perfil temporal (triplicata) da fase V, que ocorreu sob condição de 3 horas aerando e 1 hora sem aeração. A representação gráfica do mesmo está disposta na Figura 16.

Figura 16 - Perfil do reator sob condição de três horas aerando e uma hora sem aerar.

Fonte: Autor.

Essa condição operacional foi adotada mesmo com o perfil anterior indicando que o período de 2h era suficiente para nitrificar, uma vez que, nos dias subsequentes ao perfil da fase III, houve uma redução da eficiência de oxidação de NTK, chegando à eficiência de somente 53% de oxidação. Assim, jugou-se necessário aumentar o tempo de exposição dos microrganismos nitrificantes às suas condições ideais.

A nitrificação da N-NH_4^+ ocorreu rapidamente nos minutos iniciais, mas também houve uma ligeira queda ao final do tempo de aeração, fato este que indica que o aumento de 1 hora de aeração foi vantajoso. Em relação ao N-NO_2^- , não houve variação significativa do parâmetro. Já para o N-NO_3^- , houve aumento rápido da concentração no início da fase aerada, em decorrência da nitrificação, e consumo quase que em sua totalidade no final da fase não aerada (devido à desnitrificação).

Em relação ao P-PO_4^{3-} , foi verificado um comportamento semelhante ao observado no perfil da Figura 15, redução da concentração na fase aerada e aumento na ausência de aeração.

Sobre a DQO, observou-se o mesmo comportamento visto no perfil da fase III, aumento da DQO remanescente no sistema. Com isso, ao alterar a fase operacional, o fluxo de entrada do glicerol fermentado foi reduzido na fase anaeróbia, com o intuito de evitar a diminuição da eficiência de remoção da matéria orgânica.

A concentração OD variou conforme o esperado, dentro da faixa requerida no projeto, reduzindo para quase zero, na fase sem aeração. Alguns fatores podem ter limitado a sensibilidade da sonda, como a presença de bolhas ao redor da mesma que podem ter limitado a leitura.

5.3 OPERAÇÃO EM BATELADAS SEQUENCIAIS

5.3.1 Remoção de compostos nitrogenados

Após a operação do reator em modo contínuo, optou-se por realizar a última fase (fase VI) com o reator em bateladas sequenciais, com o intuito de melhorar a eficiência de remoção dos parâmetros, principalmente o fósforo. O reator passou a operar em ciclos de 6 horas, conforme descrito na Tabela 7. A razão de recirculação foi mantida igual a 3 para garantir a mistura completa no reator.

A Figura 17 mostra a variação da concentração de N-total afluente, efluente e a eficiência de remoção de N-total durante a operação em bateladas sequenciais.

Figura 17 - Variação da concentração de N-total afluente, efluente e eficiência de remoção durante a operação em batelada sequencial.

Fonte: Autor.

Por meio da Figura 17, verifica-se que a fase VI apresentou remoção de N-total significativa, o que pode estar associado com a quantidade de matéria orgânica suficiente para a ocorrência do processo, uma vez que, houve a adição de fonte exógena de carbono. A relação DQO/N existente era alta e, assim, havia disponível matéria orgânica para o processo de desnitrificação heterotrófica. Os dados de relação DQO/N presentes em cada fase e as eficiências de remoção de N-total se encontram na Tabela 13.

Tabela 13 - Relação DQO/N, concentrações médias de N-total afluente e efluente e eficiência de remoção de N-total ao longo da operação em bateladas sequenciais.

Relação DQO/N	11,2 ± 2,6
N-total afluente (mg.L ⁻¹)	42,5 ± 11,7
N-total efluente (mg.L ⁻¹)	6,0 ± 6,2
Eficiência de remoção de N-total (%)	86,8 ± 6,2

Fonte: Autor.

A busca pela melhoria da eficiência da remoção de N-total foi alcançada, visto que a fase VI apresentou a melhor eficiência ao longo de toda operação do reator, com valor médio equivalente a 86,8% ± 6,2. A justificativa para essa melhoria pode se relacionar com a mudança no modo de operação, visto que o RSB apresenta um melhor controle das taxas de

reação e, assim, alcança com maior facilidade a qualidade do efluente requerida, em função da aplicação de maiores tempos de reação (IRVINE E RICHTER, 1976).

He *et al.* (2016) avaliaram a eficiência de um reator em batelada sequencial para a remoção de nitrogênio e fósforo, tendo como alimentação o esgoto sintético. Os autores obtiveram eficiência de remoção de N-total de $93,88\% \pm 6,78$.

Wang *et al.* (2016), também operaram reator em batelada sequencial para remoção do nitrogênio e fósforo de esgoto de uma Universidade em Beijing e obtiveram eficiência de remoção de N-total de 92,1%.

Ambas as eficiências foram superiores à obtida neste trabalho, devido possivelmente a problemas relacionados com a difusão dos nutrientes e de OD até os microrganismos responsáveis, visto que somente nesta pesquisa o reator é de leito fixo e estruturado. Nos demais, o lodo se encontra em suspensão. Além disso, um outro fator pode estar relacionado com o tempo de operação do reator em bateladas sequencias, uma vez que o tempo de operação deste trabalho foi menor do que os dos trabalhos aqui citados.

Em se tratando da oxidação de NTK, a Figura 18 descreve a variação de NTK afluente, efluente e eficiência de oxidação no RSB.

Fonte: Autor.

A fase VI apresentou a melhor eficiência de oxidação de NTK. Nesta fase, o reator passou a operar em batelada sequencial, fato este que também melhorou o desempenho na oxidação do NTK. A justificativa já dita anteriormente, pode relacionar-se ao maior tempo de exposição dos compostos aos microrganismos, o que garante melhor controle nas taxas das reações. Na Tabela 14, encontram detalhadas as variações de NTK afluente, efluente e a eficiência de oxidação de NTK.

Tabela 14 - Concentrações médias de N-total afluente e efluente e eficiência de oxidação de NTK ao longo da operação em bateladas sequenciais.

NTK afluente (mg.L ⁻¹)	39,7 ± 7,3
NTK efluente (mg.L ⁻¹)	3,8 ± 1,5
Eficiência de oxidação de NTK (%)	90,5 ± 2,7

Fonte: Autor.

Na Figura 19, tem-se a composição média das espécies nitrogenadas na fase VI juntamente com a remoção de N-total.

Fonte: Autor.

Chiu *et al.* (2007) estudaram o controle da relação de carbono com nitrogênio em um reator NDS operando em bateladas sequenciais e alimentado com efluente sintético. No estudo, obtiveram, como resultado, que o sistema em bateladas sequenciais pode alcançar

remoção quase completa do N-NH_4^+ sem nenhum acúmulo do intermediário N-NO_2^- , quando a relação inicial de DQO/N foi de 11,1. Tal situação assemelha-se ao obtido na fase VI, no qual apresentou eficiência de remoção de N-NH_4^+ de $90,5 \pm 2,7$ sem acúmulo de N-NO_2^- no sistema.

5.3.2 Remoção de DQO

A Figura 20 demonstra a variação de DQO ao longo dos 49 dias de operação do RSB.

Fonte: Autor.

O valor de DQO médio do esgoto, da saída do UASB e da saída do RSB estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 - Variações das concentrações de DQO afluyente, efluente e eficiência de remoção no RSB.

DQO esgoto(mg.L ⁻¹)	257 ± 48
DQO UASB (mg.L ⁻¹)	76 ± 5
DQO LEAI (mg.L ⁻¹)	59 ± 15
Eficiência Global de remoção (%)	77 ± 5

Fonte: Autor.

Verificou-se que a operação em modo RSB, mostrou-se com a menor média de remoção ($77 \pm 5\%$) que as demais do processo. Contudo, considerando-se a margem de erro, todas as remoções de DQO se encontram com valores próximos, evidenciando, assim, que todas as fases operacionais são satisfatórias para a remoção de matéria orgânica.

Wang *et al.* (2016), ao operarem um RSB, obtiveram eficiência de remoção média de 86,9% para a DQO, tendo a concentração efluente média equivalente a $41,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Tais valores estão próximos aos obtidos nessa pesquisa.

Contudo He *et al.* (2016), durante a pesquisa, alcançaram $95,05 \pm 3,64\%$ de eficiência de remoção média para DQO e uma concentração efluente média de $9,5 \pm 6,39\%$, operando o reator em batelada sequencial.

Os resultados por eles obtidos foram mais eficientes que os alcançados nesse trabalho, fato este que pode associar-se a alimentação do reator, a qual foi esgoto sintético utilizada por He *et al.* (2016) e esgoto doméstico nessa pesquisa.

5.3.3 Remoção de fósforo

Devido a não remoção de fósforo no modo contínuo de operação optou-se por realizar a fase VI com a alteração do modo operacional do reator, o qual se portava como RSB. A Figura 21 ilustra o comportamento da remoção de fósforo com o sistema operando em batelada alimentada.

Fonte: Autor.

Pode-se evidenciar que, durante toda a 6ª fase operacional, ocorreu a remoção de fósforo, apresentando uma eficiência média equivalente a $56,1 \pm 8,5\%$. Ressalta-se que a coleta do efluente da batelada ocorria ao final do ciclo, após a fase anóxica. Apesar da melhora na eficiência de remoção deste composto, a eficiência alcançada na operação está aquém da apresentada por outros reatores similares.

Callado (2001) obteve remoções significativas de N e P (acima de 90%) operando reatores subsequentes em modo de bateladas, utilizando acetato como doador de elétrons, o qual era adicionado na etapa anóxica do ciclo.

He *et al.* (2016), ao operarem um reator em batelada sequencial com o objetivo de remover fósforo e nitrogênio de um esgoto sintético, obtiveram eficiência de remoção de fósforo equivalente a $97,1 \pm 3,6\%$.

Semelhantemente, Wang *et al.* (2016), ao tratarem esgoto doméstico de uma Universidade de Beijing, China, com o intuito de remover fósforo, obtiveram eficiência de remoção equivalente a 92,1%.

5.3.4 Perfil temporal do RBS

O perfil da fase VI foi realizado após o último dia de operação do reator e é apresentada na Figura 22, em que avaliou-se um ciclo completo do reator em batelada sequencial.

Neste ciclo analisado, verificou-se que N-NH_4^+ foi oxidado a N-NO_2^- e a N-NO_3^- através do processo de nitrificação. O N-NO_2^- foi oxidado a N-NO_3^- durante a condição aeróbia e praticamente nenhuma acumulação deste primeiro composto foi detectada ao final da fase aeróbia. Na fase anóxica, o N-NO_3^- gerado pela nitrificação foi ainda reduzido a nitrogênio gasoso por meio da desnitrificação.

Um balanço de nitrogênio para este ciclo revelou que houve perda de nitrogênio na fase aeróbia, uma vez que a quantidade de N-NO_x^- gerada foi menor do que a quantidade de N-NH_4^+ oxidada. Essa discrepância entre o nitrogênio oxidado e o gerado, foi observada de forma semelhante nos estudos de He *et al.* (2016) e pode ser explicada pela ocorrência da remoção de nitrogênio através de processos como a desnitrificação aeróbia, atividades desnitrificantes por organismos acumuladores de fósforo e precipitação do nitrogênio amoniacal juntamente com fósforo como estruvita. Estudos anteriores também relataram esse

processo em reatores NDS sob condições aeróbias, para sistemas operados em sequências anaeróbias, aeróbia e anóxica (KISHIDA *et al.*, 2006, LIU *et al.*, 2013).

Figura 22 - Perfil do reator operando em batelada sequencial.

Fonte: Autor.

A remoção de DQO para esse ciclo, considerando a quantidade inicial e final, não foi tão expressiva, devido à inserção de fonte de carbono na fase anóxica. Contudo, uma quantidade significativa foi removida durante a fase aeróbia pelos organismos aeróbios. Por conseguinte, ao inserir o glicerol fermentado (quantidade inferior às demais fases, com o

intuito de reduzir a DQO remanescente), a quantidade inserida ainda assim, mostrou-se superior à necessária, e este parâmetro ainda necessita ser melhor estudado.

Sabe-se que a remoção de fósforo e o processo de desnitrificação requerem fontes de carbono. Neste estudo, verificou-se a liberação de fósforo durante a fase anaeróbia, fato associado à ligeira queda da DQO do sistema durante essa fase, demonstrando que o lodo assimilou os ácidos presentes no fermentado do glicerol. O fato de se observar a redução de DQO na fase anóxica, identifica-se que a desnitrificação ocorreu em função da inserção da fonte externa.

Em relação ao OD, verificou-se o mesmo já evidenciado nos demais perfis: próximo a zero nas fases sem aeração e entre 2 e 3,5 mg.L⁻¹ nas fases aeradas.

5.4 pH E ALCALINIDADE

Os valores médios de pH e alcalinidade em todos os períodos operacionais estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores médios de pH e alcalinidade em cada período operacional.

Fases operacionais	DQO/N	Afluente		Efluente	
		pH	Alcalinidade total (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	pH	Alcalinidade total (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)
I	2,0 ± 1,0	7,5	182,5 ± 32,4	6,8	90,6 ± 28,7
II	2,5 ± 0,7	7,5	163,9 ± 20,8	7,1	57,0 ± 38,4
III	8,5 ± 6,9	7,5	168,4 ± 47,9	7,8	137,2 ± 58,7
IV	3,2 ± 1,7	7,6	152,9 ± 32,1	6,7	40,8 ± 31,6
V	7,8 ± 4,1	7,4	162,1 ± 42,5	7,8	151,9 ± 44,8
VI	11,2 ± 2,6	7,5	126,8 ± 22,2	7,0	93,1 ± 40,5

Fonte: Autor.

Observa-se que ocorreu uma pequena variação no pH tanto afluente quanto efluente, apresentando-se próximo à neutralidade, fato este que favorece os microrganismos nitrificantes e desnitrificantes.

Segundo Metcalf e Eddy (2003), o processo de nitrificação, consome teoricamente 7,14 mg de alcalinidade em função de CaCO₃ por mg de N- NH₄⁺ oxidada, fato este associado à queda na alcalinidade efluente. Contudo, a redução dos compostos nitrogenados oxidados à N₂ (processo de desnitrificação) retornam alcalinidade ao sistema, cerca de 3,54 mg de alcalinidade em função de CaCO₃ por mg de N-NO₃⁻. Com isso, em sistemas que acontecem ambos os processos que envolvem os compostos nitrogenados pode não ser necessário a

inserção de algum alcalinizante no sistema, reduzindo, assim o custo operacional. A Tabela 17 apresenta o balanço de massa referente ao consumo e geração de alcalinidade de cada fase realizado a partir dos resultados das análises dos compostos nitrogenados.

Tabela 17 - Balanço de massa referente à alcalinidade consumida e gerada em cada fase.

Fase	Nitrogênio nitrificado (mgN.L ⁻¹) ¹	Nitrogênio amonificado (mgN.L ⁻¹) ²	Nitrogênio desnitrificado (mgN.L ⁻¹) ³	Alcalinidade total consumida (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	Alcalinidade total gerada (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	Alcalinidade efluente teórica (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	Alcalinidade efluente real (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)
I	41,6	19,4	34,5	297,0*	192,6**	104,4	90,6 ± 28,7
II	29,5	15,8	22,6	210,3*	137,0**	73,3	57,0 ± 28,4
III	65,1	30,5	62,9	464,7*	333,6**	131,1	137,2 ± 58,7
IV	32,5	25,1	25,2	232,1*	179,7**	52,4	40,8 ± 31,6
V	54,3	34,4	42,1	388,0*	272,9**	115,1	151,9 ± 44,7
VI	35,9	10,2	35,7	256,3*	163,8**	92,5	93,1 ± 40,5

¹ Nitrogênio nitrificado = (NTK afluente - NTK efluente)

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

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

*Cada mg de N-NH₄⁺ nitrificado gera um consumo de 7,14 mgCaCO₃.L⁻¹ de alcalinidade (WEF, 2010)

**Cada mg de N-NO₃⁻ desnitrificado gera 3,57 mgCaCO₃.L⁻¹ de alcalinidade (WEF, 2010)

**Cada mg de N-orgânico amonificado gera 3,57 mgCaCO₃.L⁻¹ de alcalinidade (Van Haandel e Marais, 1999)

Fonte: Autor.

Considerando que as variações existentes no sistema e que o balanço de massa foi realizado com os valores médios de alcalinidade afluente e efluente, pode-se afirmar que os valores teóricos calculados são próximos aos valores reais encontrados. E por meio dos valores obtidos, mostra-se que não foi necessário inserir alcalinizantes no sistema, pois os processos se compensaram.

Uma vez que, diante do total de NTK oxidado a N-nitrito e N-nitrato em cada fase e da estequiometria de consumo de alcalinidade deste processo, pode-se afirmar que a desnitrificação foi eficiente em todas as condições testadas.

Tal fato tem sua ocorrência associada a 50% da alcalinidade requerida pela nitrificação ter sido reposta ao sistema pelo processo de desnitrificação, sendo recolocado 58,5% na fase I; 61,7% na fase II; 51,7% na fase III; 60% na fase IV; 61,3% na fase V e 50,3% na fase VI. Assim, a configuração do reator desse estudo em questão mostra-se uma alternativa vantajosa em comparação aos sistemas convencionais de tratamento (nitrificação e desnitrificação em unidades separadas).

5.5 ANÁLISE DE SÓLIDOS

Os valores das análises da série de sólidos durante o período experimental estão apresentados nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18 - Concentração média de ST, STV, STF em todas as fases experimentais.

Fase	ST		STF		STV	
	Afluentes	Efluentes	Afluentes	Efluentes	Afluentes	Efluentes
I	357 ± 97	149 ± 23	183 ± 64	78 ± 18	174 ± 52	71 ± 17
II	512 ± 112	304 ± 60	262 ± 90	195 ± 36	250 ± 68	67 ± 28
III	550 ± 79	298 ± 22	296 ± 70	172 ± 26	254 ± 45	126 ± 32
IV	439 ± 65	224 ± 48	237 ± 53	123 ± 41	202 ± 38	101 ± 20
V	400 ± 100	168 ± 51	243 ± 41	86 ± 19	157 ± 54	82 ± 9
VI	437 ± 85	235 ± 14	254 ± 62	152 ± 22	183 ± 44	83 ± 15

Fonte: Autor.

Tabela 19 - Concentração média de SST, SSV, SSF em todas as fases experimentais.

Fase	SST		SSF		SSV	
	Afluentes	Efluentes	Afluentes	Efluentes	Afluentes	Efluentes
I	21 ± 7	11 ± 1	9 ± 3	3 ± 1	12 ± 10	8 ± 1
II	30 ± 15	11 ± 2	4 ± 2	2 ± 1	26 ± 14	10 ± 3
III	38 ± 2	19 ± 3	2 ± 2	14 ± 3	37 ± 2	4 ± 1
IV	39 ± 3	13 ± 8	8 ± 2	7 ± 6	31 ± 2	7 ± 1
V	28 ± 2	17 ± 5	15 ± 1	5 ± 1	13 ± 2	12 ± 4
VI	36 ± 3	15 ± 2	9 ± 2	8 ± 1	27 ± 4	7 ± 1

Fonte: Autor.

Pode-se observar, por meio das tabelas 18 e 19 que, em todas as condições operacionais, as concentrações afluentes de ST foram maiores do que as concentrações efluentes. A maior concentração de ST foi 550 mg.L⁻¹ (fase III) e a menor 400 mg.L⁻¹ (fase V).

As concentrações efluentes de STF foram superiores às concentrações efluentes de STV durante todo o período experimental, fato este que pode estar associado à presença de macronutrientes (sais minerais) no esgoto sanitário da região, os quais não foram totalmente metabolizados no reator.

Em se tratando dos sólidos suspensos, verifica-se que as concentrações efluentes de SSV foram relativamente baixas ao longo de todo o período experimental. A fração de sólidos em suspensão sendo baixa, evidenciou um bom desempenho do sistema, o qual era capaz de impedir o arraste de sólidos para o efluente.

Ao final da operação do reator, foi realizada a estimativa da concentração de sólidos aderidos ao material suporte. Uma haste do reator foi selecionada, a qual apresentava massa equivalente a 7,3584 g e um volume aproximado de 0,385 L. Após o procedimento de determinação dos sólidos obteve concentração de ST e STV de 3,11 g.L⁻¹ e 0,25 g.L⁻¹, respectivamente. Logo, após 233 dias de operação, e expandido o valor encontrado para as 13 hastes presentes no reator, verificaram concentrações de 2,12 kg ST.kg espuma⁻¹ e 0,17 kg STV.kg espuma⁻¹.

Em se tratando da concentração de sólidos drenados no líquido do reator, considerando um volume líquido de 9,10 L extraídos do reator, o qual, após a sedimentação, apresentava volume de 1,20 L, obteve-se, como ST e STV da biomassa em suspensão, 2,19 kg ST.m⁻³ e 0,20 kg STV.m⁻³ para as respectivas concentrações de 16,602 g.L⁻¹ e 1,453 g.L⁻¹.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ENTRE AS EFICIÊNCIAS DE NITRIFICAÇÃO, DESNITRIFICAÇÃO E REMOÇÃO DE N-TOTAL, DE DQO E DE FÓSFORO

Uma análise comparativa dos resultados apresentados acima (itens 5.2, 5.3 e 5.4) é descrita nessa seção, com a finalidade de proporcionar maior compreensão dos processos de remoção de matéria carbonácea, nitrogenada e de fósforo estabelecidos no sistema.

As Figuras 23, 24 e 25 apresentam gráficos Box-plot, que retratam a distribuição das eficiências de remoção dos compostos em cada fase operacional. Para obtenção de tais gráficos o software Past® 3.11 foi utilizado.

Na estatística descritiva, o diagrama de caixa, ou, Box-plot é um gráfico utilizado para avaliar a distribuição empírica dos dados amostrados, sendo composto pela mediana (50%), pelo primeiro quartil (25%) e pelo terceiro quartil (75%). Na zona externa ao box, são discriminados os valores máximos e mínimos da distribuição. Assim, nessa ferramenta estatística, quanto maior a altura do box interior, maior é a heterogeneidade da amostra, e, consequentemente maior o desvio-padrão.

Figura 23 - Gráfico Box-plot da distribuição da eficiência de remoção de N-total em todas as fases experimentais.

Fonte: Autor.

Estatisticamente, verifica-se através da Figura 23 que nas fases III, V e VI, ocorreu a remoção dos compostos nitrogenados com uma menor variabilidade, indicando estabilidade na eficiência do processo e homogeneidade da amostra, demonstrando assim, serem condições melhores de operação para o reator em questão. Além disso, indica que as fases com maiores relações DQO/N (fases III, V e VI) as que resultaram em melhor aproveitamento do sistema. Destaca-se a fase VI, pois nesta condição o processo de remoção ocorreu com uma eficiência maior e melhor homogeneidade das amostras.

Outro fator que evidência o melhor aproveitamento do sistema nestas três fases foi que somente nas três foi inserido uma fonte exógena de carbono, indicando que a quantidade de matéria carbonácea requerida pelo sistema é superior à existente no esgoto doméstico, e a inserção do glicerol fermentado como fonte potencializou o sistema para a remoção dos compostos nitrogenados. Tal fato torna-se mais evidente quando se compara a eficiência de desnitrificação de cada fase, como descrito na Figura 13.

Figura 24 - Gráfico Box-plot da distribuição da eficiência de desnitrificação em todas as condições operacionais.

Fonte: Autor.

Verifica-se na Figura 24 que as fases III, V e VI, nas quais ocorreu adição de fonte exógena de carbono (glicerol fermentado), apresentaram um melhor desempenho na desnitrificação, com uma constância estabilidade no processo de desnitrificação e uma homogeneidade da amostra, confirmando a necessidade de uma fonte externa para a melhor operação do sistema.

Por meio da Figura 25, observa-se, em relação à remoção de DQO, que o sistema (UASB + LEAI) teve comportamento estável e apresentou eficiência de remoção acima de 75% em todas as fases. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Santos (2014) e Moura (2014), confirmando que o sistema é estável, eficiente e robusto para a remoção de matéria orgânica.

Observa-se também que todos os box apresentam uma pequena amplitude, demonstrando a homogeneidade dos dados ao longo de todo período experimental.

Figura 25 - Gráfico Box-plot da distribuição da eficiência de remoção de DQO.

Fonte: Autor.

Figura 26 - Gráfico Box-plot da distribuição da eficiência de remoção de fósforo.

Fonte: Autor.

Em relação à remoção de fósforo verificou-se, Figura 26, que somente a fase VI apresentou uma remoção significativa de fósforo. Tal fato ocorreu em virtude de que o reator foi operado, somente a fase VI, como batelada sequencial, enquanto que, nas demais, o reator trabalhava em modo contínuo. Sabe-se que para a ocorrência da remoção de fósforo o ambiente tem que está adequado para que os microrganismos acumuladores de fósforo consiga realizar suas atividades. Quando o reator é operado em modo contínuo, a constante entrada de alguns compostos pode ter dificultado a atividades desses organismos, ocasionando a baixa eficiência de remoção desse composto.

Juntamente com a ferramenta Box-plot, foi utilizado o software BioEstat® com a finalidade de verificar a diferença estatística entre as eficiências de remoção de N-total, de DQO e de fósforo em todas as fases de operação do reator.

A priori, analisou-se os dados obtidos, se eram paramétricos (distribuição normal) ou não-paramétricos por meio do Teste de Lilliefors ($\alpha=0,05$), visto que este analisa a normalidade de amostras com números distintos de dados. Constatou-se a distribuição normal nas análises em questão (eficiência de remoção de DQO, eficiência de remoção de N-total e eficiência de remoção de fósforo). Por conseguinte, a ferramenta ANOVA: um critério e Teste Tukey ($p=0,05$) foi aplicada para verificar a existência de diferença estatística em cada fase operacional das eficiências de remoção. A Tabela 20 descreve a diferença estatística entre as eficiências de remoção de N-total, de fósforo e de DQO para cada fase. Nesta tabela, as fases que apresentam o mesmo símbolo não apresentaram diferença estatística entre si.

Tabela 20 - Diferença estatística entre as eficiências de remoção de N-total, de fósforo e DQO.

	1	2	3	4	5	6
Remoção DQO	a	a	b	b	a	a
Remoção N-total	c	c	d	c	d	d
Remoção de fósforo	e	e	e	e	e	f

Fonte: Autor.

Em relação à remoção de DQO, as fases III e IV não apresentaram diferença estatística entre si, mas apresentaram diferença com o demais. Tal fato pode estar associado pelo fato de que ambas apresentaram as maiores eficiências de remoção e maior homogeneidade dos dados.

Em se tratando à remoção de N-total, verificou-se que as fases III, V e VI não apresentaram diferenças estatísticas entre si, mas com as fases I, II e IV foi verificado. A

explicação está relacionada com o fato que nestas fases não houve adição de fonte exógena (glicerol fermentado) e naquelas houve a inserção.

A remoção do fósforo apresentou diferença estatística somente na fase VI, visto que foi a única que apresentou uma outra forma operacional do reator (batelada sequencial) a qual favoreceu a remoção deste composto, já que nas demais não houve a eliminação do mesmo.

5.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os ensaios de microscopia óptica foram realizados de modo a permitir a comparação qualitativa da biomassa nas duas últimas fases operacionais analisadas. Na fase V, foram observados, a olho nu, pontos brancos na biomassa. Assim, uma amostra da biomassa para exame microscópico foi coletada no 164º dia de operação do reator. Na fase VI, uma parcela da biomassa foi extraída do reator no 233º de operação.

Por meio da análise da biomassa presente na espuma de poliuretano ao final da fase V e da fase VI, observou-se a presença de microrganismos de interesse para o processo de tratamento obtido no sistema, como apresentado nas Figura 27 e Figura 28.

Figura 27 - Imagens da microscopia óptica realizada na fase V: (a) emaranhado de bactérias filamentosas; (b) *Zoogléia* sp.; (c) Bacilos; (d) cocos.

Fonte: Autor.

Na Figura 27 observou-se a presença de diversos microrganismos em meio a bactérias filamentosas (a) e também a presença de bacilos, de protozoários e de cocos, como está evidenciado em (b), (c) e (d), respectivamente. Essa diversidade era esperada, visto que o inóculo utilizado neste reator foi obtido a partir da mistura de lodos biológicos de sistemas estáveis para remoção de matéria orgânica e de nitrogênio. Em (b) foi possível observar a presença de organismos semelhantes a *Zoogloea sp.*, pela forma colonial e dendrítica do agrupamento de bacilos, os quais estão presentes em sistemas com elevadas relações F/M, com resíduo que contém compostos orgânicos solúveis facilmente biodegradáveis (JENKINS et al., 2003). De acordo MADIGAN et al. (2004), o gênero *Zoogloea sp.* caracteriza-se pela formação de um polímero fibrilar extracelular e é responsável pela agregação das células em flocos típicos de condições desnitrificantes. Evidencia-se, então, que a presença desse tipo de bactéria no reator teve o papel fundamental na formação do biofilme. Organismos semelhantes a *Zoogloea sp.* também foram identificados em amostras de biofilme do sistema de tratamento de Nocko (2008), Fu et al. (2010) Santos (2014) e Carneiro (2015).

Verificou-se também a presença de aglomerados de cocos (d), com morfologia semelhante a *Nitrosococcus* (BERGEY, 1989). Estes microrganismos são capazes de oxidar N-amoniacal (RITTMANN e MCCARTY, 2001; METCALF e EDDY, 2003), podendo ser estes os responsáveis pelo processo de nitrificação.

Na Figura 28, verificou-se microrganismos semelhantes aos observados na Fase V, filamentosas (a) e (b), aglomerados polimerizados, parecido com a *Zoogloea sp.* (c) e rotíferos (d).

As bactérias filamentosas se assemelham às do gênero *Beggiatoa*. De acordo com MADIGAN et al. (2004), o gênero *Beggiatoa* cresce quimiolitotroficamente, quando há a redução de compostos de enxofre, os quais são doadores de elétrons, e, em pH próximo à neutralidade, estes são oxidados. Todavia, este gênero utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono, sendo então conhecidos como mixotróficos. Esses organismos são filamentos longos e com grande diâmetro, geralmente preenchidos por grânulos de enxofre elementar (S_0), os quais são facilmente observados na microscopia, devido ao brilho que essas estruturas apresentam ao serem observados no microscópio, Figura 28 (b).

Figura 28 - Imagens da microscopia óptica realizada na Fase VI: (a) bactérias filamentosas; (b) detalhamento do acúmulo de elementos no interior das filamentosas; (c) Zoogléia sp.; (d) protozoários da classe rotífera.

Fonte: Autor.

Protozoários da classe rotífera Figura 28 (d), são encontrados frequentemente em lodos ativados, o qual serviu de inóculo de uma parcela do reator. Esses microrganismos são indicativos de sistema estável e boas eficiências na oxidação da matéria orgânica e na nitrificação (CANLER et al., 1999; HOFFMANN, 2004; LAMERGO NETO E COSTA, 2011). Além do mais, estes contribuem para a formação do floco biológico, pois depois de formados, eles servem de ancoragem para outras espécies.

Em relação à identificação dos grânulos intracelulares de polifosfato, utilizou-se a técnica de coloração de Neisser, uma vez que o polifosfato serve de reservas energéticas para alguns organismos. Após a aplicação do corante, caso seja observado a coloração azul-violeta, tem-se a indicação que o organismo é Neisser positivo e, por tanto, é um acumulador de grânulos de polifosfato, entretanto caso a coloração seja amarelo-castanha, o microrganismo é Neisser negativo e não acumulador. O resultado do teste está representado na Figura 29 (fase V) e na Figura 30 (fase VI).

Na Figura 29, verificou-se a presença de microrganismos que responderam negativamente à coloração de Neisser como também positivamente. Conforme Sevivour, Mino e Onuki (2003), se uma amostra de biomassa retirada do reator na fase aeróbia (etapa em que os microrganismos acumulam o fósforo na forma de polifosfato for examinada microscopicamente, as células que coram como Neisser positivo são abundantes (c) e (d). Contudo, caso se tenha PHA intracelular este não é detectado por essa coloração.

Por outro lado, as células na biomassa dos reatores anaeróbios coram para PHA mas não para polifosfato. Segundo Lee *et al.* (2002), as células que aparecem como grandes coccobacilos e em pares mostram que as respostas de coloração são comumente organizadas em grandes aglomerados, embora possam por vezes ser dispersos em toda a biomassa.

Figura 29 - Imagens da microscopia óptica após aplicação da técnica Coloração de Neisser realizada na fase V: (a) e (b) destaque para Neisser negativo; (c) e (d) destaque para Neisser positivo.

Fonte: Autor.

Na Figura 29, foi observado que as células que responderam como Neisser positivo apresentam formato de cocos, bacilos e algumas filamentosas, na sua maioria dispersa na biomassa. A amostra foi extraída na etapa aerada do sistema operado em aeração intermitente

e apresentou coloração Neisser positivo. Fato que indica como resultado a formação dos grânulos de polifosfato.

Vê-se, na Figura 30, microrganismos encontrados ao final da fase aerada do ciclo da batelada sequencial (fase VI) e alguns deles eram semelhantes aos observados na fase V (c) e (d). Entretanto, apareceram organismos tétrades semelhantes ao gênero *Amaricoccus sp.* (MASZENAN, 1997) e *Tessaracoccus sp.* (MASZENAN, 1999), Figura 30 (a) e (b), os quais estão associados à remoção de fósforo em sistemas com fases aeróbias e anóxicas alternadas como também em sistemas de lodos ativados. Estes organismos, chamados de bactérias G, apresentam também a capacidade de desnitrificar em ambientes anóxicos.

Figura 30 - Imagens da microscopia óptica após aplicação da técnica Coloração de Neisser realizada na fase VI: (a) e (b) destaque para tétrades acumuladores de Poli-p; (c) e (d) destaque para cocos acumuladores de Poli-P.

Fonte: Autor.

A presença de outros microrganismos na fase VI, não observados na fase V pode ser uma possível explicação para a remoção de fósforo ter ocorrido somente na última fase operacional. A condição criada pelo reator operado em batelada sequencial pode ter favorecido o ambiente adequado para esses microrganismos se ativarem.

Com relação à coloração de PHB, assim como dos grânulos de polifosfato, funcionam como reservas energéticas intracelulares para determinados organismos. Assim, após a aplicação do corante se o PHB está presente, as células tornam-se escuras, enquanto que na ausência intracelular de PHB o citoplasma apresenta-se em uma coloração magenta. Na Figura 31 e na Figura 32 encontram os detalhes da coloração de PHB obtida na fase V e fase VI, respectivamente.

Figura 31 - Imagens da microscopia óptica após aplicação da Coloração de PHB realizada na fase V: (a) e (b) destaque para Coloração de PHB positiva; (c) e (d) organismos negativos e positivos para coloração de PHB.

Fonte: Autor.

Na Figura 31, observou-se a existência de organismos acumuladores de PHB durante a fase aerada. O fato de ter PHB no interior dos microrganismos na fase aerada, indica que não houve a total metabolização do PHB para gerar gás carbônico e água, e um pouco de glicogênio, com o intuito de gerar energia para formação de novas células, incluindo a formação de Poli-P (WENTZEL et al., 1986). Contudo, mostra a presença desses microrganismos que apresentam o potencial para remoção do fósforo.

Figura 32 - Imagens da microscopia óptica após aplicação da Coloração de PHB realizada na fase VI: (a) e (b) destaque para Coloração de PHB positiva; (c) e (d) organismos negativos e positivos para coloração de PHB.

Fonte: Autor.

Na Figura 32, observou-se outros tipos de organismos acumuladores de PHB (b) além dos observados na fase V, o que indica que o reator no modo batelada sequencial criou condições satisfatórias para a ativação de alguns microrganismos.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na pesquisa, pode-se concluir que o glicerol fermentado se mostra aplicável como doador de elétrons para a desnitrificação e remoção de fósforo em reator com biomassa fixa no leito. Quando este foi operado com alimentação contínua e TDH de 12 horas, o fermentado de glicerol foi eficiente para remoção de compostos nitrogenados e DQO, mas não para a remoção de fósforo. Quando operado em bateladas sequenciais (RSB), o reator de leito fixo mostrou-se eficiente na remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo.

A eficiência média de remoção de DQO manteve-se acima de 77% ao longo de todo o período experimental. A eficiência máxima de remoção de N-total foi de $86,8 \pm 6,2\%$. A eficiência média de remoção de nitrogênio total foi incrementada à medida que a relação DQO/N aumentava. A inserção do glicerol fermentado como fonte de carbono potencializou o processo de desnitrificação, obtendo-se média acima de 85%, enquanto que, na ausência da fonte exógena de carbono, obteve-se eficiência média de desnitrificação de 40% na fase II, indicando a necessidade de matéria orgânica carbonácea para o melhoramento do processo.

Com relação à remoção biológica de fósforo, não se obteve sucesso durante o período em que o reator foi operado com alimentação contínua e aeração intermitente, não tendo sido observado o desenvolvimento significativo dos organismos acumuladores de fósforo (OAP's). A remoção de fósforo foi inexpressiva ou nem ocorreu e os teores de fósforo efluente ($4,05 \pm 1,4$) estiveram muito próximos aos do afluente ($3,87 \pm 0,7$), nas cinco fases iniciais. Todavia, na fase VI (última etapa operacional), após o reator passa a operar em bateladas sequenciais (como RSB) obteve-se eficiência de remoção de fósforo de $56,1 \pm 8,5\%$ e redução na concentração de fósforo significativa de $5,07 \pm 1,6$ para $2,02 \pm 0,5$.

Com isso, verificou-se que, para atender o objetivo da remoção conjunta de matéria orgânica carbonácea, compostos nitrogenados e fósforo, reator deve ser operado como RSB, pois alcançou eficiências significativas para todos os parâmetros. Tal fato pode estar associado à delimitação bem definida de todas as etapas necessárias (anaeróbia, aeróbia e anóxica) para que o estabelecimento das populações responsáveis pela remoção biológica de fósforo, que são as mais exigentes quanto à existência dessas etapas bem definidas.

Nos ensaios de microscopia óptica, foi observado a presença de bactérias do gênero *Zoogloea sp.* a qual se caracteriza pela formação de um polímero fibrilar extracelular e é responsável pela agregação das células em flocos típicos de condições desnitrificantes.

Também observou-se a presença de aglomerados de cocos, com morfologia semelhante a *Nitrosococcus*, os quais são capazes de oxidar N-amoniaco (processo de nitrificação).

Além desses microrganismos, na fase VI, verificou-se a presença de organismos tétrades semelhantes ao gênero *Amaricoccus sp.* e *Tessaracoccus sp.*, que estão associados à remoção de fósforo em sistemas com fases aeróbias e anóxicas alternadas. Eles apresentam, também, a capacidade de desnitrificar em ambientes anóxicos.

A espuma de poliuretano como meio suporte mostrou-se uma alternativa adequada para a imobilização da biomassa. A disposição do meio suporte em hastes cilíndricas do reator com leito fixo e estruturado permitiu evitar a colmatação do leito, promovendo melhor escoamento do efluente no interior do reator. Confirma-se tal situação pela baixa concentração de SSV no efluente final.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apontadas algumas sugestões para trabalhos futuros nessa linha de pesquisa.

- Verificar outras configurações de reatores sequenciais em bateladas complementares de forma a promover a remoção biológica de fósforo mais eficiente. Sugere-se, por exemplo, aumentar a fase anaeróbia que antecede a fase aeróbia para que haja melhor seleção dos microrganismos removedores de fósforo;
- Testar condições de TDH distintas para desnitrificação de forma a obter o TDH mínimo para uma desnitrificação completa com glicerol fermentado;
- Avaliar perfis dos compostos intermediários da remoção biológica de fósforo, como PHB e Poli-P, durante as fases aerada e não aerada, com finalidade de compreender melhor os mecanismos bioquímicos na configuração de reator proposta;
- Melhorar o mecanismo de aeração do sistema, como por exemplo, utilizar uma tubulação porosa, ao invés de uma pedra porosa, que ocupe uma extensão maior do reator, promovendo uma melhor distribuição de OD;
- Melhorar o sistema de monitoramento de OD, visto que a sonda de membrana pode ser afetada por bolhas que ficam presas e afetar na medição, além de que, não houve um monitoramento contínuo desse parâmetro, sendo então necessária a utilização de um dispositivo que permaneça permanentemente acoplado ao reator;
- Avaliar se a separação da desnitrificação e da remoção biológica de fósforo em compartimentos diferentes dentro do mesmo reator, com o intuito de impedir a influência de alguns compostos, como o nitrato, na remoção biológica de fósforo, para operação no modo contínuo;
- Estudar, com detalhes, em todas as fases operacionais o comportamento dos microrganismos presentes no reator, como uma contribuição para a melhor compreensão da microbiota local e das influências na ocorrência dos processos. Uma sugestão seria a utilização do método de quantificação de microrganismos FISH (*Fluorescence in situ hybridization*).

REFERÊNCIAS

- ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 733–41, jan. 2012.
- AHN, Y.H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1709–1721, ago. 2006.
- AHMED, Z., LIMB; B. R; SONGA, J. C. K.G.; KIMA, K. P.; AHNA, K. H. Biological nitrogen and phosphorus removal and changes in microbial community structure in a membrane bioreactor: Effect of different carbon sources. **Water Research**, v. 42, n. 1, p. 198–210, 2008.
- ALBUQUERQUE, M. F. G. **Tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel visando a geração de metano**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.
- AKUNNA, J. C.; BIZEAU, C.; MOLETTA, R. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: Glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. **Water Research**, v. 27, n. 8, p. 1303–1312, 1993.
- APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, Washington, DC, 2012.
- BAE, J. H.; KIM, S. K.; CHANG, H. S. Treatment of landfill leachates: ammonia removal via nitrification and denitrification and further COD reduction via fenton's treatment followed by activated sludge. **Water Science and Technology**, 36 (12), pp. 341–348.1997.
- BARANA, A. C.; LOPES, D. D.; MARTINS, T. H.; POZZIC, E.; DAMIANOVICC, M. H. R. Z.; NERYD, V. D.; FORESTI E. Nitrogen and organic matter removal in an intermittently aerated fixed-bed reactor for post-treatment of anaerobic effluent from a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 453–459, 2013.
- BARBIRATO, F., CAMARASA-CLARET, C., GRIVET, J. P., & BORIES, A. Glycerol fermentation by a new 1, 3-propanediol-producing microorganism: Enterobacter agglomerans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43(5), 786–793, 1995;
- BARNARD, J. L. Biological Nutrient Removal: where we have been, where we are going? **Proceedings of the Water Environment Federation**, v. 2006, n. 13, p. 1–25, 2006.
- BENETTI, A. D.; AQUINO, S. F. Aplicação de princípios de bioenergética no cálculo da estequiometria de reações biológicas em processos de tratamento de águas residuárias. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 245–250, 2010.
- BERGEY. **Bergey's manual of systematic bacteriology, Section 20** – Aerobic chemolithotrophic bacteria and associated organisms, p.1807–1834, 1989.

BOTH, I.R. Glycerol and methylglyoxal metabolism. In **EcoSal-Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology** (Curtis, R., III et al. eds.) ASM Press. 2005.

BODÍK, I.; BLŠŤÁKOVÁ, A.; SEDLÁČEK, S.; HUTŇAN, M. Biodiesel waste as source of organic carbon for municipal WWTP denitrification. **Bioresource technology**, v. 100, n. 8, p. 2452–6, abr. 2009.

BURKE, S.; HEATHWAITE, L.; PREEDY, N. Transfer of phosphorus to surface waters; eutrophication. In: VALSAMI-JONES, Eugenia (Ed.). **Phosphorus in environmental technology: Principles and applications**. IWA Publishing. p. 120-146, 2004.

CALLADO, N. **Reatores sequenciais em batelada em sistema anaeróbio/aeróbio tratando esgoto sanitário sintético e com remoção de nutrientes**. Tese (Doutorado). Engenharia Ambiental - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CALLADO, N.; FORESTI, E. **Ensaio de atividade desnitrificante utilizando diferentes fontes exógenas de carbono**. In: VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, *Anais...* Vitória (ES), 8p, 2002.

CALIJURI, M. C. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: RIMA, 2006.

CAMPOS, F.S; ALVES, M. C. Uso de lodo de esgoto na reestruturação de solo degradado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.32. p. 1389-1397, 2008.

CANLER, J. P.; PERRET, J. M.; DUCHÈNE, P.; COTTEUX, E. Aide ou diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées. **CEMAGREF**, França, 1999.

CARNEIRO, R. **Utilização de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo em reator submetido à aeração intermitente**. Dissertação (Mestrado). Engenharia Ambiental - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

CARVALHO, R.M. **Recomendação de controle ambiental na exploração de jazidas de laterita no Planalto Central**. In: ENCONTRO IBERO-AMERICANO DE UNIDADES AMBIENTAIS DO SETOR TRANSPORTES, 3, 1998, Florianópolis.

CHEN, K. C.; LEE, S. C.; CHIN, S. C.; HOUNG, J. Y. Simultaneous carbon-nitrogen removal in wastewater using phosphorylated pva-immobilized microorganisms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 5, p. 311-320, 1998.

CHEN, Q; NI, J. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, n.9, Sep; p.1305-1310, 2011.

CHIE-CHIEN TSENG, THOMAS, G. P.; KOOPMAN, B. Effect of influent chemical oxygen demand to nitrogen ration on a partial nitrification/complete denitrification process. **Water Research**. vol. 32, n.1, pp. 165-173. 1998.

CHIU, Y. C.; LEEB, L. L.; CHANGB, C. N.; CHAOC, A. C. Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 1, p. 1–7, jan. 2007.

CHOI, E.; LEE, J. W.; AO, S. W. Another carbon source for BNR system. **Water Science and Technology**, vol. 34, N. 1-2, pp. 363-369.1996.

CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: A platform for renewable fuels and chemicals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 20–28, 2013.

CONAMA. Resolução nº 357, 18 de março de 2005. **Diário Oficial**, n. 053, p. 58–63, 2005.

CONAMA. Resolução nº 430, 13 de Maio de 2011. **Diário Oficial** p. 8, 2011.

CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA DE MINAS GERAIS. Disponível em:<<http://www.crqmg.org.br/>>. Acesso em: 03 fev. 2017

CYBIS, L.F. de A. **An Innovative Approach to the Control of Sequencig Batch Reactors Used for Nitrification and Denitrification**. Tese de Ph.D. University of Leeds, Leeds, Inglaterra, 1992.

CYPLIK, P. JUZWAA,W.; MARECIKA, R.; POWIERSKA-CZARNYB, J.; PIOTROWSKA-CYPLIKC, A.; CZARNYB, J.; DROŹDŹYŃSKAA, A.; CHRZANOWSKID, Ł. Denitrification of industrial wastewater: Influence of glycerol addition on metabolic activity and community shifts in a microbial consortium. **Chemosphere**, v. 93, n. 11, p. 2823–31, nov. 2013.

DIAS, M. E.S. **Uso de compostos derivados da fermentação de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo**. São Carlos. São Paulo. 2016.

ECKENFELDER, W.; ARGAMAN, Y. Principles of Biological Phosphorus Removal. In: SEDLAK, Richard. **Principles of biological and physical/chemical nitrogen removal**. 2^a ed. p. 3-42, 1991.

EPA- United States Environmental Protection Agency. **Nutrient Control Design Manual - State of Technology Review Report**. Cincinnati, Ohio. 102 p, 2009.

FINGER, J. L. **Remoção biológica de fósforo em reator sequencial em batelada em escala de bancada**. Porto Alegre: UFRGS, 169 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Porto Alegre, BR-RS, 2000.

FU, B.; LIAO, X. REN, L. D. Characterization of microbial community in an aerobic moving bed biofilm reactor applied for simultaneous nitrification and denitrification. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1981–1990, 2010.

GRABINSKA-LONIEWSKA, A.; SLOMCZYNSKI, T.; KANSKA, Z. Denitrification studies with glycerol as a carbon source. **Water Research**, v. 19, n. 12, p. 1471-1477, 1985.

GRAY, N. F. **Biology of Wastewater Treatment**. Oxford University Press: 2^a edição. New York, US. 1989.

GUERRERO, J.; TAYÀ, C.; GUIASOLA, A.; BAEZA, J. A. Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal. **Water Res.**, v. 46, n. 9, p. 2983-2991, 2012.

HECK, A. N. Nitrificação - **Desnitrificação na aeração estendida intermitente**. Porto Alegre: UFRGS, 141 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Curso de Pós-Graduação em Hidrologia Aplicada, Porto Alegre, BR-RS. 1980.

HAMMER, M.J. **Sistemas de abastecimento de água e esgotos**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 563 p. 1979.

HE, S.; XUE, G.; WANG, B. Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. **Journal of hazardous materials**, v. 168, p. 704–710, 2009.

HE, Q.; ZHANG, S; ZOU, Z; ZHENG, L. A.; WANG, H. Unraveling characteristics of simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal (SNDPR) in an aerobic granular sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**. v. 220. p. 651-655. 2016.

HENZE, M.; HARREMOES, P.; COUR JANSEN, J.; ARVIN, E. Biological and chemical process. **Wasterwater treatment**. Springer, 3ª edição, Berlin: Alemanha, 2002.

HER, J. J.; HUANG, J. S. Influences of carbon source and C/N carbon breakthrough. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 45-51, 1995.

HOFFMANN, H. **Caracterização do funcionamento de ETE do tipo lodo ativado via imagem microscópica** – estudo na Região da Grande Florianópolis. In: XI SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL – SILUBESA. Anais, ABES, Natal, RN, 2004. CD ROM.

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

HOOPER, A. B.; VANNELI, T.; BERGMANN, D. J.; ARCIERO, D. M. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, p. 59–67, 1997.

IRVINE, R. L.; RICHTER, R. O. Computer simulation and design sequencing batch biological reactors. In: Proceedings 31 st. **Purdue Industrial Waste Conference**. Purdue University, p.182-192. 1976.

ISAACS, S. H.; HENZE, M. Controlled carbon source addition to an alternating nitrification-denitrification wastewater treatment process including biological P removal. **Water Research**, v. 29, n. 1, p. 77-89, 1995.

Jenkins, D., Richard, M. G. & Daigger, G. T. **Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming**. New York: Lewis Publishers. 1993.

KETCHUM, L. H.; LIAU, P. C.; IRVINE, R. L. Economic evaluation of sequencing batch biological reactors. In: Proceedings 33 rd. **Purdue Industrial Waste Conference**. Purdue University, p. 357-376. 1979.

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

KISHIDA, N.; KIMB, J.; TSUNEDAA, S.; SUDOB, R. Anaerobic/ oxic/anoxic granular sludge process as an effective nutrient removal process utilizing denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. **Water Res.**, v. 40 n.12, p. 2303–2310. 2006.

LAMARGO NETO, L.G.; COSTA, R.H.R. Tratamento de esgoto sanitário em reator híbrido em bateladas sequenciais: eficiência e estabilidade na remoção de matéria orgânica e nutrientes (N, P). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 14, p. 411-420, 2011.

LEE, N. JANSSEN, J.L.; ASPEGREN, H.; HENZE, M.; NIELSEN, P.H.; WAGNER, M. Population dynamics in wastewater treatment plants with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. **Water Sci. Technol.** v. 46, p.163-170, 2002.

LIU, G., XUA, X.; ZHUA, L.; XINGA, S.; CHENB, J. Biological nutrient removal in a continuous anaerobic–aerobic–anoxic process treating synthetic domestic wastewater. **Chem. Eng. J.** v. 225, p. 223–229. 2013.

LOPES, A. CECHINEL, C. A.; WENTZ, A. P. Co-produto do biodiesel: Novas aplicações para glicerina. **Diálogos & Ciência** – Revista da Faculdade de Tecnologia e Ciências – Rede de Ensino FTC. n. 27, set. 2011.

LUQUE R; HERRERO-DAVILA, L; CAMPELO, J. M.; CLARK, J. H.; HIDALGO, J. M.; LUNA. D. Biofuels: a technological perspective. **Energy Environ Sci** 2008;1(5):542–64.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M; BENDER, K. S; BUCKLEY, D. H.; Stahl, D. A. Editora Artmed. **Microbiologia de Brock**. Artmed, 2004.

MASZENAN, A.M.; SEVIOUR R. J.; PATEL B. K.; REES, G. N.; MCDOUGALL, B. M. *Amaricoccus* gen. nov., a gram-negative coccus occurring in regular packages and tetrads, isolated from activated sludge biomass, and descriptions of *Amaricoccus veronensis* sp. nov., *Amaricoccus tamworthensis* sp. nov., *Amaricoccus macauensis* sp. nov. and *Amaricoccus kaplicensis* sp. nov. **Int J. Syst. Bacteriol.** v.47, p.727-734, 1997.

MASZENAN A.M.; SEVIOUR R. J.; PATEL B. K.; SCHUMANN, P.; REES, G. N. *Tessaracoccus bendigoensis* gen. nov., sp. nov., a gram-positive coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.49, p.459-68, 1999.

MENOUD, P.; BARFORD, J. P; BARTON, G.W.; FARQUHAR, A.; ROBINSON, H.A.; WONG, C.H. Simultaneous nitrification and denitrification using siporax TM packing. **Water Science and Technology**. v. 40, (4-5) p. 40, 1999.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. McGraw-Hill International Edition, 4 ed. New York, 2003.

MONTEGGIA, L. O. 1980. **Estudo Técnico Econômico para Tratamento das Águas Residuárias do Novo Campus da UFRGS**. Porto Alegre: UFRGS, 172 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Hidrologia Aplicada, Porto Alegre, BR-RS, 1980.

MOURA, R. B. **Desempenho de um reator vertical de fluxo contínuo e leito estruturado com recirculação do efluente, submetido à aeração intermitente, na remoção de carbono e nitrogênio de um efluente sintético**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MOURA, R. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente**. 2014. 132 f, Tese (Doutorado). Engenharia Ambiental - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. **Journal of Environmental Management**, v. 98, p. 163–7, 15 maio 2012.

MÜNCH, E. V.; LANT, P.; KELLER, J. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. **Water Research**, vol. 30, n. 2, p. 277–284, fev. 1996.

NARKIS, N.; REBHUN, M.; SHEINDORF CH, M. Denitrification at various carbon to nitrogen ratios. **Water Research**, v. 13, n. 1, p. 93-98, 1979.

NOCKO, L. M. **Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido a aeração intermitente**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

ONO, A. F. **Estratégias de operação de reatores aeróbio/anóxico operados em batelada sequencial para remoção de nitrogênio de água residuária industrial**. Dissertação (Mestrado). p. 134. Engenharia Ambiental - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

PENTEADO, E. D. et. al. Simple and accurate method for determination of fatty acids, alcohols and carbohydrates by HPLC with UV/DAD and RID detectors. **HPLC 2012**: 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, em Anaheim Marriott, Anaheim, California, USA, de 16 a 21 de junho de 2012.

PICKBRENNER, K. **Uso de reator sequencial em batelada (RSB) para pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio**. Porto Alegre: UFRGS, 208 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Porto Alegre, BR-RS. 2002.

PINTO, C. R. R. **Investigação do processo de nitrificação em Reatores Sequenciais em Batelada (RSB) e observação da sua microfauna**. Porto Alegre: UFRGS, 140 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Porto Alegre, BR-RS. 1998.

POCHANA, K.; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). **Water Science and Technology**. v 39. p. 61-68 1999.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. 1ª ed, New York, NY: McGraw-Hill; 2001.

RODGERS, M.; ZHAN, X.-M. Biological nitrogen removal using a vertically moving biofilm system. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 3, p. 313–319, jul. 2004.

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

SANTA'NNA JUNIOR, G. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2010.

SANTOS, C. D. **Influência da relação carbono/nitrogênio e da fonte de carbono no processo de nitrificação desnitrificação simultânea em reator de leito estruturado**. Dissertação (Mestrado). p. 144. Engenharia Ambiental - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SANTOS, E. V. M dos. **Desnitrificação em sistemas de lodo ativado**. 114 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande (PB), 2009.

SANTOS, F. **Tratamento de esgoto doméstico em Reatores Sequenciais em Batelada Anaeróbios (RSBAn)**. Porto Alegre: UFRGS, 135 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Porto Alegre, BR-RS. 2001.

SEN, P.; DENTEL, S. Simultaneous nitrification-denitrification in a fluidized bed reactor. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 247–254, 1998.

SEVIOUR, R. J.; MINO, T.; ONUKI, M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. **FEMS Microbiology Reviews**, 2003, 27.1: 99-127.

SIDAT, M.; KASAN, H.C.; BUX, F. Laboratory-scale investigation of biological phosphate removal from municipal wastewater. **Water SA**, v. 25, n. 4, p. 459-462, 1999.

SILVA, B. G. **Efeitos do tempo de aeração no desempenho de reator de leito estruturado e aeração intermitente na remoção de matéria orgânica e nitrogênio de efluente de reator UASB**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30–9, jan. 2009.

STENSEL, H. D. Principles of Biological Phosphorus Removal. In: SEDLAK, R. **Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice**. 2^a ed. p. 141-166, 1991.

SCHMIDELL, W. REGINATTO, V. Processos de Eliminação de Nitrogênio. In: **Tratamento biológico de águas residuárias (1^a edição)**. p 449-527, 2007.

SUN, J.; VAN DEN HEUVEL, J.; SOUCAILLE, P.; QU, Y.; ZENG, A. P. Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. **Biotechnol. Prog.** v.19, p. 263–272. 2003.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S.; LEUNG, G. Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrient by the nitrification-denitrification process. **Water Research**, v. 26, n. 9, p. 1229-1236, 1992.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl Eng Agric.** V 22(2). p. 261–5. 2006.

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. São Carlos: RIMA, Ite, 2003.

TRANNIN, I.C.B.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Avaliação agrônômica de um biossólido industrial para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.261-269, 2005.

VAN HAANDEL, A; MARAIS, G. **O comportamento do sistema de lodo ativado, teoria e aplicações para projetos e operações**. Campina Grande, PB. 1999.

VAN LOOSDRECHT, M. HOOIJMANS, C., BRDJANOVIC, D.; HEIJNEN, J. J. Biological phosphate removal processes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 48, n. 3, p.289-296, 1997.

VON MÜNCH, E.; LANT, P.; KELLER, J. simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. **Water Research**, v. 30, n. 2, p. 277–284, 1996.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto**. 4 ed. Belo Horizonte: Editora: UFMG, 2014.

WANG, D.; LI, X. M., YANG, Q.; ZENG, G. M.; LIAO, D. X.; ZHANG, J. Biological Phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5466-5473, 2008.

WANG, Y.; PENG, Y.; STEPHENSON, T. Effect of influent nutrient ratios and hydraulic retention time (HRT) on simultaneous phosphorus and nitrogen removal in a two-sludge sequencing batch reactor process. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3506-3512, 2009.

WANG, X.; WANG, S.; ZHAO, J.; DAI, X.; PENG, Y. Combining simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal with post-denitrification for low carbon/nitrogen wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 17-25, 2016.

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

WENTZEL, M.C., LOTTER, L. H.; LOEWENTHAL, R.; MARAIS, G. V. E Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal - a biochemical model. **Water SA**, v.12, p.209-224, 1986.

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

YAZDANI, S; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213–219, 2007.

YUAN, X.; GAO, D. Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor. **Journal of hazardous materials**, v. 178, n. 1-3, p. 1041–5, 15 jun. 2010.

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

ZENG, R. J., LEMAIRE, R. Yuan, Z.; Keller, J. Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, n. 2, p. 170–8, 20 out. 2003.

ZOPPA, F. **Estudo da remoção de nitrogênio em efluentes por nitrificação e desnitrificação simultânea**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Engenharia de Minas, Departamento de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

APÊNDICE I - OBTENÇÃO DO FERMENTADO DE GLICEROL A PARTIR DA DECOMPOSIÇÃO ÁCIDA EM ENSAIO EM BATELADA E CINÉTICA DE DECAIMENTO.

O fermentado de glicerol foi obtido a partir de ensaios de decomposição ácida desse composto em reatores em batelada e obtenção do parâmetro cinético de decomposição. Esses ensaios, denominados ensaios cinéticos, foram realizados em parceria com a estudante de iniciação científica Maria Eduarda Simões Dias no Laboratório de Processos Biológicos – LPB (DIAS, 2016).

A metodologia foi semelhante à aplicada por Guerrero *et al.* (2012) e Callado (2001). Os ensaios de fermentação foram realizados em frascos Duran® de 500 mL operados em bateladas e submetidos à atmosfera de N₂ (100%), durante 5 a 10 minutos, para manutenção das condições de anaerobiose, após inoculação.

Os ácidos de cadeia simples (presentes na fase líquida) obtidos da fermentação do glicerol eram estocados e mantidos em congelador para a utilização durante a operação do reator. A biomassa enriquecida era transferida para frascos apropriados de 50 mL após a centrifugação refrigerada (a 2.500 rpm por 16 minutos) e mantida a 4 °C até que fosse necessária sua reativação.

Foram testadas diferentes concentrações de glicerol: 5 g.L⁻¹; 10,0 g.L⁻¹; 15,0 g.L⁻¹; 20,0 g.L⁻¹; 25,0 g.L⁻¹ e 30,0 g.L⁻¹. Para todas as concentrações testadas, os ensaios foram realizados em frascos mantidos em câmara à temperatura de 30±1 °C e sob agitação de 120 rpm.

Como meio nutricional, adotou-se o meio BARBIRATO *et al.* (1995) modificado, descrito na Tabela 21.

Tabela 21 - Composição do meio de macronutrientes para a batelada do glicerol.

Componentes	Concentração (mg.L ⁻¹)
(NH ₄)Cl	1,62
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	20,00
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,00

Fonte: Barbirato *et al.* (1995) modificado.

Nos ensaios iniciais, eram coletadas amostras a cada 30 minutos, de três destes reatores (triplicata) para verificar a velocidade de reação. Após quantificados os parâmetros cinéticos, somente coletavam-se amostras ao final das bateladas, para verificar a degradação total de glicerol. Assim, quando essa condição era observada, as bateladas eram centrifugadas, o sobrenadante armazenado (congelado em recipientes plásticos) para ser utilizado como fonte de carbono no reator LEIA. A biomassa era imediatamente reutilizada nos ensaios seguintes ou guardada na geladeira até o próximo ensaio.

Para obter a taxa de degradação do glicerol, primeiramente verificou-se que o comportamento da cinética era de primeira e aplicou-se a Equação 23.

$$\ln(C) = \ln(C_0) \pm K'_0 \cdot (t - t_0) \quad (14)$$

Em que:

C = massa do composto por unidade de massa de SSV no tempo t [mgN.L⁻¹.gSSV⁻¹];

C₀ = massa do composto por unidade de massa de SSV no tempo inicial [mgN. L⁻¹. gSSV⁻¹];

K'₀ = constante cinética específica do modelo de ordem zero [mgN. gSSV⁻¹. h⁻¹];

t = tempo [horas].

Vale ressaltar que das triplicatas analisadas, aquela que apresentou o comportamento mais discrepante foi desconsiderada, e avaliou-se a cinética em duplicata.

Dentre as concentrações analisadas, foi verificado que as maiores concentrações dos ácidos acético (na ordem de 700 mg.L⁻¹) e propiônico (na ordem de 70 mg.L⁻¹) foram encontradas nas bateladas realizadas com de 20,0 g.L⁻¹ de glicerol. Assim, esta foi a concentração utilizada durante todos os ensaios subsequentes para a obtenção do fermentado.

O perfil temporal para a degradação do glicerol com concentração inicial de 20g.L⁻¹ está representado na Figura 33, para o ensaio 1 e na Figura 34 para o ensaio 2. A concentração de SSV da biomassa em cada ensaio foi 1,24 g.L⁻¹ e 1,32 g.L⁻¹, respectivamente.

Figura 33 - Ensaio 1 para o decaimento de 20 g.L⁻¹ de glicerol.

Fonte: Autor.

Observou-se que o decaimento de glicerol no ensaio 1 foi exponencial e com duração de aproximadamente 12 horas, até o valor residual de 600 mg.L⁻¹, resultando na eficiência de conversão de 97%.

Figura 34 - Ensaio 2 para o decaimento de 20g.L⁻¹ de glicerol.

Fonte: Autor.

Na Figura 34, verificou-se que o decaimento no ensaio 2 foi semelhante ao observado no ensaio 1 e, após 12 horas, apresentou concentração remanescente de 920 mg.L^{-1} , tendo apresentado uma eficiência de conversão do glicerol de 95,4%.

Após a linearização dos dados, obteve-se a velocidade específica de consumo de glicerol igual a $0,27 \text{ g.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($R^2= 98\%$) e $0,24 \text{ g.gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($R^2= 99\%$), para o ensaio 1 e ensaio 2, respectivamente.

É notório que ambos tiveram uma velocidade de decaimento próxima e em 12 horas o glicerol foi praticamente todo fermentado. Tal fato serviu como referência para as demais bateladas em que o decaimento não foi monitorado de hora em hora, mas somente ao final de 12 horas, para confirmar se o glicerol tinha sido praticamente todo consumido.