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

RODRIGO BRAZ CARNEIRO

**UTILIZAÇÃO DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO
PARA DESNITRIFICAÇÃO E REMOÇÃO BIOLÓGICA DE
FÓSFORO EM REATOR SUBMETIDO À AERAÇÃO
INTERMITENTE**

São Carlos, SP
2015

RODRIGO BRAZ CARNEIRO

**UTILIZAÇÃO DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO
PARA DESNITRIFICAÇÃO E REMOÇÃO BIOLÓGICA DE
FÓSFORO EM REATOR SUBMETIDO À AERAÇÃO
INTERMITENTE**

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

Orientador: Prof. Tit. Eugenio Foresti

São Carlos
2015

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.

C257u Carneiro, Rodrigo Braz
Utilização de glicerol como fonte de carbono para
desnitrificação e remoção biológica de fósforo em
reator submetido à aeração intermitente / Rodrigo Braz
Carneiro; orientador Eugenio Foresti. São Carlos, 2015.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2015.

1. Desnitrificação. 2. Remoção Biológica de
Fósforo. 3. Glicerol. 4. Aeração Intermitente. 5.
Relação C/N. 6. Relação C/P. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **RODRIGO BRAZ CARNEIRO**.

Título da dissertação: "Utilização de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo em reator submetido à aeração intermitente".

Data da defesa: 07/04/2015

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

APROVADO

Profa. Dra. **Simone Damasceno Gomes**
(Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE)

APROVADO

Prof. Dr. **Rogers Ribeiro**
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

APROVADO

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

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

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

Dedico este trabalho ao meu cunhado Carlos Tadeu Dantas (in memorian) por sempre me incentivar nesse caminho e por todos os ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por nunca desistir de me amar, mesmo com minhas limitações e fraquezas.

A minha mãe, Nilza, que sempre batalhou muito para garantir meus estudos.

Aos meus irmãos Renata, Rosilene e Ricardo, sobrinhos e demais familiares por todas as palavras de incentivo.

Ao meu orientador Prof. Eugenio Foresti por literalmente me orientar nos momentos onde tudo parecia que não tinha solução. Obrigado por toda a atenção e disposição em me ajudar e por ser esse exemplo de humildade e dedicação.

Aos professores Marcia Damianovic e Eduardo Cleto Pires por todas as sugestões no meu exame de qualificação.

A minha segunda família, MUR, em especial ao MUR São Carlos, por todo o apoio e oração. Por tudo o que vivemos obrigado. Por tudo o que viveremos, Sim!

Aos meus irmãos aqui da Rep. Sagrado por me darem força nos momentos de fraqueza e por todas as partilhas edificantes.

A todo o pessoal do LPB pela ajuda. Sozinhos realmente não somos e não fazemos nada. Um agradecimento especial a Vanessa, Clara, Kiemi, Marcus e Thaís, pela convivência e por sempre me alertarem dos meus erros.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento, em especial Rose, Sá e Priscila, pelo excelente atendimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

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

“Aos cegos farei seguir um caminho desconhecido, por atalhos desconhecidos eu os encaminharei; mudarei diante deles a escuridão em luz, e as veredas pedregosas em estradas planas. Todas essas maravilhas, eu as realizarei, não deixarei de executá-las.”

Isaías 42:16

RESUMO

CARNEIRO, R. B. **Utilização de Glicerol como fonte de carbono para Desnitrificação e Remoção Biológica de Fósforo em reator submetido à aeração intermitente.** 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Esse trabalho buscou avaliar a possibilidade de utilização do glicerol como fonte de carbono para a desnitrificação conjunta à remoção biológica de fósforo de um efluente sintético em um reator de fluxo contínuo submetido à aeração intermitente e com biomassa suspensa. O regime operacional do reator foi dividido em duas fases: a primeira visando somente a remoção de nitrato, testando diferentes relações Carbono/Nitrogênio (C/N) em Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) de 4 horas; e a segunda visando a remoção de nitrato e fosfato com períodos de aeração e não aeração de 2 e 4 horas respectivamente, para uma relação Carbono/Fósforo de 10 ± 1 . Na primeira fase operacional foram testadas 3 relações C/N, a saber: $1,2 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,1$ e $1,8 \pm 0,2$. Para a relação C/N de $1,8 \pm 0,2$ foi possível atingir uma maior eficiência de desnitrificação com uma maior estabilidade operacional - $91 \pm 8\%$. Para a segunda fase de operação que apresentou relação C/N de $3,5 \pm 0,2$, a desnitrificação foi completa na maior parte do tempo com $99 \pm 2\%$ de eficiência de remoção de NO_x (nitrato mais nitrito), indicando que a desnitrificação com glicerol é favorecida para relações C/N mais altas. Não foi evidenciado uma remoção biológica de fósforo expressiva ($9 \pm 12\%$), indicando que não houve desenvolvimento dos organismos acumuladores de fósforo (OAP's), uma vez que a liberação de fosfato durante a fase não aerada não ocorreu. Isso pode ser explicado pela falta de ácidos graxos voláteis (AGV), que seriam provenientes da degradação anaeróbia do glicerol, sendo a maior parte desse consumida na desnitrificação. Portanto, o teor de nitrato pode ter sido um fator de impedimento ao desenvolvimento dos OAP's. Pelos ensaios de microscopia óptica foi observado a presença de bactérias filamentosas semelhantes às do gênero *Beggiatoa*, que também podem ter consumido parte dos substratos da fermentação do glicerol. Por essas razões, sugere-se avaliar outras configurações de reatores de modo a promover uma efetiva fermentação do glicerol previamente ao sistema de remoção de fósforo.

PALAVRAS-CHAVE: Desnitrificação, remoção biológica de fósforo, glicerol, aeração intermitente, relação C/N, relação C/P.

ABSTRACT

CARNEIRO, R. B. **Glycerol as carbon source for Denitrification and Biological Phosphorus Removal in a reactor subjected to intermittent aeration.** 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

This study aimed to evaluate the feasibility of glycerol as a carbon source for denitrification and biological phosphorus removal of a synthetic wastewater in a continuous flow reactor with suspended biomass and subjected to intermittent aeration. The reactor operation was divided in two phases: the first one aimed only at removing nitrate, testing different C/N (Carbon/Nitrogen) ratios at an HRT (Hydraulic Retention Time) of 4 hours; and the second one aimed at the removal of nitrate and phosphate. During the second phase, the reactor was subjected to periods of aeration and non-aeration of 2 and 4 hours, respectively, for a C/P (Carbon/Phosphorus) ratio of 10 ± 1 . In the first operational phase, three C/N ratios were tested, as follows: 1.2 ± 0.1 ; 1.5 ± 0.1 and 1.8 ± 0.2 . For the C/N ratio of 1.8 ± 0.2 , it was possible to achieve higher denitrification efficiency with greater operational stability - $91 \pm 8\%$. For the second operational phase, with the C/N ratio of 3.5 ± 0.2 , the denitrification was complete most of the time presenting $99 \pm 2\%$ of NO_x (nitrate and nitrite) removal efficiency, indicating that the denitrification with glycerol is enhanced at higher C/N ratios. The biological phosphorus removal in this phase was not significant ($12 \pm 9\%$), indicating that there was no development of Phosphorus Accumulating Organisms (PAO), since the phosphate release during the anaerobic phase did not occur. This can be explained by the lack of Volatile Fatty Acids (VFA), which would come from the anaerobic degradation of glycerol that was consumed in denitrification. Therefore, the nitrate content may have been an interfering factor to the development of PAO. The optical microscopy analysis indicated the presence of filamentous bacteria similar to the genus *Beggiatoa*, which can also have consumed part of the substrates from the glycerol fermentation. For these reasons, it is suggested to evaluate other reactor configurations in order to promote the effective fermentation of glycerol previously to the phosphorus removal system.

KEYWORDS: Denitrification, biological phosphorus removal, glycerol, intermittent aeration, C / N ratio, C / P ratio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Transformações do Nitrogênio no processo de tratamento biológico. Adaptado de ECKENFELDER e ARGAMAN (1991)	6
Figura 2:	Sistema <i>Bardenpho</i> de 4 estágios para remoção de nitrogênio. Adaptado de GRADY JR. et al. (2011)	11
Figura 3:	Sistema Bardenpho Modificado de 5 estágios para remoção de nitrogênio e fósforo. Adaptado de GRADY JR. et al. (2011)	13
Figura 4:	Sistema UCT Modificado para remoção de nitrogênio e fósforo. Adaptado de GRADY JR. et al. (2011)	14
Figura 5:	Modelo Bioquímico Simplificado para OAP's sob condições anaeróbias e aeróbias (ou anóxicas). Adaptado de BASSIN (2012) e WENTZEL et al. (2008)	15
Figura 6:	Alguns processos geradores de Glicerol. a) Transesterificação; b) Hidrólise de Triglicerídeos; c) Saponificação. Adaptado de TAN (2013)	18
Figura 7:	Produção de Biodiesel (B100) e Glicerina gerada na sua produção de 2005 a 2013. Fonte: ANP (2014)	19
Figura 8:	Principais setores industriais de utilização da glicerina. Adaptado de MOTA (2009)	20
Figura 9:	Rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples. Adaptado de TEMUDO et al. (2008); PAPANIKOLAOU et al. (2008); SILVA et al. (2009)	22
Figura 10:	Utilização do doador de elétrons para produção de energia e síntese celular. Adaptado de RITTMANN e MCCARTY (2001); BENETTI e AQUINO (2010) ..	23
Figura 11:	Adaptação da biomassa em frasco de Duran usando Etanol como fonte de carbono	28
Figura 12:	Esquema do sistema de tratamento para a primeira fase de operação	33
Figura 13:	Instalação Experimental para a primeira fase de operação	34
Figura 14:	Esquema do sistema de tratamento para a segunda fase de operação	35
Figura 15:	Instalação Experimental para a segunda fase de operação	36
Figura 16:	Reações enzimáticas envolvidas na conversão do glicerol em dihidroxiacetona-fosfato pela ação sequencial das enzimas glicerol-quinase e glicerol-3-fosfato oxidase	38

Figura 17:	Amostras para construção da curva de calibração de GOH após tempo de reação.....	40
Figura 18:	Curva de Calibração para análise de GOH – 0 a 300 mg.L ⁻¹	40
Figura 19:	Variação das concentrações de DQO (a) e NOx (b) e eficiência de remoção durante a fase de adaptação com EtOH	43
Figura 20:	Teor de Nitrato e Nitrito afluentes ao longo da primeira fase operacional	45
Figura 21:	Gráficos de monitoramento de DQO (a), GOH (b), NOx (c) e relações DQO/N e C/N (d) ao longo da primeira fase operacional	46
Figura 22:	Gráficos de <i>Boxplot</i> de distribuição dos resultados de eficiência de remoção de DQO (a) e NOx (b) para as três condições testadas na primeira fase de operação	47
Figura 23:	Gráficos de monitoramento de alcalinidade (a) e pH (b) ao longo da primeira fase operacional	49
Figura 24:	Gráficos de monitoramento de DQO (a), GOH (b), NOx (c) e relações DQO/N e C/N (d) ao longo da segunda fase operacional	52
Figura 25:	Gráficos de monitoramento de P (a), Ácidos Voláteis (b), e relações DQO/P e C/P (c) ao longo da segunda fase operacional	54
Figura 26:	Gráficos de monitoramento de alcalinidade (a) e pH (b) ao longo da segunda fase operacional	56
Figura 27:	Perfil de OD para aeração intermitente na segunda fase operacional	57
Figura 28:	Imagens de microscopia óptica realizada ao final da Fase 1a. a) Floco de lodo ativado e colônia de microrganismos zoogleais; b) Detalhe para a forma bacilar levemente curva da bactéria; c) imagem ampliada da colônia de <i>Zoogloea</i>	59
Figura 29:	Biomassa no sistema ao final da primeira fase operacional - a) reator com biomassa granulada; b) Detalhe para a biomassa flotada; c) Comparação entre a biomassa do fundo e da superfície do reator	60
Figura 30:	Imagens de microscopia óptica da biomassa presente no fundo do reator ao final da Fase 1. a) Floco típico de <i>Zoogloea</i> ; b) Vários tipos de bacilos	61
Figura 31:	Imagens de microscopia óptica da biomassa presente na superfície do reator com destaque para <i>Beggiatoa</i> com grânulos de S ⁰	61
Figura 32:	Imagens de microscopia óptica na segunda fase de operação. a) Emaranhado de bactérias filamentosas; b) Cistos de protozoários; c) Ovo de verme; d) <i>Beggiatoa</i> com destaque para os grânulos de S ⁰	62

Figura 33: Dendograma com agrupamento UPGMA das amostras de biomassa das Fases 1 e
263

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Padrões de Qualidade de Nitrogênio e Fósforo para corpos d'água doce – CONAMA nº 357/05	4
Tabela 2:	Concentrações de nitrogênio em esgoto doméstico bruto (METCALF e EDDY, 1991)	5
Tabela 3:	Estudos utilizando fonte exógena de carbono para desnitrificação	11
Tabela 4:	Concentrações de fósforo em esgoto doméstico bruto (METCALF e EDDY, 1991)	12
Tabela 5:	Estudos utilizando fonte exógena de carbono para remoção biológica de fósforo	16
Tabela 6:	Semirreações de oxidação e redução usadas para o cálculo dos valores de f_e e f_s . Fonte: RITTMANN e MCCARTY (2001)	24
Tabela 7:	Caracterização de Sólidos no Lodo de Inóculo.....	27
Tabela 8:	Valores esperados para as concentrações da fonte de carbono na água residuária sintética em cada fase operacional	30
Tabela 9:	Concentrações das fontes de macronutrientes na água residuária sintética. Adaptado de Torres (1992)	31
Tabela 10:	Concentrações das fontes de micronutrientes na água residuária sintética. Adaptado de TOUZEL e ALBAGNAC (1983)	31
Tabela 11:	Características físicas do reator biológico	32
Tabela 12:	Análises físico-químicas de monitoramento do sistema de tratamento	37
Tabela 13:	Composição da solução Enzimática usada na análise de glicerol	39
Tabela 14:	Resultados médios obtidos na primeira fase com relação à DQO, GOH, NO_x e relações DQO/N e C/N	48
Tabela 15:	Teor médio de sólidos do efluente do reator para a primeira fase operacional	50
Tabela 16:	Resultados médios obtidos na segunda fase com relação à DQO, GOH, NO_x e relações DQO/N e C/N	53
Tabela 17:	Resultados médios obtidos na segunda fase com relação à P, ácidos voláteis e relações DQO/P e C/P	55
Tabela 18:	Teor médio de sólidos do efluente do reator para a segunda fase operacional	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Afluente
AAP	Aminoantipirina
ABQUIM	Associação Brasileira da Indústria Química
ADP	Adenosina difosfato
Afl.	Afluente
AGV	Ácidos graxos voláteis
AI	Aeração intermitente
APHA	<i>American public health association</i>
Art.	Artigo
AT	Alcalinidade total
ATP	Adenosina trifosfato
AVT	Ácidos voláteis totais
B	Biomassa
B100	Biodiesel puro
B5	Diesel contendo 5% de Biodiesel
B6	Diesel contendo 6% de Biodiesel
B7	Diesel contendo 7% de Biodiesel
BOA	Bactérias oxidadoras de amônio
BON	Bactérias oxidadoras de nitrito
CoA	Coenzima-A
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAP	Di-hidroxiacetonafofato
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E	Eficiência ou efluente
Efl.	Efluente
eq.	Equação
EtOH	Etanol
GK	Glicerol quinase

GOH	Glicerol
GPO	Glicerol 3-Fosfato oxidase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRT	<i>Hydraulic Retention Time</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
LPL	Lipase lipoproteica
M	Unidade de Mistura
Máx.	Máximo
Mín.	Mínimo
MONG	Matéria Orgânica não Glicerizada
NA	Não analisado
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NTA	Ácido nitrilotriacético
OAG	Organismos Acumuladores de Glicogênio
OAP	Organismos Acumuladores de Fósforo
OD	Oxigênio dissolvido
ODNAP	Organismos Desnitrificantes Acumuladores de Fósforo
O-PO ₄	Ortofosfato
P	Bomba
PA	Pureza analítica
PAO	<i>Phosphorus Accumulating Organisms</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDO	1,3-propanediol
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Polihidroxibutirato
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
POD	Peroxidase
Poli-P	Polifosfato
Res.	Resolução
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _r	RNA ribossômico

S	Concentração efluente ou separador
S ₀	Concentração afluenta
SDF	Sólidos dissolvidos fixos
SDT	Sólidos dissolvidos totais
SDV	Sólidos dissolvidos voláteis
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre 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
UCT	<i>University of Cape Town</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages</i>
USEPA	<i>United states environmental protection agency</i>
USP	<i>United states pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
v	Versão
VFA	<i>Volatile Fatty Acids</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Carbono
$C_3H_8O_3$	Glicerol
$C_5H_7O_2N$	Composição típica da célula bacteriana
$C_{10}H_{19}O_3N$	Representação típica do esgoto doméstico
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Cloreto de cálcio diidratado
$CaCO_3$	Carbonato de cálcio
CH_3COCOO^-	Piruvato
CH_3OH	Metanol
cm	Centímetro
C/N	Relação Carbono / Nitrogênio
CO_2	Gás carbônico
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloreto de cobalto hexaidratado
C/P	Relação Carbono / Fósforo
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	Cloreto de Cobre diidratado
DBO/P	Relação DBO / Fósforo
DP	Desvio padrão
DQO/N	Relação DQO / Nitrogênio
DQO/P	Relação DQO / Fósforo
e^-	Elétron (s)
eqe	Equivalente de elétron
F_d	Ferredoxina
f_e	Fração do doador de elétrons usado para energia
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Cloreto férrico hexaidratado
f_s	Fração do doador de elétrons usado para síntese
g	Grama (s)
h	Hora (s)
H^+	Íon hidrogênio
H_2	Gás hidrogênio
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$H_2PO_4^-$	Íon dihidrogenofosfato

H_3BO_3	Ácido bórico
H_3PO_4	Ácido fosfórico
HCO_3^-	Íon bicarbonato
HPO_4^{-2}	Íon hidrogenofosfato
k	Fração da energia capturada pelo ATP
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
KJ	Quilojoule
km	Quilômetro
kU.L^{-1}	Concentração de atividade enzimática
L	Litro
m	Metro
m^3	Metro cúbico
mg	Miligrama
Mg^{2+}	Íon magnésio
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio heptaidratado
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
$\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de manganês tetraidratado
N	Nitrogênio
nº	Número
N_2	Gás nitrogênio
N_2O	Oxido nitroso
$\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sódio diidratado
$\text{Na}_2\text{SeO}_3.5\text{H}_2\text{O}$	Selenito de sódio pentaidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NaNO_3	Nitrato de sódio
NaOH	Soda cáustica
NH_3	Amônia

NH_4^+	Íon amônio
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de níquel hexaidratado
nm	Nanômetro
NO	Oxido nítrico
NO_2^-	Íon nitrito
NO_3^-	Íon nitrato
NO_x	Nitrato mais Nitrito
O_2	Gás oxigênio
OH^-	Íon hidroxila
P	Fósforo
PO_4^{-3}	Fosfato
R	Reação global
®	Marca registrada
R_a	Semirreação do acceptor de elétrons
R_d	Semirreação do doador de elétrons
R_p	Semirreação de formação do piruvato
rpm	Rotações por minuto
R_s	Semirreação de síntese celular
s	Desvio padrão
S^0	Enxofre elementar
ton.	Tonelada (s)
V	Volt (s)
$\bar{x}$	Média
Y	Coeficiente de produção celular
ZnCl_2	Cloreto de zinco
α	Nível de Significância
ΔG^0	Variação da energia livre de Gibbs padrão
ΔG_{ana}	Variação da energia livre no anabolismo
ΔG_c	Variação da energia livre na conversão de piruvato em célula
ΔG_{cat}	Variação da energia livre no catabolismo
ΔG_n	Variação da energia livre na redução de NO_3^- em NH_4^+
ΔG_p	Variação de energia livre na conversão de GOH em piruvato
ΔG_r	Variação de energia livre da reação catabólica

ΔG_s	Variação da energia livre na síntese celular
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
§	Parágrafo
$^{\circ}\text{C}$	Graus Célcus
$>$	Maior que
$<$	Menor que
$\leq$	Menor ou igual que
$\cong$	Aproximadamente
$\pm$	Mais ou menos
%	Por cento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Principal.....	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Aspectos legais da remoção de nutrientes	4
3.2. Remoção Biológica de Nitrogênio	5
3.2.1. Amonificação.....	6
3.2.2. Nitrificação	7
3.2.3. Desnitrificação.....	8
3.3. Remoção Biológica de Fósforo	12
3.4. Glicerol / Glicerina.....	17
3.4.1. Origem e nomenclatura	17
3.4.2. Panorama geral do Mercado de Glicerina	19
3.4.3. Fermentação do glicerol	21
3.4.4. Glicerol como fonte de carbono para remoção de nutrientes	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Descrição do Regime Operacional do Sistema	27
4.1.1. Pré-operação – Adaptação da Biomassa.....	27
4.1.2. Fase 1 – Desnitrificação	28
4.1.3. Fase 2 – Desnitrificação e remoção biológica de fósforo.....	29
4.2. Descrição do Substrato Sintético.....	29
4.3. Aparato Experimental.....	32
4.3.1. Fase 1	32
4.3.2. Fase 2	34
4.4. Monitoramento do Sistema	36
4.4.1. Análise Enzimática de GOH.....	38
4.5. Análises Microbiológicas	41
4.5.1. Microscopia Óptica.....	41
4.5.2. PCR / DGGE	41
4.6. Análise Estatística dos dados	42

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Fase de adaptação	43
5.2. Fase 1.....	44
5.2.1. Remoção de Matéria Carbonácea e Eficiência de Desnitrificação	44
5.2.2. pH e Alcalinidade	49
5.2.3. Sólidos	50
5.3. Fase 2.....	50
5.3.1. Remoção de Matéria Carbonácea e Eficiência de Desnitrificação	51
5.3.2. Remoção de fósforo e análise de ácidos voláteis	53
5.3.3. pH e Alcalinidade	55
5.3.4. Sólidos	56
5.3.5. Perfil de OD.....	57
5.4. Análises Microbiológicas	58
5.4.1. Microscopia Óptica.....	58
5.4.2. PCR / DGGE	62
6. CONCLUSÕES	64
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

Segundo diagnóstico do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento - SNIS (2014), para o ano de 2013, apenas 39% do total de esgoto gerado no país recebia tratamento. O lançamento de efluentes sanitários não tratados nos corpos d'água receptores pode levar a danos irreversíveis tanto para a biota aquática quanto para a saúde da população humana.

Os sistemas de tratamento biológico convencionais de esgotos sanitários são projetados visando, principalmente, a remoção de matéria carbonácea. Em geral, os efluentes apresentam concentrações de nitrogênio e fósforo próximas às do esgoto bruto, dificultando o atendimento às exigências da legislação ambiental brasileira, com relação aos teores dos mesmos nos corpos d'água. Esse fato é agravado quando a diluição do esgoto no corpo receptor é baixa. Nos anos recentes, a preocupação com relação à remoção de nutrientes, notadamente nitrogênio e fósforo tem aumentado, devido aos diversos problemas causados pela descarga destes poluentes no ambiente aquático.

Segundo vários autores (ESTEVES, 1998; ECKENFELDER e ARGAMAN, 1991; BURKE et al., 2004; BASSIN, 2012), um dos principais problemas advindos das altas concentrações de nitrogênio e fósforo está relacionado à eutrofização acelerada dos corpos d'água. Isso pode levar à proliferação de algas e/ou macrófitas aquáticas que provocam o desequilíbrio na diversidade de espécies; ao aumento do consumo de oxigênio dissolvido do meio pela decomposição da biomassa remanescente, resultando em condições anaeróbias; à mortandade de peixes pela ausência de oxigênio dissolvido ou pela presença de toxinas produzidas pelas algas. Com relação a problemas econômicos, ocorrem alterações na qualidade e quantidade de peixes de valor comercial; problemas estéticos e recreacionais; maior dificuldade e custo do tratamento da água para abastecimento. Com relação a problemas na saúde pública, as toxinas liberadas pelas algas podem chegar ao organismo humano, levando a problemas neurotóxicos e hepatotóxicos, inclusive com o desenvolvimento de cânceres. Além disso, o nitrato está relacionado com a formação da metahemoglobina, que leva à redução da transferência de oxigênio às células do corpo.

A remoção de nitrogênio e fósforo de efluentes líquidos se mostra como uma das técnicas mais eficazes no controle da eutrofização e pode ser realizada tanto por processos biológicos quanto físico-químicos ou uma combinação de ambos. A remoção por via biológica se mostra mais econômica se comparada à remoção físico-química, principalmente devido aos gastos com

insumos químicos e disposição do lodo. Dessa forma, tem-se buscado otimizar cada vez mais a remoção de nutrientes por via biológica, em vistas a atender aos requisitos legais.

A remoção biológica completa de nitrogênio envolve etapas de nitrificação e desnitrificação. O processo de lodos ativados convencional promove satisfatoriamente a nitrificação, sem, contudo, promover a remoção de nitrogênio, uma vez que somente ocorre a conversão das formas nitrogenadas (Nitrogênio Amônico a Nitrato). Atualmente já se tem variantes do processo de lodos ativados bem estabelecidas capazes de promover a desnitrificação, com a presença de regiões anóxicas no sistema.

Com relação à remoção biológica de fósforo, faz-se necessária a existência de uma zona anaeróbia (ausência de oxigênio livre ou combinado) e uma zona aeróbia para o desenvolvimento dos organismos acumuladores de fósforo, sendo este eliminado através do descarte de lodo em excesso. Assim como na remoção biológica de nitrogênio, podem ser realizadas adaptações nos processos convencionais a fim de remover fósforo do sistema.

Atualmente tem-se estudado processos biológicos para remoção simultânea de nitrogênio e fósforo, sendo a matéria orgânica solúvel um fator limitante para a desnitrificação heterotrófica e para a liberação de fósforo na zona anaeróbia com posterior incorporação na biomassa aeróbia (TAM et al., 1992; ISAACS e HENZE, 1995; AHMED, Z. et al., 2008; WANG et al., 2009). Porém, ocorre que nem sempre há matéria orgânica suficiente para promover a remoção satisfatória de nutrientes do sistema, sendo necessária a suplementação através de uma fonte externa de carbono.

Várias fontes de carbono têm sido testadas para a desnitrificação conjunta ou não com a remoção biológica de fósforo, tais como: metanol, etanol, ácido acético, entre outros, sendo que alguns fatores determinantes na escolha da fonte de carbono são: custo, disponibilidade, produção de lodo, cinética, grau de utilização pela biomassa, segurança na estocagem, manuseio, transporte, entre outros. (FERNÁNDEZ-NAVA et al., 2010).

Alguns estudos têm sido realizados usando o glicerol como doador de elétrons para a remoção biológica de nitrogênio e fósforo separadamente. Esta fonte de carbono se mostra promissora, uma vez que é um subproduto da produção de biodiesel com tendência de aumento de disponibilidade, sobretudo no Brasil, devido aos incentivos crescentes à produção deste biocombustível, fazendo com que haja cada vez mais glicerina no mercado. Ademais, se comparado com outras fontes de carbono, o glicerol possui menor custo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

Avaliar a possibilidade de utilização do glicerol como fonte de carbono para a desnitrificação conjunta à remoção biológica de fósforo de um efluente sintético, em um reator de fluxo contínuo submetido a aeração intermitente e com biomassa suspensa.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho do sistema de tratamento na remoção de nitrogênio e fósforo para diferentes relações DQO/N (ou C/N);
- Estabelecer a melhor dosagem de glicerol requerida para a desnitrificação e para a remoção biológica de fósforo;
- Avaliar comparativamente a morfologia das populações de microrganismos presentes no reator para as condições estáveis de cada fase operacional.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos legais da remoção de nutrientes

A necessidade ou a determinação de se efetuar a remoção de nitrogênio e fósforo vai depender dos objetivos mais amplos do tratamento e da qualidade do efluente final e do corpo d'água receptor. Em ambientes lênticos como lagos, represas e estuários, que são mais sensíveis a problemas de poluição, como a eutrofização, a remoção biológica de nutrientes assume maior importância, sendo requerida uma menor concentração efluente nos sistemas de tratamento. Dessa forma, os padrões de lançamento de efluentes e de qualidade dos corpos d'água podem direcionar a decisão sobre a necessidade e o nível que deve ser praticado a remoção de nutrientes.

Na Tabela 1 encontram-se os requisitos legais de qualidade para os corpos d'água doce relacionados às formas de nitrogênio e fósforo previstos na Resolução CONAMA nº 357 / 2005. Com relação aos padrões de lançamento de efluentes, a resolução vigente (Resolução CONAMA nº 430 / 2011) não determina padrões específicos para nitrogênio e fósforo de efluentes sanitários, ficando a cargo de cada estado estabelecer seus limites caso houver necessidade. De qualquer forma, devem ser atendidos os padrões de qualidade nos corpos d'água receptores, devendo ser estabelecidas as razões de diluição requeridas em vista a atender o enquadramento de classes.

Tabela 1: Padrões de Qualidade de Nitrogênio e Fósforo para corpos d'água doce – CONAMA nº 357/05

Parâmetro		Unidade	Águas Doces		
			Classe 1	Classe 2	Classe 3
Nitrogênio Amoniacal Total	$\text{pH} \leq 7,5$	mgN.L^{-1}	3,7	3,7	13,3
	$7,5 < \text{pH} \leq 8,0$	mgN.L^{-1}	2,0	2,0	5,6
	$8,0 < \text{pH} \leq 8,5$	mgN.L^{-1}	1,0	1,0	2,2
	$\text{pH} > 8,5$	mgN.L^{-1}	0,5	0,5	1,0
Nitrato		mgN.L^{-1}	10,0	10,0	10,0
Nitrito		mgN.L^{-1}	1,0	1,0	1,0
Nitrogênio Total*	Ambiente lêntico	mgN.L^{-1}	1,27	1,27	-
	Ambiente lótico	mgN.L^{-1}	2,18	2,18	-
Fósforo Total	Ambiente lêntico	mgP.L^{-1}	0,020	0,030	0,050
	Ambiente intermediário**	mgP.L^{-1}	0,025	0,050	0,075
	Ambiente lótico	mgP.L^{-1}	0,10	0,10	0,15

* Valores de nitrogênio total (após oxidação) estabelecidos quando o nitrogênio for fator limitante para eutrofização, nas condições estabelecidas pelo órgão ambiental competente – Art. 10º, § 3º da Res. CONAMA 357 / 2005;

** Ambiente intermediário – tempo de residência entre 2 e 40 dias.

Como podem ser visualizados na Tabela 1, os valores de nutrientes a serem mantidos nos corpos d'água receptores são bem restritos, notadamente o fósforo, o que assevera o fato da importância da remoção desses compostos nos sistemas de tratamento. Para o nitrogênio os valores são menos restritivos, sendo geralmente o fósforo o elemento limitante para a definição da razão de diluição requerida para o lançamento de efluentes.

3.2. Remoção Biológica de Nitrogênio

A remoção de nitrogênio de águas residuárias pode ser realizada tanto por via físico-química quanto por via biológica. Alguns processos físico-químicos que podem ser citados compreendem *stripping* de amônia, cloração ao *breakpoint*, troca iônica e osmose reversa. Para o caso de esgotos domésticos brutos, a remoção biológica se mostra mais viável economicamente e é mais frequentemente aplicada (USEPA, 1993; METCALF e EDDY, 2003).

O nitrogênio no esgoto doméstico se apresenta principalmente nas formas de nitrogênio orgânico e nitrogênio amoniacal, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações de nitrogênio em esgoto doméstico bruto (METCALF e EDDY, 1991).

Parâmetro	Concentração Média (mg.L ⁻¹)	Faixa de Concentração (mg.L ⁻¹)
Nitrogênio total	40	20 - 85
Nitrogênio orgânico	15	8 - 35
Nitrogênio amoniacal	25	12 - 50
Nitrito	≈ 0	≈ 0
Nitrato	≈ 0	≈ 0

Para que haja remoção completa do nitrogênio das águas residuárias por via biológica convencional é necessário que ocorram basicamente três etapas: amonificação, nitrificação e desnitrificação, conforme esquema representado na Figura 1.

Figura 1: Transformações do Nitrogênio no processo de tratamento biológico.
Adaptado de ECKENFELDER e ARGAMAN (1991)

3.2.1. Amonificação

Conforme pode ser observado na Tabela 2, por volta de 40% do nitrogênio total corresponde ao nitrogênio orgânico, que compreende predominantemente a ureia, além de aminoácidos (ECKENFELDER e ARGAMAN, 1991). Para uma efetiva remoção de nitrogênio, faz-se necessário que haja inicialmente a amonificação do nitrogênio orgânico (Equação 1).

O Nitrogênio Amoniacal estará presente na solução tanto na forma ionizada (NH_4^+) quanto na forma livre, não ionizada ($\text{NH}_{3(\text{g})}$), dependendo do pH da solução, segundo a reação de equilíbrio apresentada na Equação 2.

À medida que o pH diminui, o equilíbrio se desloca para a esquerda aumentando a concentração de N-NH_4^+ . Além do pH, a temperatura também influencia na distribuição das

formas de nitrogênio amoniacal. Dessa forma, com a constante de equilíbrio da reação, o pH e a temperatura é possível prever a distribuição das formas de nitrogênio amoniacal. Para a faixa usual de pH dos esgotos entre 6,5 e 7,5, e para uma faixa de temperatura típica entre 15 e 25°C, praticamente toda amônia está na forma ionizada, sendo passível de nitrificação (METCALF e EDDY, 2003).

3.2.2. Nitrificação

A nitrificação convencional compreende duas etapas mediadas por bactérias aeróbias obrigatórias autotróficas. Na primeira delas, o amônio é oxidado para nitrito (nitritação - Equação 3) através da ação bioquímica de bactérias oxidadoras de amônio (BOA), como as do gênero *Nitrosomonas*. No passo seguinte, ocorre a oxidação de nitrito para nitrato (nitratação - Equação 4), sendo mediada por bactérias oxidadoras de nitrito (BON) como as do gênero *Nitrobacter*.

De acordo com RITTMANN e MCCARTY (2001), outros gêneros de bactérias autotróficas são capazes de obter energia da oxidação do amônio a nitrito, como as *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*. Da mesma forma, outros gêneros de bactérias com o prefixo *Nitro* são capazes de promover nitratação como as *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrocystis*.

Fazendo-se a soma das Equações 3 e 4, tem-se a reação de oxidação total do amônio (Equação 5). Como pode ser observado, a nitrificação produz íons H^+ , provocando o consumo de alcalinidade, que pode ser estimado pela reação 6.

Pela estequiometria da reação anterior, a nitrificação requer 4,57 gO₂/gN-NH₄⁺ oxidado (3,43 gO₂/gN na nitrificação mais 1,14 gO₂/gN na nitratação) e 7,14 g de alcalinidade (como CaCO₃) / gN-NH₄⁺ oxidado.

Essas equações anteriores não levam em consideração a síntese celular das bactérias nitrificantes. Uma parte do nitrogênio amoniacal é usada para a formação de novas células, sendo a composição típica da célula bacteriana dada por C₅H₇O₂N. Segundo USEPA (1993), o rendimento máximo total da nitrificação calculado pela liberação da energia teórica das reações é de 0,374 gSSV / gN-NH₄⁺ oxidado. Entretanto, os valores observados em experimentos são menores, variando de 0,06 a 0,20 gSSV/gN-NH₄⁺ oxidado. RITTMANN e MCCARTY (2001) citam que o valor de 0,21 gSSV/gN-NH₄⁺ representa uma situação típica para reação de nitrificação global considerando ambos tipos de organismos nitrificantes em conjunto – BOA e BON. Isso resulta na seguinte reação empírica de nitrificação incluindo a síntese celular:

Para esta reação, observa-se o requerimento de 4,15 gO₂ / gN-NH₄⁺ oxidado e 7,05 g de alcalinidade (como CaCO₃) / gN-NH₄⁺ oxidado, valores ligeiramente menores do que os apresentados anteriormente.

3.2.3. Desnitrificação

A desnitrificação biológica convencional consiste na conversão do nitrato (aceptor de elétrons) a nitrogênio gasoso (N₂) em condições anóxicas, tendo como formas intermediárias o NO₂⁻, NO e N₂O, sendo as reações catalisadas por diferentes enzimas, conforme reações representadas pelas Equações de 8 a 11 (RITTMANN e MCCARTY, 2001).

O N_2 formado é passível de separação da fase líquida, culminando com a eliminação do nitrogênio da água residuária. O processo é mediado por uma variedade de bactérias heterotróficas facultativas. As desnitrificantes são comuns entre as espécies de Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Algumas bactérias Gram-positivas, incluindo *Bacillus*, também podem promover desnitrificação. (RITTMANN e MCCARTY, 2001).

Um dos requisitos para a ocorrência da desnitrificação é a presença de um doador de elétrons (reduzidor de nitrato) na forma de matéria orgânica biodegradável. Segundo METCALF e EDDY (2003), o doador de elétrons para a desnitrificação pode se originar de três fontes, a saber:

- Matéria orgânica biodegradável do afluente (esgoto) sendo representada por $C_{10}H_{19}O_3N$ (proposto por USEPA, 1993);

- Matéria orgânica do material celular bacteriano (respiração endógena);

- Matéria orgânica de uma fonte externa de carbono (representada por $C_xH_yO_z$).

Nos sistemas de desnitrificação onde a matéria orgânica biodegradável é escassa, predomina o mecanismo de desnitrificação pelo carbono da respiração endógena – Equação 13. Porém, muitas vezes esse carbono não é suficiente para uma desnitrificação completa, sendo necessária a adição de uma fonte externa de carbono – Equação 14, como metanol, etanol ou ácido acético. Como exemplo, para o metanol, tem-se a reação dada pela Equação 15.

Dessa equação, resulta o consumo teórico de 1,9 gCH₃OH / gN-NO₃⁻ reduzido. Porém, na prática, este consumo será maior quando se leva em consideração que parte da matéria orgânica e do nitrogênio é utilizada para o anabolismo. A Equação empírica 16, proposta por ECKENFELDER e ARGAMAN (1991), considera o rendimento de 0,45 gSSV / gN-NO₃⁻ reduzido. Dessa forma, a quantidade de metanol requerido será na realidade de 2,47 gCH₃OH / gN-NO₃⁻ reduzido.

Ainda segundo as reações de desnitrificação apresentadas, verifica-se que ocorre o consumo de 1 mol de H⁺ (produção de 1 mol de OH⁻) por mol de nitrato reduzido, ou ainda há a geração de um mol de alcalinidade (ou 50 gCaCO₃), representando 3,57 g de alcalinidade (como CaCO₃) / gN-NO₃⁻ reduzido, o que compensa aproximadamente a metade da alcalinidade consumida durante a nitrificação.

A quantidade real de fonte de carbono necessária para uma desnitrificação completa (relação C/N ótima) vai depender de vários fatores, que envolvem as condições operacionais do reator e o tipo de doador de elétrons utilizado (METCALF e EDDY, 2003).

SANTOS (2009) ressalta que sistemas biológicos similares podem ter diferentes relações C/N ótimas se usadas para tratar diferentes águas residuárias sob diferentes condições ambientais e em reatores distintos. Por isso, a relação C/N ótima para sistemas desnitrificantes biológicos que tratam águas residuárias específicas deve ser determinada experimentalmente. Vários estudos mostram diferentes fontes de carbono sendo testadas para promover a desnitrificação, bem como a melhor relação C/N (ou DQO/N) estabelecida. Alguns destes trabalhos são apontados na Tabela 3.

Tabela 3: Estudos utilizando fonte exógena de carbono para desnitrificação

Fonte de Carbono	Relação C/N ótima	Eficiência Desnitrificação	Referência
Metanol	1,05	100,0%	NARKIS et al., 1979
Metanol	1,10	99,4%	HER e HUANG, 1995
Metanol	0,93	100,0%	CALLADO e FORESTI, 2002
Metanol	1,00	100,0%	SANTOS, 2003
Etanol	0,83	100,0%	CALLADO e FORESTI, 2002
Etanol	1,00	100,0%	SANTOS, 2003
Ácido Acético	2,40	99,7%	HER e HUANG, 1995
Acetato de Sódio	1,35	100,0%	NARKIS et al., 1979
Acetato de Sódio	1,56	99,9%	SHEN, J. et al., 2009
Ácido Benzoico	3,10	92,1%	HER e HUANG, 1995
Glicose	2,80	99,2%	HER e HUANG, 1995
Glicerol	1,00	98,0%	GRABINSKA-LONIEWSKA et al., 1985
Glicerol	3,00	100,0%	CYPLIK et al., 2013

A Figura 2 mostra o esquema de um sistema convencional para remoção completa de nitrogênio - sistema Bardenpho de 4 estágios – no qual geralmente se faz necessária a adição de uma fonte externa de carbono no segundo reator anóxico, uma vez que grande parte da matéria orgânica é consumida no reator aeróbico. A maior parte da remoção de nitrato proveniente do reator aeróbico, resultante da recirculação interna, ocorre no primeiro reator anóxico, usando a matéria orgânica afluyente como fonte de doador de elétrons.

Figura 2: Sistema *Bardenpho* de 4 estágios para remoção de nitrogênio.
Adaptado de GRADY JR. et al. (2011)

3.3. Remoção Biológica de Fósforo

O fósforo se apresenta no esgoto doméstico nas formas orgânica e inorgânica, conforme mostrado na Tabela 4. A forma inorgânica é dividida em ortofosfatos e polifosfatos. Os ortofosfatos estão diretamente disponíveis para o metabolismo microbiano sem necessidade de conversões a formas mais simples e incluem as formas PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , H_3PO_4 , sendo que para o pH usual do esgoto, a forma predominante é o HPO_4^{2-} . Os polifosfatos são moléculas mais complexas com dois ou mais átomos de fósforo, sendo convertidos a ortofosfatos por meio de hidrólise. A forma orgânica, geralmente ligada a aminoácidos, pode ser convertida a ortofosfatos por meio da oxidação completa da matéria orgânica (USEPA, 1993; METCALF e EDDY, 2003).

Tabela 4: Concentrações de fósforo em esgoto doméstico bruto (METCALF e EDDY, 1991)

Parâmetro	Concentração Média (mg.L ⁻¹)	Faixa de Concentração (mg.L ⁻¹)
Fósforo total	8	4 - 15
Fósforo orgânico	3	1 - 5
Fósforo inorgânico	5	3 - 10

Ao contrário do nitrogênio, o fósforo não possui uma forma gasosa que possa ser eliminada do meio líquido. A remoção biológica de fósforo de águas residuárias se dá pela incorporação de fosfato à biomassa, podendo ser removido por sedimentação, filtração ou algum outro processo de remoção de sólidos (REGINATTO e SCHMIDELL, 2007).

A remoção de fósforo também pode ser realizada por precipitação química pela adição de sais metálicos de alumínio ou ferro. Entretanto, este processo químico possui algumas desvantagens frente ao processo biológico, tais como: o custo envolvido na compra das substâncias e elevação da salinidade (condutividade) da água pelos sais utilizados, tornando o reuso da água extremamente difícil (VAN HAANDEL et al., 2009). Segundo METCALF e EDDY (2003), a cal também pode ser utilizada na precipitação química de fósforo, porém é menos utilizada devido ao aumento substancial da massa de lodo, quando comparada aos sais de metal, e devido a problemas de operação e manutenção, associados a manipulação, estocagem e dosagem.

O fósforo é um nutriente necessário para a síntese de importantes compostos bioquímicos das células bacterianas, atuando nos mecanismos de transferência de energia celular via trifosfato de adenosina (ATP). Para bactérias heterotróficas comuns em lodos ativados a

composição celular típica em termos de teor de fósforo é de 1,5 a 2%. Entretanto, muitas bactérias são capazes de armazenar fósforo em suas células na forma de polifosfatos, resultando num teor de fósforo de 20 a 30% de massa seca. Esses microrganismos são denominados organismos acumuladores de fósforo – os OAP's (METCALF e EDDY, 2003).

Segundo STENSEL (1991), o desenvolvimento histórico da remoção biológica de fósforo se deu através das seguintes constatações:

- Observações nos lodos de estações de tratamento biológico que possuíam altos teores de fósforo;
- Reconhecimento da necessidade de uma zona anaeróbia anterior a zona aeróbia;
- Necessidade de excluir aceptores de elétrons aeróbios ou anóxicos da zona anaeróbia;
- Necessidade da presença de substratos simples na zona anaeróbia.

Baseando-se nessas premissas, os sistemas de lodos ativados foram sendo adaptados para a remoção conjunta de nitrogênio e fósforo, com a inclusão de uma zona anaeróbia prévia às zonas anóxicas, como pode ser observado nas Figuras 3 e 4, que apresentam exemplos de sistemas para remoção completa de nitrogênio e fósforo.

Figura 3: Sistema *Bardenpho* Modificado de 5 estágios para remoção de nitrogênio e fósforo.
Adaptado de GRADY JR. et al. (2011)

Figura 4: Sistema UCT Modificado para remoção de nitrogênio e fósforo.
Adaptado de GRADY JR. et al. (2011)

A diferença entre o sistema Bardenpho de 5 estágios para o sistema UCT (*University of Cape Town*) é que este previne o retorno do nitrato para a zona anaeróbia, sendo que o sistema UCT modificado possui um reator anóxico somente para a redução do nitrato proveniente da linha de recirculação de lodo, enquanto que o segundo reator anóxico é responsável pela remoção de nitrato proveniente do reator aeróbio.

Sob condições anaeróbias, os OAP's irão armazenar em suas células os ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos pelos organismos facultativos durante a fermentação da matéria orgânica solúvel biodegradável, sendo que os OAP's apresentam uma vantagem competitiva na assimilação de AGV, fazendo com que a zona anaeróbia seja um seletor biológico para eles (STENSEL, 1991).

Segundo VAN HAANDEL et al. (2009), os próprios OAP's não são capazes de converter material orgânico em acetato. Assim, no caso de águas residuárias sem AGV, a presença de organismos não acumuladores de fósforo é necessária para gerar o substrato para os OAP's. Portanto, nos sistemas de remoção de P em excesso, há uma cultura mista composta por OAP's e bactérias não acumuladoras de fósforo presentes em sistemas de lodo ativado convencionais.

Usando a energia contida nos polifosfatos (Poli-P) armazenados na célula, os OAP's produzem polihidroxibutirato (PHB) a partir do acetato, que fica também armazenado na célula. Algum glicogênio contido na célula também é usado na síntese de PHB. Dessa forma, o conteúdo celular de PHB aumenta enquanto o de Poli-P diminui, com a liberação de ortofosfato (O-PO_4) para o meio. Na zona aeróbia, o PHB é metabolizado, produzindo gás carbônico e água, e um pouco de glicogênio, e a energia da oxidação do PHB é utilizada para formação de novas células, incluindo a formação de Poli-P, proveniente do acúmulo de O-PO_4 em excesso no meio (WENTZEL et al., 2008).

A remoção efetiva de fósforo do sistema ocorrerá com o descarte de lodo excedente, rico em OAP's com alto conteúdo de fósforo em suas células (METCALF e EDDY, 2003). Na Figura 5 a seguir encontra-se um modelo bioquímico simplificado para os OAP's sob condições anaeróbias e aeróbias (ou anóxicas).

Figura 5: Modelo Bioquímico Simplificado para OAP's sob condições anaeróbias e aeróbias (ou anóxicas). Adaptado de BASSIN (2012) e WENTZEL et al. (2008)

Segundo USEPA (2009), além dos OAP's, há também os organismos acumuladores de glicogênio (OAG's) que podem consumir AGV do meio na zona anaeróbia, armazenando na forma de PHB. Certas condições, tais como altas temperaturas, e altas relações DQO/P (maior que 50), podem favorecer os OAG's, reduzindo ou impedindo a liberação de fósforo na zona anaeróbia, o que dificulta a remoção biológica de fósforo.

Os principais fatores ambientais que afetam a remoção biológica de fósforo são o oxigênio, a temperatura e o pH. Desde que o TDH na zona aeróbia seja suficiente, a concentração de OD acima de 2 mg.L^{-1} já é adequada para promover o acúmulo de fosfato do meio. Com relação à temperatura, a remoção biológica de fósforo tem sido aplicada com sucesso em uma ampla faixa, não sendo fortemente afetada por baixas temperaturas. Nestas condições, o que pode ocorrer é a menor taxa de liberação de fósforo, necessitando maiores tempos de detenção na zona anaeróbia. Quanto ao pH, a faixa ideal é de 7,5 a 8, sendo a eficiência de remoção significativamente reduzida em pH menor que 6,5 e toda atividade é perdida em pH de 5,2 (STENSEL, 1991).

Segundo REGINATTO e SCHMIDELL (2007), outro fator importante na remoção de fósforo é a disponibilidade dos produtos da fermentação para os OAP's. Quanto maior essa

disponibilidade, maior a remoção. Conforme já mencionado, os AGV são provenientes da matéria orgânica facilmente biodegradável presente no afluente.

Na prática do tratamento de esgoto doméstico, o material orgânico afluente em geral não está na forma adequada para ser utilizado por OAP's. Normalmente, a concentração de AGV afluente é inferior a 10% da DQO total da água residuária, mesmo quando o tempo de permanência na rede é longo e alguma fermentação ocorra, produzindo ácido acético. Portanto, tem-se que a causa mais comum quando a remoção de P é insuficiente é a existência de uma desproporção entre a concentração de P afluente e a concentração de AGV disponível ou gerada na zona anaeróbia. Uma forma de se aumentar a concentração de material rapidamente biodegradável no afluente é adicionando-se material orgânico externo facilmente biodegradável, tais como ácido acético ou metanol (VAN HAANDEL et al., 2009).

Segundo USEPA (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. Na Tabela 5 são mostrados alguns estudos realizados com diferentes fontes de carbono visando a remoção biológica de fósforo, bem como a melhor relação DQO/P estabelecida.

Tabela 5: Estudos utilizando fonte exógena de carbono para remoção biológica de fósforo

Fonte de Carbono	Relação DQO/P ótima	Eficiência Remoção de P	Referência
Esgoto Doméstico	19,9	94%	WANG et al., 2009
Glicerol	30	100%	GUERRERO et al., 2012
Glicerol Fermentado	12	100%	YUAN et al. 2010
Metanol	20	49%	WANG et al., 2013
Etanol	20	91%	WANG et al., 2013
Acetato e Propionato de Sódio	15	100%	BROUGHTON et al., 2008
Glicose	18 a 20	98%	CHUANG et al., 2011

De acordo com REGINATTO e SCHMIDELL (2007), a presença de nitrato na zona anaeróbia reduz a disponibilidade de matéria orgânica biodegradável através da desnitrificação e, conseqüentemente, a eficiência de remoção de fósforo devido à competição pelo substrato orgânico em dois níveis: entre as desnitrificantes e as fermentativas pelo substrato propriamente dito; e entre as desnitrificantes e os OAP's pelos AGV's formados. Entretanto, esses autores ressaltam que pode haver a presença de OAP's capazes de desnitrificar; ou seja, em condições anóxicas, esses microrganismos desnitrificam usando PHB como doador de elétrons e o nitrato como aceptor final de elétrons, ao mesmo tempo em que procedem à captação de fósforo. Esses organismos são chamados de organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo (ODNAP).

PATEL e NAKHLA (2006) fazem uma ressalva que os ODNAP's são 40% menos eficientes em termos de geração de energia, apresentando rendimento celular de 20 a 30% menor do que os OAP's aeróbios, o que pode resultar em remoção de fósforo insatisfatória. Segundo estudos desses autores, só foi possível iniciar a liberação de fósforo na zona anaeróbia para concentração de N-NO_3^- inferior a $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$.

3.4. Glicerol / Glicerina

3.4.1. Origem e nomenclatura

O Glicerol apresenta-se naturalmente sob formas combinadas, como os glicerídeos, em todos os óleos graxos animais e vegetais, e é recuperado como um coproduto quando estes óleos ou gorduras sofrem as seguintes reações que são apontadas na Figura 6 (LOPES, 2011):

- Transesterificação com metanol (ou outro álcool) para a produção de biodiesel;
- Hidrólise para produção de ácidos graxos;
- Saponificação no processo de manufatura de sabões.

Figura 6: Alguns processos geradores de Glicerol. a) Transesterificação; b) Hidrólise de Triglicerídeos; c) Saponificação. Adaptado de TAN (2013)

O termo “glicerol” aplica-se somente ao composto orgânico puro (teor maior que 99%), o 1,2,3-propanotriol (nomenclatura IUPAC), também conhecido como um álcool trivalente. Já o termo “glicerina” é usado para nomear as misturas contendo diferentes quantidades ou grau de pureza com relação ao glicerol. A glicerina recebe então os seguintes nomes de acordo com o grau de pureza (CORDOBA, 2011):

- Glicerina Bruta ou Crua: é um coproduto direto da produção de biodiesel, contendo de 40 a 80% de glicerol, álcool, sais, mono, di ou triglicerídeos, ácidos graxos livres, ésteres, matéria orgânica não glicerizada (MONG) e água;
- Glicerina Loira ou semi-refinada: possui teor de glicerol de 80 a 90%, sendo obtida a partir da glicerina bruta, resultando na remoção parcial do álcool e de outras substâncias, obtendo uma glicerina sempre líquida;

- Glicerina refinada: conjunto de glicerinas com aplicação industrial, sendo que o grau de refinamento vai variar de acordo com a aplicação. O tratamento consiste em remover os sais, ácidos graxos e outras impurezas, resultando numa glicerina com teor de glicerol geralmente maior que 96%.

3.4.2. Panorama geral do Mercado de Glicerina

A produção de biodiesel no Brasil, que conta com o incentivo do governo, tem aumentado nos últimos anos, principalmente pelo lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), em 2004, pelo Governo Federal. Segundo dados da ANP (2014), a produção de biodiesel no ano de 2013 foi de aproximadamente 2,9 milhões de m³, gerando um residual total de glicerina de aproximadamente 290,3 mil m³, o que equivale a 10% do volume total de biodiesel produzido. Na Figura 7, pode-se observar a evolução da produção de biodiesel e da oferta de glicerina ao longo dos anos.

Figura 7: Produção de Biodiesel (B100) e Glicerina gerada na sua produção de 2005 a 2013.

Fonte: ANP (2014).

Do ano de 2010 a 2014, a porcentagem obrigatória de biodiesel no diesel manteve-se em 5% (B5), conforme estabelecido pela Lei nº 11.097 / 2005. Porém, com a Lei nº 13.033, de 24

de setembro de 2014, ficou estabelecido um aumento para 6% (B6) da proporção em volume de biodiesel no diesel a partir de 1º de julho de 2014, e para 7% (B7), a partir de 1º de novembro de 2014, fechando o ano com 37,5% de uso da capacidade instalada. Mesmo com a adoção do B7, espera-se que se atinja apenas 50% de uso da capacidade instalada atual de produção.

Diante desse cenário de aumento da produção de biodiesel, a glicerina se apresenta como um subproduto com elevada disponibilidade, com tendência de aumento, e sem um mercado direto para absorver essa oferta. Segundo dados da ABIQUIM (2013), as vendas internas de glicerina e o total exportado do produto para o ano de 2012 foram de 20,7 e 143701 ton., respectivamente. Dessa forma, gera-se um excedente de glicerina estimado de aproximadamente de 200 ton/ano, que não é absorvido. Esse excedente de glicerina vem saturando o mercado, sendo sua oferta maior que a procura, levando assim à queda do preço desse subproduto e à estocagem do mesmo sem um destino certo. Portanto, a geração de glicerina pode representar um entrave para a expansão da produção de biodiesel.

O glicerol possui várias aplicações industriais, dentre as quais se destacam a indústria de cosméticos, tintas, automóveis, alimentos, farmacêutica, tabaco, papel e celulose (WANG, 2001). Na Figura 8 estão apontados os principais setores industriais que utilizam glicerina em seus processos, bem como a parcela de uso em cada setor.

Figura 8: Principais setores industriais de utilização da glicerina. Adaptado de MOTA (2009)

Esses usos convencionais da glicerina refinada (bidestilada ou de grau USP) não conseguem absorver a atual disponibilidade de glicerina no mercado. Além disso, segundo PACHAURI e HE (2006), para a maioria destes processos se faz necessário que a glicerina tenha um alto grau de pureza (geralmente maior que 95%), o que não ocorre na glicerina bruta proveniente do biodiesel. Assim, essa glicerina precisa passar por um processo de tratamento,

tornando mais cara a sua utilização, sendo que para pequenos e médios produtores se torna totalmente inviável.

Diante desse cenário, faz-se necessário trabalhar em duas frentes de forma a viabilizar a expansão do uso do biodiesel: buscar alternativas para utilização e/ou degradação da glicerina bruta, ou mesmo a glicerina loira; e desenvolver tecnologias inovadoras e de menor custo para o uso da glicerina refinada.

A utilização da glicerina em processos biológicos anaeróbios e fermentativos tem se mostrado como alternativa atrativa para a obtenção de subprodutos de valor agregado e também como forma de destinação, ambientalmente adequada e economicamente viável, desse coproduto da produção do biodiesel.

3.4.3. Fermentação do glicerol

Segundo ABAD e TURON (2012), a fermentação com o glicerol como fonte de carbono pode ter uma taxa de crescimento da biomassa menor ou um rendimento mais baixo do que quando se usa outras fontes de carbono como a glicose e a xilose. Porém, isso é compensado pela possibilidade de produção de metabólitos de valor agregado, como o 1,3 propanediol, carotenoides, ácido cítrico, ácido succínico, polihidroxialcanoatos, ácidos graxos poli-insaturados, biohidrogênio, etanol, entre outros.

As rotas metabólicas fermentativas de glicerol já estão bem conhecidas, podendo ocorrer por via redutora ou por via oxidativa. Pela via redutora, o glicerol sofre um processo de desidratação, resultando na produção de 1,3-Propanediol (1,3 PDO). A rota oxidativa consiste em desidrogenar o glicerol, formando o composto dihidroxiacetona que, após sofrer fosforilação pode ser convertido a piruvato ou a succinato, que é posteriormente convertido 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, de organismo para organismo, podendo originar compostos mais simples, como 2,3 butanediol, lactato, butirato, etanol, formiato, acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (TEMUDO et al., 2008; PAPANIKOLAOU et al., 2008; SILVA et al., 2009; CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; DHARMADI et al., 2006; REHMAN et al., 2008; YAZDANI e GONZALEZ, 2007). O esquema das rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples está representado na Figura 9.

Figura 9: Rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples. Adaptado de TEMUDO et al. (2008); PAPANIKOLAOU et al. (2008); SILVA et al. (2009).

3.4.4. Glicerol como fonte de carbono para remoção de nutrientes

Estudos anteriores mostraram a aplicabilidade do glicerol como fonte de carbono para a desnitrificação (GRABINSKA-LONIEWSKA et al., 1985; AKUNNA et al., 1993; BODÍK et al., 2009). A Figura 10 indica um esquema do processo oxidativo microbiano utilizando glicerol como doador de elétrons. Uma fração de elétrons do glicerol é transferida para o acceptor (nitrato), liberando energia para que outra fração de elétrons do glicerol seja convertida em novas células.

Figura 10: Utilização do doador de elétrons para produção de energia e síntese celular.
Adaptado de RITTMANN e MCCARTY (2001); BENETTI e AQUINO (2010)

Segundo RITTMANN e MCCARTY (2001), o fluxograma representado na Figura 10 pode ser expresso matematicamente pelas Equações 17 e 18 a seguir:

$$R = f_e \cdot R_a + f_s \cdot R_s - R_d \quad (\text{eq. 17}) \quad f_e + f_s = 1 \quad (\text{eq. 18})$$

Onde: R: reação global balanceada;

f_e e f_s : frações do doador de elétrons usados para energia e síntese, respectivamente;

R_a : semirreação do acceptor de elétrons (NO₃) – Tabela 6;

R_s : semirreação de síntese de células bacterianas (C₅H₇O₂N) – Tabela 6;

R_d : semirreação do doador de elétrons (C₃H₈O₃) – Tabela 6.

Tabela 6: Semirreações de oxidação e redução usadas para o cálculo dos valores de f_e e f_s .
Fonte: RITTMANN e MCCARTY (2001).

Semirreação	ΔG^0 (KJ/eqe)
$R_a \Rightarrow \frac{1}{5} NO_3^- + \frac{6}{5} H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{10} N_2 + \frac{3}{5} H_2O$	-72,2
$-R_d \Rightarrow \frac{1}{14} C_3H_8O_3 + \frac{3}{14} H_2O \rightarrow \frac{3}{14} CO_2 + H^+ + e^-$	-38,8
$R_s \Rightarrow \frac{1}{28} NO_3^- + \frac{5}{28} CO_2 + \frac{29}{28} H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{28} C_5H_7O_2N + \frac{11}{28} H_2O$	-
$R_p^* \Rightarrow \frac{1}{5} CO_2 + \frac{1}{10} HCO_3^- + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{10} CH_3COCOO^- + \frac{2}{5} H_2O$	+35,09

* Semirreação do Piruvato (CH_3COCOO^-)

Para o cálculo dos valores de f_e e f_s , considera-se que a energia consumida no anabolismo é igual à energia aproveitada do catabolismo, o que resulta nas seguintes equações:

$$-f_s \cdot \Delta G_{ana} = f_e \cdot \Delta G_{cat} \rightarrow \frac{f_e}{f_s} = -\frac{\Delta G_s}{k \cdot \Delta G_r} \quad (\text{eq. 19})$$

$$f_s = \frac{1}{1 + \left(\frac{f_e}{f_s}\right)} \quad (\text{eq. 20})$$

Onde: $\Delta G_{ana} = \Delta G_s$: energia livre requerida para síntese de 1,0 equivalente de elétron (eqe) de células (kJ/eqe);

$\Delta G_{cat} = k \Delta G_r$: energia livre de Gibbs disponibilizada pelo catabolismo de 1,0 eqe do doador de elétrons;

ΔG_r : variação de energia livre da reação catabólica ($R_a + (-R_d) = -111,0$ KJ/eqe;

k^* : fração da energia efetivamente capturada pelo transportador (tipicamente = 0,60).

* A transferência de energia do doador de elétrons para síntese e manutenção biológica é realizada em duas etapas. Na primeira, o substrato transfere energia para um transportador - adenosina difosfato (ADP), com formação de um transportador “carregado” de energia - adenosina trifosfato (ATP). A energia armazenada no ATP é usada, então, em reações para síntese e manutenção celular.

A energia requerida para converter as fontes de carbono e nitrogênio em células (ΔG_s) consiste de três frações de energia (RITTMANN e MCCARTY, 2001), dadas pela Equação 21.

$$\Delta G_s = \frac{\Delta G_p}{k^m} + \Delta G_c + \frac{\Delta G_n}{k} \quad (\text{eq. 21})$$

Onde: ΔG_p : energia livre requerida (ou liberada) na conversão da fonte de carbono em piruvato
 - composto intermediário que ocupa uma posição central de várias rotas metabólicas.
 Somando-se as reações R_p (Tabela 6) e $-R_d$, tem-se que $\Delta G_p = -3,79$ KJ/eqe. Como a energia é liberada nessa reação, ΔG_p será menor que zero e $m = -1$;
 ΔG_c : energia requerida para converter 1,0 eqe de piruvato em células bacterianas = 31,41 kJ/eqe;
 ΔG_n : energia requerida para reduzir uma fonte oxidada de nitrogênio em amônia, antes da síntese celular. Para NO_3^- , este valor corresponde a 17,46 kJ/eqe.

Substituindo esses valores nas Equações 21, 19, 20, e 18, respectivamente, tem-se que:

$$\Delta G_s = \frac{-3,79}{0,6^{-1}} + 31,41 + \frac{17,46}{0,6} = 54,1933 \text{ KJ/eqe}$$

$$\frac{f_s}{f_e} = -\frac{54,1933}{0,6 \cdot -111,08} = 0,813 \Rightarrow f_s = \frac{1}{1 + 0,813} = \boxed{0,5515} \therefore f_e = \boxed{0,4485}$$

Pode-se inferir então que para a desnitrificação completa usando glicerol como doador de elétrons 55,15% (f_s) e 44,85% (f_e) deste são utilizados para síntese de novas células e produção de energia, respectivamente, considerando neste caso que toda energia liberada foi alocada para síntese.

Substituindo esses valores na Equação 17 e usando as semirreações da Tabela 6, é possível chegar na seguinte reação global de desnitrificação usando glicerol como doador de elétrons:

Essa equação aponta que, para cada grama de nitrato (N-NO_3^-) reduzido, consome-se 4,29g de glicerol; são produzidas 1,45g de novas células e 3,57g de alcalinidade (como CaCO_3). Além disso, pode-se estimar o coeficiente de produção celular (Y) em 0,278 gSSV/gDQO, uma vez que a DQO teórica do glicerol equivale a 1,217 gDQO/gGOH. É possível também prever, de forma mais próxima de uma situação real, as relações DQO/N e C/N requeridas para a

desnitrificação com GOH, sendo que os valores obtidos foram de 5,22 gDQO/gN-NO₃⁻ e 1,68 gC/gN-NO₃⁻.

Estudos mais recentes têm mostrado que o glicerol também se mostra aplicável para ser usado como composto orgânico biodegradável para promover a remoção biológica de fósforo (YUAN et al. 2010; GUERRERO et al., 2012). Ainda não há estudos usando glicerol como fonte de carbono para propiciar a remoção conjunta de nitrogênio e fósforo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Descrição do Regime Operacional do Sistema

Previamente à operação do reator foi feita uma adaptação da biomassa às condições anóxicas para o desenvolvimento das bactérias heterotróficas desnitrificantes. O regime operacional do reator foi dividido em duas fases principais, sendo a primeira para a remoção de nitrogênio e a segunda para a remoção conjunta de nitrogênio e fósforo, utilizando glicerol como fonte exógena de carbono em ambas as fases.

4.1.1. Pré-operação – Adaptação da Biomassa

O lodo de inóculo que foi utilizado para a partida do reator é o lodo biológico proveniente da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen, localizada no município de São Carlos, estado de São Paulo. Este inóculo é um lodo de um tanque de nitrificação e, portanto, apresenta biomassa nitrificante bem desenvolvida. Na Tabela 7 encontram-se as concentrações de sólidos dessa biomassa.

Tabela 7: Caracterização de Sólidos no Lodo de Inóculo

Parâmetro	Concentração (mg.L ⁻¹)
ST	5080
STF	646
STV	4434
SST	4770
SSF	465
SSV	4305
SDT	310
SDF	181
SDV	129

Para a partida do sistema, foi realizada a adaptação do lodo às condições anóxicas utilizando, como fonte de carbono, álcool etílico absoluto PA (C₂H₅OH) de forma a acelerar o desenvolvimento das bactérias heterotróficas desnitrificantes. Inicialmente, isso foi feito em frasco Duran de 5 L (Figura 11), sendo 2 L de biomassa e 2 litros de substrato, com alimentação em batelada diária. Para manter a mistura completa no frasco, foi utilizado um agitador magnético IKA C-MAG HS 7. A temperatura foi mantida em 25°C.

Figura 11: Adaptação da biomassa em frasco de Duran usando Etanol como fonte de carbono

Após ser verificado o consumo total da DQO, fornecida na forma de etanol, foi transferido para o reator anóxico um volume de 1,7 L de biomassa, correspondendo a aproximadamente 50% do volume útil do reator. Então, a biomassa era alimentada continuamente com TDH de 4 h, ainda usando etanol como doador de elétrons. A carga orgânica média aplicada ao lodo neste período foi de aproximadamente $0,7 \text{ gDQO.gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

A adaptação no frasco Duran ocorreu durante 1 semana e, no reator, durou 22 dias. Ao longo dos dias foram acompanhados os resultados referentes às análises de NO_3^- , NO_2^- e DQO, bem como a eficiência de remoção desses parâmetros.

4.1.2. Fase 1 – Desnitrificação

A primeira fase de operação do reator consistiu, inicialmente, em adaptar a biomassa suspensa à fonte de carbono testada (glicerol – representado aqui por GOH), bem como promover as condições anóxicas para que houvesse a desnitrificação completa, usando essa fonte de carbono. Dessa forma, após os 22 dias de adaptação com etanol, este foi substituído pelo glicerol no substrato de alimentação do reator.

O TDH adotado nesta fase foi de 4 horas, resultando na vazão de alimentação de $0,86 \text{ L.h}^{-1}$ e velocidade ascensional de $16,7 \text{ cm.h}^{-1}$. Não foi utilizado sistema de recirculação interna no reator. O tempo de operação total desta fase foi de 209 dias, sendo esse período dividido em 3 subfases, conforme detalhado nos itens 4.2 e 5.2.1.

4.1.3. Fase 2 – Desnitrificação e remoção biológica de fósforo

A segunda fase consistiu em submeter o reator à aeração intermitente, criando fases de aeração e não aeração a fim de que ocorresse no mesmo reator a desnitrificação e a remoção biológica de fósforo do sistema, sendo o glicerol usado como doador de elétrons durante a fase não aerada.

O objetivo da aeração intermitente nesse regime de operação é que se criem três fases distintas no reator, a saber: a fase anóxica onde ocorre eliminação de N-NO_3^- com o uso de glicerol como fonte de carbono; a fase anaeróbia com a consequente liberação de O-PO_4 para o meio, sendo o glicerol usado como substrato orgânico biodegradável para a geração de AGV; e a fase aeróbia para a acumulação de O-PO_4 pelos OAP's, usando o oxigênio como acceptor de elétrons.

Para os períodos aerados e não aerados foram adotados os seguintes valores: 4 horas de não aeração, que foi o mesmo adotado para a primeira fase operacional e 2 horas de aeração, resultando em 4 ciclos operacionais por dia. STENSEL (1991) aponta que o período de detenção de 1 a 2 horas na fase aeróbia é o suficiente para ocorrer a incorporação de fósforo na biomassa, considerando que na fase anaeróbia haja liberação de fósforo na faixa típica de 20 a 40 mgP.L^{-1} .

O TDH adotado para esta fase foi de 10 h, resultando em vazão de alimentação média de 0,35 L.h^{-1} . Foi utilizado sistema de recirculação interna com taxa de 300%, valor adotado para mistura completa baseado em ensaio hidrodinâmico realizado por MOURA (2014), propiciando a velocidade ascensional de 27,2 cm.h^{-1} . Durante a fase aerada, não ocorria alimentação no reator para que não houvesse oxidação do glicerol, evitando-se seu consumo desnecessário no sistema e também o possível arraste excessivo de biomassa. O tempo de operação dessa fase foi de 65 dias, desconsiderando um período prévio de adaptação de 18 dias, referente ao aumento da relação DQO/N no reator, e, consequentemente da concentração de GOH.

4.2. Descrição do Substrato Sintético

Para a alimentação do reator, foi utilizado um substrato sintético com composição semelhante a de efluente típico de um sistema de tratamento secundário aeróbio, a fim de propiciar a remoção de nitrogênio (na forma de N-NO_3^-) e fósforo (na forma de P-PO_4^{3-}).

A fonte principal de doador de elétrons foi o glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ - Glicerol PA com 99,5% de pureza). Partindo-se da relação estequiométrica dada pela Equação 14, em que $x = 3$, $y = 8$

e $z = 3$, tem-se que a desnitrificação completa consumiria 2,35 gGOH/gN-NO₃⁻, que resultaria numa relação DQO/N-NO₃⁻ de 2,86 e relação C/N de 0,92. Entretanto, para a partida do reator durante a primeira fase operacional, foi utilizada a relação C/N de 1,0 (relação DQO/N-NO₃⁻ de 3,11), baseado nos resultados obtidos por GRABINSKA-LONIEWSKA et al. (1985) que também utilizaram glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e obtiveram 98% de remoção de N-NO₃⁻.

Como a equação 14 não leva em consideração o uso do doador de elétrons para o anabolismo, outras relações DQO/N-NO₃⁻ foram testadas. A Equação 22, proposta no item 3.4.4., aponta uma relação DQO/N-NO₃⁻ igual a 5,2 para uma desnitrificação completa. Baseando-se nessa equação, foram testadas as relações DQO/N-NO₃⁻ de 4 e 5, aproximadamente, a fim de se estimar a melhor condição operacional para a desnitrificação com GOH. Dessa forma, a primeira fase foi dividida em 3 subfases, a saber: Fase 1a - DQO/N-NO₃⁻ $\cong$ 3,1; Fase 1b - DQO/N-NO₃⁻ $\cong$ 4; e Fase 1c - DQO/N-NO₃⁻ $\cong$ 5.

Para a segunda fase operacional, partiu-se da relação DQO/P-PO₄⁻³ de 30, aproximadamente, baseada nos trabalhos citados na Tabela 5, considerando que uma parte da DQO seria utilizada para desnitrificação heterotrófica, resultando na remoção de N-NO₃⁻ previamente à fase anaeróbia.

A Tabela 8 indica as concentrações esperadas da fonte de carbono a serem utilizadas em cada fase operacional e as relações teóricas entre a concentração da fonte de carbono e a concentração de nutrientes (N e P).

Tabela 8: Valores esperados para as concentrações da fonte de carbono na água residuária sintética em cada fase operacional

Parâmetro	Adaptação	1ª Fase			2ª Fase
		Fase 1a	Fase 1b	Fase 1c	
DQO/N	10,0	3,1	4,0	5,0	10,0
DQO/P	30,0	9,3	12,0	15,0	30,0
C/N	2,5	1,0	1,3	1,6	3,2
C/P	7,5	3,7	4,7	5,9	11,7
DQO-GOH - mg.L ⁻¹	-	93,3	120,0	150,0	300,0
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃) - mg.L ⁻¹ *	-	76,7	98,6	123,3	246,5
DQO-EtOH - mg.L ⁻¹	300,0	-	-	-	-
Etanol (C ₂ H ₅ OH) - mg.L ⁻¹ **	143,7	-	-	-	-

* Baseado na relação teórica de 1,217 gDQO/gGOH

** Baseado na relação teórica de 2,087 gDQO/gEtOH

As Tabelas 9 e 10 apresentam as fontes de macro a micronutrientes, respectivamente, necessários ao metabolismo microbiano. A concentração da fonte de N-NO_3^- está baseada no valor de 30 mg.L^{-1} , típica de efluentes domésticos nitrificados; e a fonte de P-PO_4^{3-} está baseada no valor de 10 mg.L^{-1} , que está dentro da faixa de concentrações típicas para esgotos domésticos brutos. Considerou-se aqui que o fósforo não é removido nos sistemas convencionais de lodos ativados ou a remoção é desprezível. As concentrações dos demais macronutrientes estão conforme TORRES (1992) – Tabela 9 – e os micronutrientes seguem o meio proposto por TOUZEL e ALBAGNAC (1983) – Tabela 10.

Tabela 9: Concentrações das fontes de macronutrientes na água residuária sintética.
Adaptado de Torres (1992).

Macronutrientes	Concentração (mg.L^{-1})
Nitrato de Sódio (NaNO_3)	182,04
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	12,55
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	43,94
Cloreto de sódio (NaCl)	125,00
Cloreto de Cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4,50
Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3)	50,00

Tabela 10: Concentrações das fontes de micronutrientes na água residuária sintética.
Adaptado de TOUZEL e ALBAGNAC (1983).

Componente	Concentração (mg.L^{-1})
Ácido Nitrilotriacético (NTA)	12,80
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,35
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,10
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02
ZnCl_2 anidro	0,10
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03
H_3BO_3	0,01
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,12

Inicialmente o substrato era preparado em um recipiente de 80 L que ficava armazenado sob refrigeração a 4°C para evitar sua fermentação. Nesse recipiente eram adicionadas as soluções de glicerol, macro e micronutrientes. Entretanto, ao longo da primeira fase

operacional, notou-se a ocorrência de desnitrificação parcial prévia ao reator. Isso gerava certa quantidade de nitrito na própria solução de alimentação, que era indesejável para a operação do sistema. Dessa forma, a alimentação foi separada em dois fluxos distintos, a saber: um contendo somente a solução de glicerol; e outro contendo a solução de macro e micronutrientes. Essa separação entre a alimentação de glicerol e nutrientes foi benéfica para a operação do sistema e trouxe estabilidade na composição da solução de alimentação.

4.3. Aparato Experimental

O sistema de tratamento foi montado nas dependências do Laboratório de Processos Biológicos (LPB), localizado no Campus 2 da Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos. O reator biológico apresenta as características apontadas na Tabela 11.

Tabela 11: Características físicas do reator biológico

Material	Acrílico
Formato	Cilíndrico
Diâmetro Interno	8,1 cm
Altura Total	74 cm
Altura Útil	67 cm
Volume Total	3,81 L
Volume Útil	3,45 L

O fluxo de alimentação do reator é ascendente, realizado através de bombas dosadoras e ocorre de forma contínua. A seguir, são descritos os principais detalhes do sistema em cada fase operacional.

4.3.1. Fase 1

A Figura 12 apresenta, esquematicamente, o sistema de tratamento para a primeira fase de operação e a Figura 13 mostra a instalação experimental para essa fase.

Figura 12: Esquema do sistema de tratamento para a primeira fase de operação

A entrada do meio sintético contendo glicerol (A1) ocorria pelo ponto 1, através do uso de uma bomba dosadora ProMinent GAMMA/4 (P1) com vazão de $0,5 \text{ L.h}^{-1}$, enquanto que o meio contendo os macro e micronutrientes (A2) era injetado no ponto 2, através de uma outra bomba dosadora peristáltica MILAN BP-600.04 (P2) com vazão de $0,36 \text{ L.h}^{-1}$. Ambos os fluxos de alimentação eram misturados numa câmara de mistura (M), situada na base do reator. A saída do efluente (E) ocorria pelo ponto 9.

O corte C-C' representa uma tela de aço inox perfurada que foi colocada no fundo do reator e entre o cabeçote e o corpo do reator. No fundo do reator a tela servia para acomodação da biomassa (B) e para que houvesse uniformidade na distribuição das linhas de fluxo de alimentação. No topo do reator a tela servia como um suporte para o separador (S) e também para tentar evitar um possível arraste de biomassa do sistema.

O separador consiste de um funil de plástico cortado conforme as dimensões do reator e de forma a minimizar a passagem de biomassa para o efluente. Além disso, também propiciava o escape de gases do sistema.

A temperatura foi monitorada através de um termômetro INCOTERM com indicação de máximo e mínimo e durante o período de temperaturas mais baixas (de junho a setembro), foi

utilizado um sistema de aquecimento termostatzado (Banho-maria MARCONI MA 127) a fim de manter a temperatura do reator em torno de 25°C, sendo este envolto em uma serpentina, como pode ser visualizado na Figura 13. No período de março a maio a temperatura mínima foi de $23,0 \pm 1,7$ °C e a máxima foi $24,6 \pm 1,3$ °C.

Figura 13: Instalação Experimental para a primeira fase de operação

4.3.2. Fase 2

Na segunda fase operacional, introduziu-se a aeração no reator. Essa foi realizada através de um compressor de ar de aquário Big Air Super Pump A420, provido de difusor de micro bolhas, conectado na extremidade da mangueira de saída do ar. Pretendia-se manter a concentração de OD na faixa de $2,5 \pm 0,5$ mg.L⁻¹. Tal dispositivo foi ligado a um temporizador automático Elcon TM 22, de forma a permitir que houvesse aeração intermitente no sistema, com 2 horas de aeração e 4 horas de não aeração.

A temperatura foi monitorada novamente com um termômetro INCOTERM com indicação de máximo e mínimo para os meses de outubro de 2014 a janeiro de 2015, sendo a temperatura mínima no período de $22,9 \pm 0,8$ °C e a máxima de $25,4 \pm 0,8$ °C.

A Figura 14 ilustra, esquematicamente, o sistema de tratamento para a segunda fase operacional, indicando as alterações com relação à Fase 1.

Figura 14: Esquema do sistema de tratamento para a segunda fase de operação

Para essa fase, a bomba P1 passou a ser uma bomba dosadora ProMinent Concept Plus, com vazão de $0,21 \text{ L.h}^{-1}$, e a bomba P2 passou a ser uma bomba peristáltica GILSON MinPuls 3, com vazão de $0,14 \text{ L.h}^{-1}$. Iniciou-se a operação do sistema de recirculação interna (R), sendo esta realizada através de uma bomba dosadora ProMinent GAMMA/4 (P3), com vazão de $1,05 \text{ L.h}^{-1}$. A entrada da linha de recirculação está representada pelo ponto 10 na base do reator. Para que a alimentação fosse cortada durante a fase aerada foi utilizado outro temporizador. Na Figura 15, é mostrada uma foto da instalação experimental montada no LPB.

Figura 15: Instalação Experimental para a segunda fase de operação

4.4. Monitoramento do Sistema

O monitoramento do sistema foi realizado através de análises físico-químicas, conforme frequência estabelecida na Tabela 12.

Tabela 12: Análises físico-químicas de monitoramento do sistema de tratamento

Parâmetro (Unidade)	Método	Frequência (por semana)		Referência
		1ª Fase	2ª Fase	
pH	Potenciométrico	2 a 3 vezes	2 a 3 vezes	APHA (2005) 4500-H ⁺ B
Alcalinidade (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	Titulométrico	2 a 3 vezes	2 a 3 vezes	Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley et al. (1986)
Ácidos Voláteis (mg.L ⁻¹)	Cromatografia - HPLC	-	1 vez	Moraes et al. (2000)
DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	Espectrofotométrico	2 a 3 vezes	2 a 3 vezes	APHA (2005) 5220 D
Glicerol (mg.L ⁻¹)	Enzimático*	2 a 3 vezes	2 a 3 vezes	GREENHILL (2003)
N-NO ₂ ⁻ (mgN.L ⁻¹)	Cromatografia de íons	2 a 3 vezes	2 a 3 vezes	APHA (2005) 4500-NO ₂ ⁻ C
N-NO ₃ ⁻ (mgN.L ⁻¹)	Cromatografia de íons	2 a 3 vezes	2 a 3 vezes	APHA (2005) 4500-NO ₃ ⁻ C
N-NH ₄ ⁺ (mgN.L ⁻¹)	Cromatografia de íons	**	-	APHA (2005) 4110 ⁻ B
P-PO ₄ ⁻³ (mgP.L ⁻¹)	Ácido ascórbico	-	2 a 3 vezes	APHA (2005) 4500-P E
SST (mg.L ⁻¹)	Gravimétrico	***	***	APHA (2005) 2540 D
SSV (mg.L ⁻¹)	Gravimétrico	***	***	APHA (2005) 2540 E
SSF (mg.L ⁻¹)	Gravimétrico	***	***	APHA (2005) 2540 E

* Método descrito a seguir

** Análise realizada eventualmente

*** Análise realizada com frequência quinzenal

As amostras efluentes eram previamente filtradas em membrana de fibra de vidro com porosidade de 1,2 µm para as análises de DQO, pH e alcalinidade. Para as análises de íons, glicerol e ácidos voláteis, as amostras efluentes eram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm. As análises de sólidos eram realizadas com amostras brutas do efluente, obtidas a partir do efluente acumulado durante uma semana, no mínimo. As demais análises eram realizadas com amostras coletadas pontualmente na saída do reator.

A análise de Nitrogênio Amoniacal foi realizada ao longo dos primeiros três meses da primeira fase operacional, para avaliar a possível ocorrência de redução dissimilativa de N-NO₃⁻ a N-NH₄⁺. A cada semana, uma amostra efluente era analisada no cromatógrafo de íons. Como não foi detectado nenhum teor de Nitrogênio Amoniacal no efluente do reator nos três primeiros meses de operação, foi cessado o monitoramento desse parâmetro.

Para a segunda fase operacional, que possui aeração intermitente, fez-se um perfil de oxigênio dissolvido para as fases aerada e não aerada, utilizando um oxímetro Thermo Electron Orion 810A+. Para isso, fez-se uma drenagem da biomassa do reator para um frasco Duran de

5 L, totalizando um volume de 2 L de biomassa. O frasco foi preenchido com substrato (conforme item 4.2 referente à 2ª fase).

Para o cálculo do desempenho do sistema na remoção dos parâmetros nitrogênio, fósforo, DQO e GOH utilizou-se a Equação 23:

$$E(\%) = \left(\frac{S_0 - S}{S_0} \right) \cdot 100 \quad (\text{eq. 23})$$

Onde: E: Eficiência de remoção do parâmetro (DQO, GOH, N-NO_x, P-PO₄⁻³) em %

S: Concentração do parâmetro no efluente em mg.L⁻¹

S₀: Concentração do parâmetro no afluente em mg.L⁻¹

4.4.1. Análise Enzimática de GOH

Segundo VALDEZ et al. (2011), dentre todos os procedimentos disponíveis para análise de Glicerol Livre e Glicerol Total, os métodos cromatográficos e enzimáticos oferecem os melhores desempenhos analíticos. A vantagem do método enzimático é que ele é rápido, preciso, de baixo custo, pouco complicado no manuseio e não tóxico, por não utilizar piridina, solvente usado na etapa de derivatização na determinação de glicerol por Cromatografia Gasosa.

O método baseia-se num procedimento foto-enzimático, semelhante ao usado nas análises de triglicerídeos no sangue. Como as amostras de entrada e saída no reator não apresentam triglicerídeos na sua composição, o método se mostra aplicável. As reações enzimáticas envolvidas neste método podem ser visualizadas na Figura 16.

Figura 16: Reações enzimáticas envolvidas na conversão do glicerol em dihidroxiacetona fosfato pela ação sequencial das enzimas glicerol-quinase e glicerol-3-fosfato oxidase

O glicerol, na presença da adenosina trifosfato (ATP) e da enzima glicerol-quinase (GK), produz adenosina difosfato (ADP) e glicerol-3-fosfato (G-3-P), que, na presença de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) e oxigênio, produz di-hidroxiacetona-fosfato (DAP) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, na presença de uma peroxidase, um aceptor de oxigênio (4-Clorofenol) e 4-aminoantipirina (4-AAP), produz um composto colorido indicador da reação, a quinonimina, o qual pode ser determinado por espectrofotometria.

Utilizou-se uma solução enzimática comercial Triglycerides FS Dyasys para determinação de glicerol nas amostras. O reagente enzimático apresentava a composição indicada na Tabela 13.

Tabela 13: Composição da solução Enzimática usada na análise de glicerol

Componente	Concentração	Unidade
Tampão pH 7,2	50	mmol.L^{-1}
4 - Clorofenol	4	mmol.L^{-1}
ATP	2	mmol.L^{-1}
Mg^{2+}	15	mmol.L^{-1}
GK	$\geq 0,4$	kU.L^{-1}
Peroxidase	≥ 2	kU.L^{-1}
LPL	≥ 2	kU.L^{-1}
4 - Aminoantipirina	0,5	mmol.L^{-1}
GPO	$\geq 0,5$	kU.L^{-1}

Utilizando Glicerol PA, preparou-se uma solução padrão de 1 g.L^{-1} , e procedeu-se a diluições, a fim de obter uma curva de calibração para glicerol. Foram preparadas seis diluições nas seguintes concentrações de glicerol: 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg.L^{-1} . Essas amostras, juntamente com a amostra padrão, foram diluídas 100 vezes com água deionizada e, então, retirou-se uma alíquota de 3,5 mL dessas amostras e transferiu-se para as cubetas. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

Em cada cubeta, foram adicionados 1,4 mL de solução enzimática. Posteriormente, as amostras foram deixadas em banho-maria a 37°C , durante um tempo de reação de 5 minutos e, então, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 500 nm, zerando-se o aparelho com água deionizada.

Na Figura 17, é possível visualizar as amostras usadas para a construção da curva de calibração, depois de decorrido o tempo de reação. Os valores indicados correspondem às concentrações de GOH em cada tubo.

Figura 17: Amostras para construção da curva de calibração de GOH após tempo de reação

Com os resultados de absorvância a 500 nm de cada amostra, foi possível traçar a curva de calibração (Absorvância x [Glicerol]), que se encontra na Figura 18.

Figura 18: Curva de Calibração para análise de GOH – 0 a 300 mg.L⁻¹

4.5. Análises Microbiológicas

Além das análises físico-químicas de monitoramento, também foram realizados alguns ensaios microbiológicos qualitativos nas duas fases operacionais com o objetivo de permitir a caracterização morfológica e o acompanhamento das possíveis variações na microbiologia do reator frente às alterações operacionais impostas. Para esses ensaios foram retiradas amostras de biomassa suspensa diretamente do reator pelos pontos de amostragem lateral.

4.5.1. 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.

4.5.2. PCR / DGGE

Para o ensaio de biologia molecular das amostras, inicialmente a biomassa passou por um processo de centrifugação (6000 rpm, 4°C, 10 minutos) e extração de DNA de acordo com o protocolo de Griffiths et al. (2000), utilizando tampão PBS (NaCl 137,0 mM, KCl 2,6 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM em pH 7,4), *glass beads*, fenol tamponado com Tris e clorofórmio.

Os fragmentos do gene do RNAr 16 S, extraídos das amostras, foram amplificados por PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando-se primers 968FGC – 1401R sintetizados pela Invitrogen® para o domínio Bactéria. Para a reação de amplificação, foram adicionados 2,0 µL de DNA padrão e o procedimento foi realizado de acordo com o manual do fabricante (Taq DNA polimerase – Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Para as análises foi utilizado termociclador Eppendorf AG - 22331 Hamburg.

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada segundo protocolo descrito por Muyzer et al. (1993), usando DcodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os produtos do PCR foram aplicados diretamente em um gel de poliacrilamida (37,5:1 acrilamida:bisacrilamida) com gradiente linear de desnaturação (ureia e formamida) variando de 45 a 65%. A eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 75V e à temperatura de 60°C por 16 h. Os géis foram observados

sob iluminação de luz UV e fotografados usando Eagle Eye II Imager (Stratagene, La Jolla, CA, USA). A partir do perfil das bandas do DGGE utilizou-se software Bionumerics versão 3.5 no cálculo do coeficiente de similaridade e o agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) na construção do dendograma.

4.6. Análise Estatística dos dados

Para a análise dos resultados obtidos durante a operação do reator, utilizou-se estatística descritiva com dados de média, máximo, mínimo e desvio padrão, sendo os resultados em cada fase apresentados na forma $\bar{x} \pm s$ (Média $\pm$ Desvio Padrão). Além disso, para avaliar a dispersão dos dados e a presença de *outliers* em cada fase operacional foi construído gráfico de *boxplot* utilizando o software Microsoft® Office Excel 2010, habilitado com o programa estatístico Action v. 2.8 (ESTATCAMP, 2014).

Para avaliar comparativamente o desempenho na remoção de matéria orgânica e matéria nitrogenada, em cada condição operacional referente à primeira fase, foi utilizado como teste de comparação múltipla um teste de Tukey da diferença honestamente significativa. Foi adotado nível de significância (α) de 5%. Para esse teste também foi usado o software estatístico Action v. 2.8 (ESTATCAMP, 2014).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fase de adaptação

A fase de adaptação da biomassa em condições anóxicas, utilizando etanol como fonte de carbono, durou aproximadamente um mês, sendo uma semana em frasco Duran em regime de batelada e 22 dias no reator anóxico em regime contínuo. Na Figura 19 encontram-se os resultados referentes à DQO e NOx durante o período de adaptação da biomassa no reator contínuo, em TDH de 4 horas e vazão de $0,86 \text{ L.h}^{-1}$.

Figura 19: Variação das concentrações de DQO (a) e NOx (b) e eficiência de remoção durante a fase de adaptação com EtOH

A relação C/N aplicada para essa fase foi de $2,6 \pm 0,5$, sendo bem superior à relação C/N estequiométrica (igual a 0,71) calculada pela Equação 14 para $x = 2$, $y = 6$ e $z = 1$. Isso foi feito a fim de que não houvesse limitação de doadores de elétrons para o desenvolvimento da biomassa desnitrificante.

Nos primeiros dias de operação do reator, observou-se perda de sólidos finos no efluente, que passavam pelo separador, resultando em baixa eficiência de remoção de DQO, como pode ser visualizado no gráfico da Figura 19. Após o 6º dia, o efluente já mostrou melhora na sua qualidade, levando ao aumento na remoção de DQO, atingindo 89% no 14º dia, sendo então iniciado o monitoramento dos compostos de nitrogênio no reator. Constatou-se desnitrificação completa (100% de remoção de NO_x) estável, durante 9 dias, para as condições supracitadas. Então, com a biomassa desnitrificante bem desenvolvida, fez-se a substituição do etanol pelo glicerol no meio sintético de alimentação.

O resultado referente aos compostos de nitrogênio foi reportado como NO_x, que equivale à soma das parcelas de NO₃⁻ e NO₂⁻. As concentrações de nitrito no afluente não atingiram níveis tóxicos, variando de 0,8 a 1,6 ($1,0 \pm 0,4$ mg.L⁻¹) e, no efluente, não foi observado, indicando a não ocorrência de acúmulo de nitrito no reator.

5.2. Fase 1

5.2.1. Remoção de Matéria Carbonácea e Eficiência de Desnitrificação

Após a fase de adaptação da biomassa com etanol, o reator passou a receber glicerol como fonte de carbono. Na Fase 1a, pretendia-se manter a relação DQO/N-NO₃⁻ de 3,1. Porém, observou-se que o teor de nitrato afluente não estava sendo mantido em 30 mgN.L⁻¹ e verificou-se a presença de nitrito na solução de alimentação, o que não era esperado ocorrer. Além disso, o teor de nitrito encontrado ($9,7 \pm 8,8$ mg.L⁻¹) estava sendo prejudicial ao desempenho das bactérias desnitrificantes. Dessa forma, não estava sendo possível haver o controle da relação DQO/N-NO₃⁻ e a desnitrificação não estava sendo efetiva.

Constatou-se, então, a ocorrência de uma desnitrificação parcial na própria solução de alimentação. Mesmo aumentando a frequência de preparo do meio sintético, ainda foi observado a presença de nitrito afluente. Diante disso, após o 60º dia de operação, foi feita uma adaptação na condição de alimentação, sendo essa separada em duas linhas distintas, uma contendo somente a solução de glicerol e outra contendo a solução de nutrientes. Isso impediu a ocorrência de desnitrificação parcial previamente ao reator, tornando possível haver o melhor

controle operacional, resultando em maior estabilidade na concentração da solução de alimentação, conforme pode ser observado na Figura 20.

Figura 20: Teor de Nitrato e Nitrito afluente ao longo da primeira fase operacional

A Fase 1a teve duração de 143 dias, que foi considerado um período longo em comparação com as Fases 1b e 1c, que tiveram períodos de 37 e 29 dias, respectivamente. Isso ocorreu, pois, durante a Fase 1a, houve alguns problemas operacionais, como já citado anteriormente e também pelo fato do método de análise de glicerol ter sido implementado somente após 103 dias de operação do reator. Portanto, a Fase 1a, com monitoramento do consumo de glicerol no reator, durou efetivamente 40 dias.

Na Figura 21, estão apresentados os resultados referentes a DQO, NOx ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) e GOH, bem como a variação da relação DQO/N e da relação C/N de cada fase de operação.

Após a separação das soluções de glicerol e nutrientes, durante a Fase 1a, observa-se o aumento de eficiência de remoção de NOx. Ainda assim, constatou-se certa instabilidade no desempenho da desnitrificação. Dessa forma, optou-se por aumentar a relação DQO/N- NO_3^- para 4 e 5 a fim de verificar uma possível melhora na eficiência. Observou-se ligeira melhora na eficiência de desnitrificação para as Fases 1b e 1c. Entretanto, também não foi possível alcançar estabilidade no desempenho do reator para remoção de nitrato.

Figura 21: Gráficos de monitoramento de DQO (a), GOH (b), NOx (c) e relações DQO/N e C/N (d) ao longo da primeira fase operacional.

Na Figura 22, apresenta-se o gráfico de *boxplot* para os dados de eficiência de remoção de DQO (Figura 22a) e NOx (Figura 22b), durante a primeira fase de operação, para as três condições testadas.

Figura 22: Gráficos de Boxplot de distribuição dos resultados de eficiência de remoção de DQO (a) e NOx (b) para as três condições testadas na primeira fase de operação

Com relação à DQO, observa-se estabilidade de remoção durante as três fases operacionais, indicando a robustez do reator na remoção de matéria carbonácea. Pelas análises de glicerol de entrada e saída (Figura 21b), constata-se, também, que a biomassa se adaptou a essa fonte de carbono, havendo o consumo quase total de glicerol durante todo o período de monitoramento (eficiência de remoção de GOH de 99 ± 2 %). Além disso, os resultados da

análise de glicerol apresentaram boa correlação com a análise de DQO, sendo que a relação DQO/GOH foi de $1,10 \pm 0,05$, estando próxima ao valor teórico de $1,217 \text{ gDQO/gGOH}$.

Com relação à eficiência de remoção de NO_x , pode-se notar que, para a relação DQO/N- NO_3^- de 5, tanto a eficiência média, quanto a estabilidade operacional foram maiores, quando comparadas às Fases 1a e 1b. Pelo teste de Tukey no nível de significância de 5%, as três condições testadas resultaram em eficiências diferentes para remoção de NO_x . Já para a remoção de DQO, pelo teste de Tukey, as Fases 1b e 1c foram estatisticamente iguais no nível de significância de 5%. Portanto, pode-se inferir que a relação DQO/N- NO_3^- de 5 propiciou melhor eficiência de desnitrificação, estando de acordo com a reação empírica de desnitrificação usando glicerol proposta pela Equação 22. Há indícios de que, para baixas relações DQO/N (ou C/N) utilizando essa fonte de carbono, a desnitrificação é ineficaz devido à falta de doadores de elétrons. Por outro lado, o processo se mostra mais estável para relações DQO/N (ou C/N) maiores.

Na Tabela 14, encontra-se um resumo dos resultados médios obtidos para a primeira fase operacional no que tange à remoção de matéria carbonácea e nitrogenada, bem como as relações DQO/N e C/N médias resultantes.

Tabela 14: Resultados médios obtidos na primeira fase com relação à DQO, GOH, NO_x e relações DQO/N e C/N

Parâmetro (Unidade)	Fase 1a		Fase 1b		Fase 1c	
	Afluyente	Efluente	Afluyente	Efluente	Afluyente	Efluente
N- NO_3^- (mg.L ⁻¹)	$24,9 \pm 8,1$	$2,9 \pm 2,3$	$29,3 \pm 0,6$	$2,0 \pm 2,6$	$29,0 \pm 0,3$	$1,6 \pm 1,5$
N- NO_2^- (mg.L ⁻¹)	$4,3 \pm 7,4$	$4,6 \pm 5,2$	$0,2 \pm 0,5$	$1,7 \pm 1,9$	$0,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,8$
N- NO_x (mg.L ⁻¹)	$29,2 \pm 3,1$	$7,5 \pm 5,5$	$29,5 \pm 0,9$	$3,7 \pm 4,0$	$29,0 \pm 0,3$	$2,6 \pm 2,2$
DQO (mg.L ⁻¹)	$98,9 \pm 11,3$	$18,6 \pm 6,2$	$120,6 \pm 2,7$	$15,6 \pm 8,0$	$148,9 \pm 3,8$	$15,7 \pm 6,2$
GOH (mg.L ⁻¹)	$88,2 \pm 6,2$	$2,7 \pm 2,4$	$108,6 \pm 5,8$	$0,9 \pm 1,3$	$135,9 \pm 7,2$	$0,0 \pm 0,1$
DQO/N- NO_x	$3,4 \pm 0,6$		$4,1 \pm 0,1$		$5,1 \pm 0,2$	
C/N- NO_x	$1,2 \pm 0,1$		$1,5 \pm 0,1$		$1,8 \pm 0,2$	
Eficiência NO_x (%)	73 ± 20		88 ± 13		91 ± 8	
Eficiência DQO (%)	81 ± 6		87 ± 6		89 ± 4	
Eficiência GOH (%)	97 ± 2		99 ± 1		100 ± 0	

5.2.2. pH e Alcalinidade

O pH e a alcalinidade afluente e efluente também foram monitorados ao longo da operação do reator. A fim de manter o valor do pH próximo à neutralidade, foi adicionado bicarbonato de sódio na concentração de 50 mg.L^{-1} . Na Figura 23, estão apresentados os gráficos de monitoramento do pH e alcalinidade total durante a primeira fase operacional.

Figura 23: Gráficos de monitoramento de alcalinidade (a) e pH (b) ao longo da primeira fase operacional.

Pode-se notar a geração de alcalinidade no sistema durante toda a primeira fase operacional. Estimou-se a geração média de alcalinidade total em $2,76 \pm 0,91 \text{ gCaCO}_3.\text{L}^{-1} / \text{g}$ de NO_x reduzido, o que evidencia o fato da ocorrência efetiva da desnitrificação.

Com relação ao pH, observa-se que esse se manteve estável durante toda a operação, sendo os valores efluentes maiores do que os valores afluentes na maioria do tempo, o que era esperado para esse tipo de sistema em que há a geração de íons OH⁻.

5.2.3. Sólidos

Na Tabela 15, estão apresentados os resultados referentes ao teor de sólidos no efluente do reator. Pode-se notar que o teor de sólidos efluente foi baixo em todo o período de monitoramento, sendo que a maior parte dos sólidos corresponde à fração dissolvida. A fração de sólidos em suspensão foi muito baixa, o que evidencia um bom desempenho do separador, que impedia o arraste de sólidos para o efluente.

Tabela 15: Teor médio de sólidos do efluente do reator para a primeira fase operacional

Parâmetro (mg.L ⁻¹)	Concentração (Média ± DP)
ST	490 ± 108
STF	160 ± 63
STV	330 ± 84
SST	5 ± 1
SSF	2 ± 1
SSV	3 ± 1
SDT	485 ± 107
SDF	159 ± 63
SDV	326 ± 84

5.3. Fase 2

A Fase 2 teve duração aproximada de 2 meses. Antes de iniciar a aeração intermitente no reator, foi monitorado durante 18 dias o desempenho do mesmo para o aumento da relação DQO/N esperada de 10. Observou-se nesses dias que a relação DQO/N foi de $9,1 \pm 0,4$, valor inferior ao pretendido. Diante disso, a concentração afluente de glicerol foi ajustada resultando numa relação DQO/N de $10,2 \pm 0,6$ durante o período com aeração intermitente.

Devido ao pouco tempo para o término da etapa experimental do projeto, não foi possível testar diferentes relações DQO/P para avaliar condições experimentais distintas de forma a obter resultados positivos para a remoção biológica de fósforo. Dessa forma, optou-se por focar o processo para uma única condição de alimentação.

5.3.1. Remoção de Matéria Carbonácea e Eficiência de Desnitrificação

Na Figura 24, encontram-se os gráficos de monitoramento de DQO, GOH e NO_x, bem como a variação da relação DQO/N e C/N ao longo do período estudado. Observa-se que com o aumento da concentração de DQO afluente, o reator foi capaz de manter a eficiência de remoção de matéria carbonácea.

Com o início da aeração intermitente, observou-se pequeno aumento na eficiência de remoção de matéria orgânica (DQO e GOH) após a fase de aeração, quando comparado à fase anóxica, o que já era esperado para esse reator na condição operacional a que foi submetido.

Com relação à desnitrificação, observa-se estabilidade superior na remoção de NO_x àquela encontrado na primeira fase operacional. Isso se explica pelo aumento da relação DQO/N (ou C/N), indicando que o glicerol pode ser usado como fonte exógena de carbono para desnitrificação em ampla faixa de dosagem e, ainda assim, manter sua eficiência como doador de elétrons.

Outro resultado interessante com relação à desnitrificação é que, nesta fase, observou-se teores de nitrito muito baixos no efluente, se comparados com a primeira operacional. Isso evidencia, mais uma vez, que a desnitrificação com glicerol é favorecida para relações C/N mais elevadas.

Na Tabela 16, encontra-se um resumo dos resultados médios obtidos para a segunda fase operacional, no que tange à remoção de matéria carbonácea e nitrogenada, bem como as relações DQO/N e C/N médias aplicadas.

Figura 24: Gráficos de monitoramento de DQO (a), GOH (b), NOx (c) e relações DQO/N e C/N (d) ao longo da segunda fase operacional.

Tabela 16: Resultados médios obtidos na segunda fase com relação à DQO, GOH, NO_x e relações DQO/N e C/N

Parâmetro (Unidade)	Afluente	Efluente Fase Anóxica	Efluente Fase Aeróbia
N-NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	29,0 ± 1,3	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,4
N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,16	0,03 ± 0,11
N-NO _x (mg.L ⁻¹)	29,0 ± 1,3	0,4 ± 0,6	0,3 ± 0,5
DQO (mg.L ⁻¹)	285 ± 19	45 ± 17	15 ± 7
GOH (mg.L ⁻¹)	255,8 ± 15,2	2,7 ± 2,4	2,7 ± 2,4
DQO/N-NO _x	9,9 ± 0,8		
C/N-NO _x	3,5 ± 0,2		
Eficiência NO _x (%)	99 ± 2		
Eficiência DQO (%)	90 ± 8		
Eficiência GOH (%)	96 ± 4		

5.3.2. Remoção de fósforo e análise de ácidos voláteis

Na Figura 25, encontram-se os gráficos de monitoramento de fósforo e ácidos voláteis, bem como a variação da relação DQO/P e C/P ao longo do período estudado.

Observa-se que, para a condição operacional testada, não foi possível evidenciar remoção significativa de fósforo por via biológica. Infere-se que não houve o desenvolvimento dos OAP's no reator, uma vez que os teores de fósforo, após a fase aerada, estiveram muito próximos dos valores da fase não aerada. Constatou-se, também, a não ocorrência da 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 para promover a liberação de O-PO₄ no meio.

O teor de nitrato também pode ter influenciado a não ocorrência da liberação de O-PO₄ para o meio. Entretanto, pelo fato dos resultados de ácidos voláteis estarem muito baixos, principalmente para o ácido acético e propiônico (Figura 26b), infere-se que não houve fermentação efetiva do glicerol, sendo este quase totalmente consumido no processo de desnitrificação.

Segundo STENSEL (1991), para a síntese de polihidroxialcanoatos como PHB e PHV é necessário que haja acetato e propionato disponível. GERBER et al. (1987) estudaram o papel de ácidos graxos voláteis de cadeia simples e nitrato na zona anaeróbia de sistemas de

tratamento para remoção biológica de fósforo. Eles constataram que a liberação de fósforo na presença de nitrato somente ocorreu para reatores que continham ácido acético, propiônico e fórmico. Na presença de glicose, etanol, metanol e outros ácidos como butírico, láctico, cítrico e succínico, a liberação de fosfato não ocorreu até o nitrato ser totalmente reduzido. Isso vem corroborar a hipótese da falta de ácidos graxos voláteis de cadeia curta, diante da concentração de P afluyente, que seriam necessários para o desenvolvimento dos OAP's.

Figura 25: Gráficos de monitoramento de P (a), Ácidos Voláteis (b), e relações DQO/P e C/P (c) ao longo da segunda fase operacional.

Na Tabela 17, encontra-se um resumo dos resultados médios obtidos para a segunda fase operacional para os parâmetros fósforo, ácidos voláteis, bem como as relações DQO/P e C/P médias obtidas. Os outros ácidos correspondem ao somatório das concentrações dos seguintes ácidos: málico, succínico, fórmico, láctico, isobutírico, valérico, isovalérico e capróico.

Tabela 17: Resultados médios obtidos na segunda fase com relação à P, ácidos voláteis e relações DQO/P e C/P

Parâmetro (Unidade)	Afluente	Efluente Fase	
		Anóxica	Aeróbia
P-PO ₄ ⁻³ (mg.L ⁻¹)	10,1 ± 0,7	9,4 ± 1,3	9,2 ± 1,4
AVT (mg.L ⁻¹)	NA*	13,0 ± 11,9	NA
Ácido Acético (mg.L ⁻¹)	NA	0,4 ± 1,4	NA
Ácido Propiônico (mg.L ⁻¹)	NA	3,0 ± 4,8	NA
Ácido Butírico (mg.L ⁻¹)	NA	1,0 ± 1,5	NA
Outros ácidos (mg.L ⁻¹)	NA	8,5 ± 9,3	NA
DQO/P-PO ₄ ⁻³		29,0 ± 3,5	
C/P-PO ₄ ⁻³		10,2 ± 1,0	
Eficiência P (%)		9 ± 12	

* NA - Não Analisado

5.3.3. pH e Alcalinidade

Assim como na Fase 1, o pH e a alcalinidade afluente se mantiveram estáveis durante todo o período analisado, sendo que os valores efluentes estiveram de acordo com o esperado e seguiram os resultados referentes à fase não aerada, em que ocorreu a desnitrificação com a geração de alcalinidade e consequente aumento de pH. Como durante a fase aerada não havia processos que levassem ao consumo de alcalinidade, os resultados se mantiveram próximos aos da fase não aerada. Na Figura 26, estão apresentados os gráficos de monitoramento do pH e alcalinidade total durante a segunda fase operacional.

Com relação à geração de alcalinidade, essa foi maior do que a verificada na primeira fase, com média de $3,28 \pm 0,50$ gCaCO₃/g de NO_x reduzido.

Figura 26: Gráficos de monitoramento de alcalinidade (a) e pH (b) ao longo da segunda fase operacional.

5.3.4. Sólidos

Na Tabela 18, estão apresentados os resultados referentes aos teores de sólidos do efluente do reator, durante a segunda fase operacional. Assim como na primeira fase, nota-se um baixo teor de sólidos efluente em todo o período de monitoramento, sendo que a maior parte do total de sólidos corresponde à fração dissolvida, e há um teor muito baixo da fração de sólidos em suspensão. Como se optou, nessa segunda fase de operação, por cortar a alimentação do reator durante a fase aerada, não foi evidenciado o arraste de sólidos que chegasse a prejudicar a qualidade do efluente final.

Caso fosse feita a alimentação contínua, é provável que ocorresse perda de sólidos expressiva, uma vez que, com a aeração, a biomassa se tornava mais dispersa. Sendo a troca gasosa no meio muito alta, o separador vinculado ao selo hídrico não seria suficiente para o retorno de sólidos para o fundo do reator e haveria o escape de biomassa para o efluente.

Tabela 18: Teor médio de sólidos do efluente do reator para a segunda fase operacional

Parâmetro (mg.L ⁻¹)	Concentração (Média ± DP)
ST	517 ± 112
STF	293 ± 52
STV	224 ± 119
SST	27 ± 14
SSF	8 ± 7
SSV	19 ± 9
SDT	490 ± 109
SDF	284 ± 56
SDV	206 ± 116

5.3.5. Perfil de OD

Para essa segunda fase operacional, obteve-se, também, o perfil de oxigênio dissolvido para as fases de aeração e não aeração, ilustrado na Figura 27. Nota-se que o reator leva aproximadamente 30 minutos para atingir a concentração de 2,5 mgOD.L⁻¹, mantendo o teor de OD nessa faixa no período de 1,5 horas de aeração. Para voltar à condição de anoxia novamente, após cessada a aeração, leva-se 10 minutos aproximadamente.

Figura 27: Perfil de OD para aeração intermitente na segunda fase operacional.

5.4. Análises Microbiológicas

5.4.1. Microscopia Óptica

Os ensaios de microscopia óptica foram realizados de modo a permitir a comparação qualitativa da biomassa entre as fases operacionais analisadas. Na primeira fase, foram observados, a olho nu, pontos brancos na biomassa. Então, foi coletada uma amostra da biomassa para exame microscópico no 115º dia de operação do reator, que correspondia à Fase 1a.

Através da análise microscópica (Figura 28), foi observada a presença de bactérias semelhantes às do gênero *Zoogloea*, pela forma colonial e dendrítica do agrupamento de bacilos. Constatou-se que havia uma colônia bem desenvolvida dessa Proteobacteria que conferia o aspecto esbranquiçado à biomassa. De acordo MADIGAN et al. (2004), o gênero *Zoogloea* caracteriza-se pela formação de um polímero fibrilar extracelular, responsável pela agregação das células em flocos típicos. Pode-se inferir, então, que a presença desse tipo de bactéria no reator potencializou a granulação da biomassa, como foi observado ao longo da primeira fase operacional. Na Figura 28, também pode ser notada a presença do floco do lodo ativado bem definido e compacto no sistema.

Figura 28: Imagens de microscopia óptica realizada ao final da Fase 1a. a) Floco de lodo ativado e colônia de microrganismos zoogleiais; b) Detalhe para a forma bacilar levemente curva da bactéria; c) imagem ampliada da colônia de *Zoogloea*.

A granulação da biomassa no reator, durante a Fase 1, foi mais expressiva ao final da Fase 1c. Além disso, constatou-se a ocorrência de flotação de parte da biomassa. Dessa forma, aos 195 dias de operação, foram retiradas duas amostras da biomassa, uma da superfície e outra do fundo – Figura 29. Essa flotação possivelmente foi devida aos gases gerados pela desnitrificação e à presença de bactérias filamentosas observadas na microscopia óptica – Figura 31.

Figura 29: Biomassa no sistema ao final da primeira fase operacional - a) reator com biomassa granulada; b) Detalhe para a biomassa flotada; c) Comparação entre a biomassa do fundo e da superfície do reator.

Nas Figuras 30 e 31, encontram-se as imagens de microscopia óptica da biomassa do fundo e da superfície do reator, respectivamente. Na amostra de fundo, observou-se a presença de flocos típicos de *Zoogloea*, assim como na Figura 28, além de formas bacilares diversas, incluindo formas semelhantes a bactérias redutoras de sulfato. Na amostra de superfície, observaram-se bactérias filamentosas semelhantes às do gênero *Beggiatoa*.

Segundo MADIGAN et al. (2004), o gênero *Beggiatoa* cresce quimiolitotrophicamente a partir de compostos reduzidos de enxofre como doadores de elétrons oxidando-os em pH geralmente neutro. Porém, utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono, ou seja, são mixotróficos. São filamentos longos e com grande diâmetro, geralmente preenchidos por grânulos de enxofre elementar (S^0), sendo facilmente observados na microscopia, devido ao brilho que essas estruturas apresentam – Figura 31.

Figura 30: Imagens de microscopia óptica da biomassa presente no fundo do reator ao final da Fase 1.
a) Floco típico de *Zoogloea*; b) Vários tipos de bacilos

Figura 31: Imagens de microscopia óptica da biomassa presente na superfície do reator com destaque para *Beggiatoa* com grânulos de S^0 .

Na segunda fase de operação, observou-se a presença de bactérias filamentosas em maior quantidade e o aumento na densidade de bactérias filamentosas do gênero *Beggiatoa*. Possivelmente, a aeração intermitente favoreceu o aparecimento dessas, com a criação de ambientes de microaeração no reator, favorecendo a oxidação parcial do sulfeto a S^0 . Além disso, também foi observada a presença de cistos de protozoários e ciliados livres. Na Figura 32, são apresentadas as imagens de microscopia para essa fase de operação, sendo que a amostra da biomassa foi retirada do fundo do reator, após sedimentação posterior à fase aeróbia, sendo coletada aos 40 dias de operação com aeração intermitente.

Figura 32: Imagens de microscopia óptica na segunda fase de operação. a) Emaranhado de bactérias filamentosas; b) Cistos de protozoários; c) Ovo de verme; d) *Beggiatoa* com destaque para os grânulos de S^0 .

Salienta-se o fato de que como a *Beggiatoa* apresenta nutrição mixotrófica utilizando compostos orgânicos como fonte de carbono, essas bactérias oxidantes de enxofre podem ter consumido parte dos substratos provenientes da degradação anaeróbia do glicerol, como por exemplo acetato ou propionato, impedindo que houvesse concentração suficiente de AGV para a formação de PHB ou PHV pelos organismos acumuladores de fósforo, que não tiveram um desenvolvimento notável no sistema, uma vez que a remoção biológica de fósforo se mostrou inexpressiva.

5.4.2. PCR / DGGE

A análise de DGGE foi realizada com as amostras das Fases 1 e 2 com o objetivo de verificar uma possível variação na diversidade microbiana entre as condições testadas em cada fase: sem e com aeração intermitente. Para a Fase 1, foram coletadas amostras do fundo e da superfície do reator como já apresentado anteriormente – Figura 29. Já para a Fase 2, foi

coletada somente uma amostra do fundo do reator da biomassa sedimentada após transcorrido o período de aeração. Na Figura 33, encontra-se o dendograma resultante da análise do índice de similaridade (Pearson) entre as amostras das Fases 1 e 2.

Figura 33: Dendograma com agrupamento UPGMA das amostras de biomassa das Fases 1 e 2.

Pode-se observar pelo dendograma apresentado que a biomassa coletada no fundo nas Fases 1 e 2 apresentam um elevado nível de similaridade ($>90\%$) quando comparado à amostra coletada na superfície do reator no final da Fase 1. Isso evidencia que a aeração intermitente não causou alteração significativa na diversidade microbiana do reator.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na pesquisa, pode-se concluir que o glicerol se mostra aplicável como doador de elétrons para a desnitrificação em reator anóxico com biomassa suspensa, operando em TDH de 4 horas. Foi possível atingir desnitrificação completa na primeira fase operacional do reator com relação C/N de 1,2, 1,5 e 1,8, porém, os resultados de remoção de nitrato apresentaram certa instabilidade, sendo que, para a relação C/N de $1,8 \pm 0,2$, a distribuição dos dados apresentou maior média de remoção de NOx e menor desvio padrão ($91 \pm 8\%$), indicando ser essa uma boa relação C/N a ser adotada como parâmetro de partida. Esse resultado aproxima-se ao valor obtido a partir da equação química proposta para a desnitrificação com o uso de glicerol como doador de elétrons, cuja relação C/N foi calculada em 1,68.

Para a segunda fase de operação, que apresentou relação C/N de $3,5 \pm 0,2$, observou-se que a desnitrificação foi completa na maior parte do tempo, com $99 \pm 2\%$ de eficiência de remoção de NOx, sendo que o teor de nitrito foi quase nulo durante essa fase ($0,03 \pm 0,11 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$), o que evidencia que a desnitrificação com glicerol é favorecida para relações C/N maiores.

Com relação à remoção biológica de fósforo conjuntamente à remoção de nitrogênio no reator submetido à aeração intermitente e operando com relação C/P de 10 ± 1 , observou-se que não houve o desenvolvimento dos OAP's no sistema, uma vez que a remoção de fósforo foi inexpressiva ($9 \pm 12\%$) e os teores de fósforo efluente ($9,2 \pm 1,4$) estiveram muito próximos aos do afluente ($10,1 \pm 0,7$). Além disso, não foi observada a liberação de fosfato durante a fase não aerada, o que indica que não ocorreu uma degradação anaeróbia significativa do glicerol de forma a gerar AGV para a síntese de PHB. Isso também foi evidenciado pelas análises de ácidos voláteis, que apresentaram concentrações de ácido acético e propiônico muito baixas se comparadas ao teor de fósforo no afluente. Infere-se que a maior parte do glicerol foi utilizada como fonte de carbono pelas bactérias heterotróficas desnitrificantes. Portanto, o teor de nitrato neste caso também foi um fator de impedimento ao desenvolvimento dos organismos acumuladores de fósforo.

Nos ensaios de microscopia óptica foi observado a presença de bactérias filamentosas semelhantes às do gênero *Beggiatoa* (oxidantes de enxofre), sobretudo na Fase 2 onde havia aeração, uma vez que essas bactérias são aeróbias, mas também são bem adaptadas em condições de microaerofilia. Como elas apresentam nutrição mixotrófica, pode também ter

ocorrido o consumo de substratos provenientes da degradação anaeróbia do glicerol, como por exemplo acetato ou propionato, diminuindo ainda mais a disponibilidade de AGV para os OAP's.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Verificar outras configurações de reatores complementares ao reator com aeração intermitente de forma a promover a remoção biológica de fósforo. Sugere-se, por exemplo, a implantação de um fermentador para a geração de AGV a partir da degradação anaeróbia do glicerol prévio a um reator com aeração intermitente para a remoção biológica de fósforo;
- Verificar o desenvolvimento de ODNAP's no reator de aeração intermitente para a configuração proposta anteriormente;
- Verificar a separação da desnitrificação e da remoção biológica de fósforo em reatores distintos ou compartimentos diferentes dentro do mesmo reator, de forma a impedir a influência do teor de nitrato sobre a remoção biológica de fósforo;
- Avaliar perfis dos compostos intermediários da remoção biológica de fósforo, como PHB e Poli-P, durante as fases aerada e não aerada, a fim de entender melhor os mecanismos bioquímicos na configuração de reator proposta;
- Avaliar outras fontes de carbono como acetato e propionato de sódio aplicadas em conjunto com o glicerol para a configuração proposta a fim de verificar melhora na remoção biológica de fósforo, pelo aumento da relação AGV/P;
- Testar condições de TDH distintas para desnitrificação de forma a obter o TDH mínimo para uma desnitrificação completa com glicerol;
- Testar diferentes períodos de aeração e não aeração para o reator de aeração intermitente de forma a verificar a influência desse parâmetro na remoção biológica de fósforo usando glicerol como doador de elétrons;
- Testar glicerina bruta da produção de biodiesel e pré-tratada (glicerina loira) de forma a verificar as condições necessárias para uma desnitrificação completa e remoção biológica de fósforo com esses substratos;
- Avaliar a competição por substratos da fermentação anaeróbia do glicerol entre bactérias oxidantes de enxofre como as do gênero *Beggiatoa* e os OAP's, bem como as condições para que não haja proliferação dessas bactérias que podem impedir ou reduzir a remoção de fósforo do sistema.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, Sergi; TURON, Xavier. 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. 733-741, 2012.

ABIQUIM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. *Anuário da Indústria Química Brasileira 2013*. 226 p.

AHMED, Z. et al. 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.

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.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (Brasil). *Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis*: 2014.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater*. Washington DC, USA, 2005.

BARNARD, James 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.

BASSIN, João Paulo. *Biological nutrient removal in Compact Biofilm Systems*. 2012

BENETTI, Antônio D.; AQUINO, Sérgio 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.

BODÍK, I. et al. Biodiesel waste as source of organic carbon for municipal WWTP denitrification. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 8, p. 2452-2456, 2009.

BRASIL. Lei nº. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 14 jan. 2005.

BRASIL. Lei nº. 13.033, de 24 de setembro de 2014. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 set. 2014.

BROUGHTON, A.; PRATT, S.; SHILTON, A. Enhanced biological phosphorus removal for high-strength wastewater with a low rbCOD:P ratio. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 5, p. 1236-1241, 2008.

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

CHUANG, S. H. et al. Effects of different carbon supplements on phosphorus removal in low C/ P ratio industrial wastewater. *Bioresour. Technol.*, v. 102, n. 9, p. 5461-5465, 2011.

CLOMBURG, James M.; GONZALEZ, Ramon. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 20-28, 2013.

CONAMA, Resolução n. 357, de 17 de Março de 2005. *Conselho Nacional do Meio Ambiente*-CONAMA, 2005.

CONAMA, Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011. *Conselho Nacional do Meio Ambiente*-CONAMA, 2011.

CORDOBA, A. Y. M. *Estudo da combustão direta da glicerina bruta e loira como alternativa de aproveitamento energético sustentável*. 2011. 270 p. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011.

CYPLIK, Paweł et al. Denitrification of industrial wastewater: Influence of glycerol addition on metabolic activity and community shifts in a microbial consortium. *Chemosphere*, v. 93, n. 11, p. 2823-2831, 2013.

DHARMADI, Yandi; MURARKA, Abhishek; GONZALEZ, Ramon. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and bioengineering*, v. 94, n. 5, p. 821-829, 2006.

DILALLO, Rosemarie; ALBERTSON, Orris E. Volatile acids by direct titration. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, p. 356-365, 1961.

ECKENFELDER, W. W; ARGAMAN, Y. Principles of Biological and Physical/Chemical Nitrogen Removal. In: SEDLAK, Richard. *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice (2nd edition)*. p. 3-42, 1991.

ESTATCAMP - Consultoria em estatística e qualidade. Software Action. v. 2.8. São Carlos - SP, Brasil, 2014. Disponível em < <http://www.portalaction.com.br/>>.

ESTEVES, F.A. Eutrofização Artificial. In: *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Editora Interciência. p. 504-529. 1998.

FERNÁNDEZ-NAVA, Y. et al. Denitrification of high nitrate concentration wastewater using alternative carbon sources. *Journal of Hazardous Materials*, v. 173, n. 1, p. 682-688, 2010.

GERBER, A. et al. The phenomenon of simultaneous phosphate uptake and release, and its importance in biological nutrient removal. *Biological phosphate removal from wastewaters*, p. 123-134, 1987.

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.

GRADY JR., C. P. Leslie et al. *Biological wastewater treatment*. IWA Publishing, 2011.

GREENHILL, Stacey. *Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel*. U.S. Patent Application 10/744,272, 22 dez. 2003.

GRIFFITHS, Robert I. et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial community composition. *Applied and environmental microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

GUERRERO, J. et al. Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.*, v. 46, n. 9, p. 2983-2991, 2012.

HER, J. J.; HUANG, J. S. Influences of carbon source and C/ N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresource Technology*, v. 54, n. 1, p. 45-51, 1995.

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.

LOPES, Andressa Nery et al. 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.

MADIGAN, Michael T. et al. *Microbiologia de Brock*. Artmed, 2004.

METCALF & EDDY. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*. McGraw-Hill International Edition, 3 ed. New York, 1991.

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

MORAES, E. M.; ADORNO, M. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E (2000). Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: *VI Oficina e seminário latino-americano de digestão anaeróbia*. Recife, PE: UFPE. p. 2813-2823.

MOTA, Claudio J. A.; SILVA, Carolina X. A. da; GONÇALVES, Valter L. C. Gliceriquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

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

MUYZER, Gerard; DE WAAL, Ellen C.; UITTERLINDEN, Andre G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

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

PACHAURI, Naresh; HE, Brian. Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities. In: *Proceedings of the ASABE Annual International Meeting*. 2006.

PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.

PATEL, J.; NAKHLA, G. Interaction of denitrification and P removal in anoxic P removal systems. *Desalination*, v. 201, n. 1-3, p. 82-99, 2006.

REGINATTO, Valeria; SCHMIDELL, Willibaldo. Remoção Biológica de Fósforo. In: SCHMIDELL, W. et al. *Tratamento Biológico de Águas Residuárias*. p. 511-530, 2007.

REHMAN A. et al. Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil bio-diesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*. *Current Research in Bacteriology*. v. 1, n. 1, p. 7-16, 2008.

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

RITTMANN, Bruce E.; MCCARTY, Perry L. *Environmental biotechnology: principles and applications*. New York: McGrawHill, 2001.

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

SANTOS, S. G. dos. *Utilização de metanol, etanol e metano como doadores de elétrons para a desnitrificação*. 2003. 130 p. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

SHEN, J. et al. Biological denitrification of high-nitrate wastewater in a modified anoxic/ oxic-membrane bioreactor (A/ O- MBR). *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, n. 2-3, p. 595-600, 2009.

SILVA, Gervásio Paulo da; MACK, Matthias; CONTIERO, Jonas. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances*, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SNIS - SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO. *Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos - 2013*. Brasília: Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA, Ministério das Cidades, 2014. 181 p.

STENSEL, H. D. Principles of Biological Phosphorus Removal. In: SEDLAK, Richard. *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice (2nd edition)*. p. 141-166, 1991.

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.

TAN, H. W.; ABDUL AZIZ, A. R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 118-127, 2013.

TEMUDO, Margarida F. et al. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: a chemostat study. *Biotechnology and bioengineering*, v. 100, n. 6, p. 1088-1098, 2008.

TORRES, P. *Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários*. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

TOUZEL, J. P.; ALBAGNAC, G. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*, v. 16, p. 241-245, 1983.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Manual - Nitrogen Control*. Washington (DC). 311 p, 1993

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

VALDEZ, H. da C.; AMADO, R. S.; SOUZA, F. C. de; D'ELIA, E. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. *Química Nova*, p. 1-7, 6 dez. 2011.

VAN HAANDEL, A. et al. Remoção Biológica de Fósforo no Sistema de Lodo Ativado: Mecanismos e Configurações. In: MOTA, F. S. B; VON SPERLING, M. *Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção*. p. 227-261, 2009

WANG, D. et al. Evaluation of the feasibility of alcohols serving as external carbon sources for biological phosphorus removal induced by the oxic/ extended- idle regime. *Biotechnology and Bioengineering*, Hoboken, v. 110, n. 3, p. 827-837, 2013.

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, Z. X. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnol. Adv.* 19: p. 201-223, 2001.

WENTZEL, M. C. et al. Enhanced biological phosphorus removal. In: HENZE, M. et al. *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. p. 155-220, 2008.

YAZDANI, Syed Shams; GONZALEZ, Ramon. 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, Q. et al. Enhancing biological phosphorus removal with glycerol. *Water Science and Technology*. 61 (7), p. 1837-1843. 2010.