



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

NAIANA CRISTINE GABIATTI

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A CONVERSÃO DE
AMÔNIO EM NITRITO E ELIMINAÇÃO DE NITROGÊNIO DE
EFLUENTE SINTÉTICO**

**Florianópolis/SC
2010**

NAIANA CRISTINE GABIATTI

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A CONVERSÃO DE
AMÔNIO EM NITRITO E ELIMINAÇÃO DE NITROGÊNIO DE
EFLUENTE SINTÉTICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Co-Orientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

**Florianópolis / SC
2010**

INSERIR FOLHA DE

*... A SOMBRA SÓ EXISTE
ONDE BRILHA ALGUMA LUZ...*

(Pe. Fábio de Melo)

AGRADECIMENTOS

Toda a minha gratidão às pessoas que fizeram parte da construção deste trabalho:

Aos meus pais, Jandir e Liane, por me suprirem sempre de absolutamente tudo que fosse necessário, carinho, amor, exemplo e dignidade.

Aos meus irmãos, Cristian e Mateus, pelo amor e companheirismo em todas as horas, e por me darem tanto orgulho.

Aos meus avós, pela ternura e bondade, que me fazem acreditar mais nas pessoas.

A todos os meus amigos, que acompanharam de perto essa jornada, me incentivando com palavras doces nos momentos de dificuldade. Eu sei o quanto muitos de vocês torceram por este momento!

À família Cordeiro, por me acolher de forma tão carinhosa em momentos importantes, em especial à Ju, por me dar tanto, sem pedir mais do que amizade em troca.

À família “Belvedere”, Martinha e Patrícia pela amizade, apoio e o cantinho para dormir, especialmente a Jana, por tudo isso e mais a cumplicidade nas melhores e piores horas, nas madrugadas no “Lab” ou nos dias de sol.

Às gurias do Bolívia, Lari e Ju, por terem sido uma família pra mim durante os dois anos morando juntas.

Aos amigos e colegas do LTBR, Camila, Cléo, Karen, Indy, Bárbara, Carol, Hélio, “Marcelos”, pela ótima convivência, ajuda prestada e conhecimento dividido.

À Eliane, Estela e Angelina por me acolherem tão calorosamente no laboratório e por continuarem me presenteando com a amizade e sabedoria.

À amiga Irene, pela amizade e noites de companhia no laboratório

À professora Regina, pelo incentivo e disponibilização do laboratório e também aos seus “pupilos”, em especial Heloísa e Malu pela grande colaboração nas análises microbiológicas e as boas conversas durante o período.

Ao Jaime, pelos serviços prestados no fermentador, acompanhados sempre de uma conversa amiga.

Ao professor Hugo pelo apoio, pela amizade e pela disponibilidade do laboratório para o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Willibaldo, pela compreensão, ensinamentos e todo apoio necessários para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFSC pela aceitação para a realização deste trabalho, em especial ao Edevilson, por ser sempre prestativo.

À CASAN pela disponibilização de material e ao Engenheiro Luciano pela prontidão em prestar ajuda.

E ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

*À minha família, em especial aos meus pais
por depositarem confiança em mim e
apoiarem minhas escolhas
À minha “amiga-irmã” Juliana Cordeiro, meu
ponto de equilíbrio, neste mundo
desequilibrado.*

RESUMO

As implicações econômicas e ambientais do desequilíbrio causado por despejos de efluentes com altas concentrações de nitrogênio em corpos receptores levam à necessidade de soluções eficientes na remoção deste poluente. Neste sentido, novos processos biológicos vêm sendo estudados. Os processos de remoção via nitrito ganham cada vez mais destaque, tendo em vista a redução da demanda de carbono e do suprimento de oxigênio necessários. Um dos fatores limitantes deste tipo de processo é a remoção ou inibição das Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON) enquanto as Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA) permanecem em plena atividade. O objetivo deste trabalho é propor uma forma de seleção dos microrganismos de interesse partindo de uma biomassa heterogênea e, a partir disso, verificar o comportamento desta biomassa na remoção de altas concentrações de nitrogênio amoniacal. O lodo coletado, a cada novo ensaio, na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) do município de Florianópolis-SC, passou por um processo de lavagem em que o reator foi operado de forma contínua, sem retenção de células. Altas vazões de alimentação foram aplicadas, utilizando-se meio sintético com cerca de 500 mg N-NH₄.L⁻¹. Ao se chegar a uma concentração próxima a 1 g SST.L⁻¹ o reator passou a ser operado como SBR e se seguiam vários ciclos de alimentação. Durante todo período de operação a temperatura, aeração e agitação eram controladas em 35°C, 1VVM e 400 rpm, respectivamente. O pH foi mantido em 7,5 através do controle automático com uma bomba ácido/base. Ao todo foram realizados 9 ensaios, partindo-se de diferentes inóculos e variando algumas estratégias operacionais entre eles. Em um destes ensaios não foi aplicada a lavagem como forma de seleção da biomassa. As maiores velocidades específicas de oxidação de amônio (QNH₄) e formação de nitrito (QNO₂) foram sempre obtidas no último ciclo de cada ensaio. No ensaio de Agosto/2009, chegaram a 2,33gN-NH₄ g⁻¹ SSTd⁻¹ e 1,51gN-NO₂ g⁻¹ SST d⁻¹ respectivamente. Este comportamento demonstra um fenômeno de adaptação contínua da biomassa ao longo de cada ensaio. As medidas de velocidade de consumo de oxigênio confirmaram este fenômeno, já que partiram de valores mínimos, de difícil determinação, nas primeiras horas dos ciclos iniciais e tiveram um acréscimo significativo, chegando a valores superiores a 4 mgO₂.g⁻¹SST.min⁻¹. No que diz respeito às porcentagens de remoção de nitrogênio houve uma maior variabilidade e instabilidade. Os valores mais altos ficaram na média dos 30%. Outra observação importante, feita em alguns ensaios, foi que, para valores de QNH₄X mais elevados, os valores de QO₂X experimentais são inferiores àqueles previstos pela estequiometria do processo, o que pode estar indicando que o amônio não foi todo oxidado a nitrito, evidenciando a ocorrência de uma via metabólica distinta, possivelmente, a desnitrificação aeróbia através do processo NO_x. As análises microbiológicas mostraram diferenças entre as populações ao longo de cada ensaio, apresentando uma evolução na presença das BOA em relação aos demais grupos. Os resultados

obtidos confirmam o processo de lavagem do lodo como uma alternativa para a seleção de uma biomassa mais específica, dando melhores condições à partida do processo. Além disso a procedência do lodo original revela-se como condição importante para o estabelecimento de um processo eficiente.

Palavra-chave: Depejo de efluentes; Processo biológico; Bactérias Oxidadoras; Seleção de microrganismo; Efluente sintético.

ABSTRACT

The economic and environmental implications of the imbalance caused by wastewater discharges with high nitrogen concentration in water-bodies leads to the need of efficient solutions in the removal of this pollutant. New biological processes have been studied. Nitrogen removal via nitrite has been recommended because of its reduces carbon and oxygen demand. One of this process limitations lies in retaining the ammonia oxidizing bacteria (AOB) while eliminating the nitrite oxidizing bacteria (NOB). The objective of this work was to propose a way to enrich the interested microorganisms starting from a heterogeneous inoculum and verify its removal efficiency of a high ammonium nitrogen concentrations media. The sludge was collected, in each new test, at the municipal Sewage Treatment Station in Florianópolis, SC, and proceeded a washing process in which the reactor was operated continuously, without cells retention. High flow rate was applied, using a synthetic medium with about 500 mg N-NH₄.L⁻¹. When it achieved concentration close to 1 g SST.L⁻¹, the reactor began to be operated as SBR and than followed several feeding cycles. During the entire operation period temperature, aeration and stirring were controlled at 35 ° C, 1VVM and 400 rpm, respectively. The pH was maintained at 7.5 by automatic control system with an acid / base pump. Altogether, it were performed 9 tests, starting from different inoculum and varying some operational strategies. In one of these tests it was not applied the wash out procedure as a way of selecting the biomass. The specific ammonium oxidation rate (QNH₄) and nitrite formation (QNO₂) were always obtained in the last cycle of each test. In August/2009 test, reached 2.33 gN-NH₄. g⁻¹TSS.d⁻¹ and 1.51 gN-NO₂.g⁻¹TSS.d⁻¹ respectively. This behavior demonstrates a phenomenon of biomass continues adaptation throughout each test. The oxygen consumption rates measurements confirmed this phenomenon, since they departed from minimum values, hard to determine, in the first hours of the initial cycles and had a significant increase, reaching values higher than 4 mgO₂.g⁻¹ SST.min⁻¹. The percentage of nitrogen removal had a greater variability and instability. The highest values were about 30%. Another important observation made in some experiments was that for high values of QNH₄X, QO₂X experimental values were lower than those provided by the process stoichiometry, which may indicate that the ammonium was not all oxidized to nitrite, indicating the occurrence of a distinct pathway, possibly the aerobic denitrification process NO_x. Microbiological analysis showed differences among populations throughout each test, showing an evolution in AOB occurrence over the other groups. The results confirm the sludge wash out as an alternative process to select a more specific biomass, giving better conditions to start up a process. Besides, the original sludge source is revealed as an important condition for an efficient process establishment.

Keyword: Discharge of effluent; Biological process; Oxidizing bacteria; Selection of microorganism; Synthetic effluent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo do nitrogênio.....	31
Figura 3.2 - Remoção de nitrogênio via nitrito.	37
Figura 3.3 - Influência da temperatura e da máxima vazão específica de alimentação, em reator contínuo submetido à lavagem de células.	39
Figura 3.4 - Percentagem de amônia livre como N (em relação ao total de N presente) e percentagem de ácido nitroso como N, em relação à quantidade de nitrito presente.	41
Figura 3.5 - Distribuição da amônia e do íon amônio em função do pH e da temperatura.....	42
Figura 3.6 - Possível rota metabólica para a conversão da amônia a nitrogênio gasoso, pelo <i>Nitrosomonas europaea</i>	47
Figura 4.1 - Biorreator / Fermentador. Diagrama de processo.....	54
Figura 4.2 - Tela principal do programa de monitoramento e controle do biorreator.....	54
Figura 4.3 - Reator 1 (R1) e Reator 2 (R2) sendo operados simultaneamente.	56
Figura 5.1 - Acompanhamento das concentrações de amônio (expresso como N) ao longo dos cinco testes abióticos realizados com diferentes valores de pH.....	70
Figura 5.2 - Acompanhamento das concentrações de amônia livre presentes no reator conforme equação proposta por Anthonisen <i>et al.</i> (1976) e Wiesmann (1994) ao longo dos testes realizados com diferentes valores de pH.....	71
Figura 5.3 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.	72
Figura 5.4 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.	73
Figura 5.5 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das três cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.....	74
Figura 5.6 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.	76
Figura 5.7 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.	77

Figura 5.8 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das cinco cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.	78
Figura 5.9 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.....	80
Figura 5.10 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.	81
Figura 5.11 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.	82
Figura 5.12 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.....	83
Figura 5.13 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.....	84
Figura 5.14 - Velocidade de consumo de oxigênio (QO2X) em função da velocidade de consumo de amônio (QNH4X).	85
Figura 5.15 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.	86
Figura 5.16 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.	87
Figura 5.17 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.....	88
Figura 5.18 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.....	89
Figura 5.19 - Velocidade de consumo de oxigênio (QO2X) em função da velocidade de consumo de amônio (QNH4X).	90
Figura 5.20 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.	91
Figura 5.21 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.	92
Figura 5.22 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.....	92
Figura 5.23 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo, ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.....	94

Figura 5.24 - Velocidade de consumo de oxigênio (QO2X) em função da velocidade de consumo de amônio (QNH4X).	95
Figura 5.25 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.	96
Figura 5.26 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.	96
Figura 5.27 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.	97
Figura 5.28 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo de duas, das cinco cinéticas realizadas neste ensaio.	98
Figura 5.29 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas.	99
Figura 5.30 - Velocidades de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.	101
Figura 5.31 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.	102
Figura 5.32 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.	103
Figura 5.33 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.	103
Figura 5.34 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.	105
Figura 5.35 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.	105
Figura 5.36 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.	106
Figura 5.37 - Coloração com DAPI (a) e sonda EUB (b) de amostra antes da lavagem do lodo, referente ao ensaio de março/2010. Aumento de 100X.	108
Figura 5.38 - Imagens referentes à coloração com DAPI (a) e com a sonda NEU (b).	109
Figura 5.39 - Floco do inóculo do ensaio de setembro de 2009 antes do processo de lavagem do lodo. Aumento de 400x.	111
Figura 5.40 - Floco do lodo no ensaio de setembro de 2009 logo após o processo de lavagem. Aumento de 400x.	111
Figura 5.41 - Floco do lodo no ensaio de setembro de 2009, final do sexto ciclo de alimentação. Aumento de 400x.	112

Figura 5.42 - Amostras dos ciclos finais dos ensaios de setembro/2009 (a) e Janeiro/2010 (b). Aumento de 1000x.	112
Figura 5.43 - Detalhe de ciliado presente em amostra do ensaio de outubro/2009. Aumento 1000x.	113
Figura 5.44 - Esquema sugerido por Leitao <i>et al.</i> (2006), para o metabolismo induzido nas BOA diante da presença dos intermediários NOx.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Estados de oxidação do nitrogênio, em diferentes compostos.	30
Tabela 4.1 - Composição de nutrientes do meio sintético.	53
Tabela 4.2 - Composição da solução de micronutrientes.*	53
Tabela 4.3 - Sondas e seqüência de nucleotídeos utilizados na análise de FISH.....	66
Tabela 4.4 - Dados referentes aos ensaios realizados entre abril de 2009 e março de 2010.....	67
Tabela 5.1 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 3 ciclos de alimentação.....	75
Tabela 5.2 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação.....	79
Tabela 5.3 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 6 ciclos de alimentação.....	84
Tabela 5.4 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 7 ciclos de alimentação.....	88
Tabela 5.5 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 6 ciclos de alimentação.....	93
Tabela 5.6 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação.....	98
Tabela 5.7 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação.....	100
Tabela 5.8 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de	

consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação. 104

Tabela 5.9 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação. 107

Tabela 5.10 - Valores de S_0/X_0 ($\text{g N-NH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{SST}$) referentes a cada ciclo de alimentação dos ensaios 1 e 2. 107

NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA

ANAMMOX-	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation Process</i>
BOM	- bactéria oxidadora de nitrito
BOA	- bactéria oxidadora de amônio
CANON	- Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite
CASAN	- Companhia de Saneamento de Água e Esgoto de Santa Catarina
DQO	- demanda bioquímica de oxigênio
SHARON	- Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite
OLAND	- Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification
TRH	- tempo de retenção hidráulica
SBR	- sequencing batch reactor
F	- vazão de alimentação ($L \cdot h^{-1}$)
X	- concentração celular no reator ($g \cdot L^{-1}$)
X₀	- concentração celular na alimentação ($g \cdot L^{-1}$)
V	- volume do reator L
μ	- velocidade específica de crescimento (d^{-1} ou h^{-1})
μ_{max}	- velocidade específica máxima de crescimento h^{-1}
D	- vazão específica de alimentação (d^{-1})
N-NH₄	- nitrogênio amoniacal ($mgN-NH_4 \cdot L^{-1}$)
N-NO₂	- nitrogênio na forma de nitrito ($mgN-NO_2 \cdot L^{-1}$)
N-NO₃	- nitrogênio na forma de nitrato ($mgN-NO_3 \cdot L^{-1}$)
QO₂X	- velocidade de respiração celular ($mgO_2 \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$)
QO₂	- velocidade específica de respiração celular ($mgO_2 \cdot g^{-1} SST \cdot min^{-1}$)
C^o	- concentração de oxigênio dissolvido ($mgO_2 \cdot L^{-1}$)
K_La	- coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
FISH	- Fluorescent In Situ Hybridization
SST	- sólidos suspensos totais ($g \cdot L^{-1}$)
SSV	- sólidos suspensos voláteis ($g \cdot L^{-1}$)
QNH₄	- Velocidade específica de consumo de amônio ($mgN-NH_4 \cdot g^{-1} SST \cdot d^{-1}$)
QNO₂	- velocidade específica de formação de nitrito ($mgN-NO_2 \cdot g^{-1} SST \cdot d^{-1}$)
UFSC	- Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 NITROGÊNIO E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	29
3.2 PROCESSOS BIOLÓGICOS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO	32
3.2.1 Processo convencional de nitrificação/desnitrificação	33
3.2.2 Processos de remoção de nitrogênio via nitrito	36
3.2.3 Processo SHARON	44
3.2.4 Processo ANAMMOX	45
3.2.5 Processo CANON	46
3.2.6 Processo OLAND.....	46
3.2.7 Processo NOx.....	47
3.3 FISH - <i>FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION</i>	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 INÓCULO	51
4.1.1 ETE Canasvieiras	51
4.1.2 ETE Insular	52
4.2 MEIO DE CULTIVO	52
4.3 EQUIPAMENTO UTILIZADO	53
4.4 SISTEMA EXPERIMENTAL	55
4.4.1 Processo de seleção por lavagem (<i>wash out</i>)	56
4.4.2 Ensaio cinéticos	58
4.4.3 Ensaio cinéticos com lodo não lavado	59
4.4.4 Ensaio stripping amônia.....	60
4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	60
4.5.1 Determinação de amônio.....	60
4.5.2 Determinação de nitrito	61
4.5.3 Determinação de nitrato	61
4.5.4 Determinação dos sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis (SST e SSV).....	62
4.5.5 Cálculo da remoção de nitrogênio a partir dos dados analíticos ..	62
4.6 DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE RESPIRAÇÃO DA BIOMASSA	63
4.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	64

4.7.1 FISH (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>).....	64
4.7.2 Microscopia óptica.....	66
4.8 RESUMO DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS REALIZADOS.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 TESTES DE ELIMINAÇÃO DE AMÔNIA SEM A PRESENÇA DE MICROORGANISMOS (<i>STRIPPING</i>).....	69
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	72
5.2.1 Ensaio abril/2009	72
5.2.2 Ensaio julho/2009	76
5.2.3 Ensaio Agosto/2009	81
5.2.4 Ensaio setembro/2009	86
5.2.5 Ensaio de Outubro/2009.....	91
5.2.6 Ensaio de Janeiro/2010	95
5.2.7 Ensaio de Março/2010.....	101
5.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	107
5.3.1 Análise microscópica por hibridização (FISH).....	107
5.3.2 Microscopia ótica.....	110
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
6 CONCLUSÕES.....	119
7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	121
REFERÊNCIAS.....	123
APÊNDICES	131
APÊNDICE A - ENSAIO ABRIL/2009.....	131
APÊNDICE B - ENSAIO JULHO/2009.	133
APÊNDICE C - ENSAIO AGOSTO/2009	136
APÊNDICE D - ENSAIO SETEMBRO/2009.....	139
APÊNDICE E - ENSAIO OUTUBRO/2009.	142
APÊNDICE F - ENSAIOS JANEIRO/2010 - ENSAIO COM LAVAGEM DO LODO	145
APÊNDICE G - ENSAIO SEM LAVAGEM DO LODO.....	147
APÊNDICE H - ENSAIOS MARÇO/2010.....	149

1 INTRODUÇÃO

As atividades humanas têm alterado significativamente o ciclo do nitrogênio na Terra, com efeitos deletérios pronunciados, tanto sobre a saúde dos seres humanos, quanto sobre o equilíbrio biológico dos ecossistemas naturais.

Os compostos nitrogenados são importantes poluentes em efluentes devido ao seu papel na eutrofização de mananciais, seu efeito sobre a concentração de oxigênio nos corpos receptores e sua toxicidade sobre os invertebrados aquáticos e espécies vertebradas, inclusive humanos (PAREDES *et al.*, 2007).

Dentre as implicações ecológicas da inserção de elevadas cargas de amônio no ambiente está o consumo do oxigênio dissolvido no meio, devido ao processo de nitrificação, uma vez que para oxidar 1mg de NH_4^+ são necessários cerca de 4,3 mg de O_2 , podendo ocasionar a morte dos organismos aquáticos. Além disso, o nitrogênio residual descartado nos cursos d'água estimula a atividade autotrófica, ocasionando a eutrofização devido a produção de uma grande quantidade de biomassa na forma de algas.

O material nitrogenado presente nas águas residuárias, pode apresentar-se tanto na forma orgânica quanto na inorgânica. Na inorgânica, é principalmente representado pelo amônio, nas formas amônia livre (NH_3) e ionizada (NH_4^+), pelo nitrito (NO_2^-) e pelo nitrato (NO_3^-). Já na forma orgânica, uréia, aminoácidos e outras substâncias com o grupo amino apresentam-se em maiores proporções.

Nas últimas décadas, tem aumentado a consciência de que a remoção de nutrientes das águas residuárias, contribui para a preservação da qualidade de ecossistemas aquáticos receptores de efluentes de sistemas de tratamento, o que também acaba por ser uma questão de saúde pública, estando diretamente ligado à qualidade de vida.

A remoção de nitrogênio de efluentes pode dar-se por processos físico-químicos ou biológicos, mas por razões econômicas, as aplicações de processos biológicos vêm crescendo cada vez mais, porque além de serem extremamente vantajosos economicamente, são muitas vezes mais eficientes (FARIAS, 2000; METCALF; EDDY, 1991).

A utilização dos processos convencionais de nitrificação e desnitrificação torna-se limitada quando se deseja tratar resíduos contendo elevadas concentrações de nitrogênio e baixa Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), ou seja, com baixa relação

DBO/nitrogênio como, por exemplo, efluentes de biodigestão de lodos, percolados de aterro e efluentes agro-industriais pré-tratados. As principais limitações, neste caso específico, residem na dificuldade de transferência de altas quantidades de oxigênio necessárias à nitrificação, bem como na necessidade de grande quantidade de matéria orgânica biodegradável na etapa de desnitrificação.

Atualmente os processos de remoção biológica de efluentes visam uma redução de custos, bem como um aumento da eficiência, otimizando as estratégias de tratamento usuais, ou buscando implementar novos processos com microrganismos capazes de converter nitrogênio na forma amoniacal e nitrito em nitrogênio gasoso.

As estratégias de remoção via nitrito têm encontrado cada vez mais espaço como alternativas de tratamento, uma vez que levam a economia tanto na aeração quanto a necessidade de fontes orgânicas de fornecimento de carbono.

O grande desafio destes processos é a seleção dos microrganismos com os quais se deseja trabalhar, as bactérias oxidadoras de amônio (BOA), em detrimento daqueles indesejáveis, as Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON), uma vez que estes últimos interferem de forma negativa no acúmulo do nitrito, já que oxidam este a nitrato.

Neste sentido têm sido estudadas diversas estratégias, entre as quais, a limitação de oxigênio e o processo de lavagem do lodo, aliados a altas temperaturas de operação têm se mostrado bastante eficientes.

Leitão *et al.* (2007) trabalhando com um lodo não adaptado previamente, apenas submetido ao processo de lavagem, obteve velocidades específicas de oxidação de amônio da ordem de $5,4\text{g N-NH}_4.\text{g}^{-1}\text{SST.d}^{-1}$, chegando a mais de 35% de remoção de nitrogênio em processo autotrófico e aeróbico.

Este trabalho propõe a seleção de BOA, através da lavagem de um lodo heterogêneo coletado em sistema de tratamento de esgoto doméstico, para posteriormente verificar a efetividade da conversão de amônio em nitrito em elevadas velocidades de processo, além de verificar a eficiência desta biomassa na remoção de nitrogênio em um sistema SBR, sem limitação do fornecimento de oxigênio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Propor uma forma de seleção dos microrganismos de interesse partindo de uma biomassa heterogênea e verificar o comportamento desta biomassa na remoção de altas concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₄).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar em que circunstâncias relacionadas a diferentes valores de pH poderia ocorrer a perda de amônia por *stripping*.
- Testar a eficiência da lavagem enquanto procedimento para partida de um processo de nitrificação parcial.
- Estabelecer uma flora de microrganismos nitrificantes, partindo de uma cultura mista, visando sua utilização em ensaios de atividade nitrificante.
- Estabelecer o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas partindo de um lodo não adaptado previamente.
- Verificar a influência da relação S_0/X_0 no processo estabelecido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 NITROGÊNIO E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

O nitrogênio (N) é um elemento químico indispensável no crescimento de organismos vivos no geral, uma vez que é de suma importância na composição de uma vasta gama de moléculas orgânicas, como proteínas e ácidos nucleicos, que são essenciais aos seres vivos (HAGOPIAN; RILEY, 1998). Uma bactéria viva contém cerca de 12% de nitrogênio em relação a sua matéria seca (MADIGAN *et al.*, 1997). Desta forma, o nitrogênio atua como um dos principais fatores limitantes à vida, participando de processos primários na dinâmica dos ecossistemas.

O nitrogênio molecular presente na atmosfera e dissolvido no oceano, representa a maior parte do nitrogênio existente na Terra. Este nitrogênio torna-se reativo e biologicamente viável para plantas e algas somente através do processo de fixação biológica, reações químicas desencadeadas por descargas elétricas na atmosfera ou atividade vulcânica. A incorporação à cadeia alimentar é feita por um número limitado de organismos, como bactérias e cianobactérias, através da conversão do N₂ em sais de amônio.

A partir da possibilidade de isolamento de novas espécies bacterianas, de numerosas interações entre comunidades microbianas e de interferências entre as rotas metabólicas, o ciclo do nitrogênio passou a ser visto como muito mais complexo do que se imaginava (VERSTRAETE; PHILIPS, 1998).

Embora possua diversos estados de oxidação, o nitrogênio é encontrado sob quatro formas principais em águas residuárias: nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato (METCALF; EDDY, 2003).

A reciclagem de nitrogênio na célula envolve em grande parte as formas mais disponíveis como amônia e nitrato, porém como o grande reservatório de nitrogênio está na forma de N₂, é de fundamental importância o estudo da habilidade dos organismos em utilizar o nitrogênio nesta forma (HENZE *et al.*, 1997).

O estado de oxidação do nitrogênio pode variar de ⁻³ (na forma de amônia e compostos orgânicos) a ⁺⁵ (na forma de nitratos), conforme apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Estados de oxidação do nitrogênio, em diferentes compostos.

Compostos	Estado de oxidação
Nitrogênio orgânico (R-NH ₂)	-3
Amônia (NH ₃)	-3
Nitrogênio Gasoso (N ₂)	0
Oxido Nitroso (N ₂ O)	+1
Oxido Nítrico (NO)	+2
Íon Nitrito (NO ₂ ⁻)	+3
Dióxido de nitrogênio (NO ₂)	+4
Íon nitrato (NO ₃ ⁻)	+5

Fonte: Madigan *et al.*, (1997).

A utilização das formas nitrogenadas como nutrientes promove o fenômeno conhecido como eutrofização, a qual consiste no crescimento excessivo das plantas aquáticas a tais níveis que sejam causadas interferências relativas aos usos desejáveis do corpo d'água. Problemas com odores e aparência da água devido à decomposição das algas a tornam esteticamente desagradável, causando subseqüentes interferências ao uso do curso d'água como suprimento e recreação.

Os processos bioquímicos de oxidação do amônio a nitrito e deste para nitrato implicam em consumo de oxigênio dissolvido do meio, o que pode afetar a vida aquática quando a oxigenação do ambiente é menor que o consumo por esses processos, levando a mortandade da fauna, inclusive (VON SPERLING, 1996).

Dentre os efluentes industriais com alta concentração de nitrogênio podem-se citar aqueles provenientes da produção de fertilizantes, do processamento de produtos protéicos em geral, de refinarias de petróleo, fábricas de fibra sintética e indústrias químicas (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, 1991).

Os dejetos provenientes da criação de animais para abate também contribuem como fonte de nitrogênio. Nas águas residuárias provenientes do manejo de suínos, por exemplo, 90 % do nitrogênio total dissolvido, provêm da degradação da matéria orgânica e se encontra na forma de amônia (LIAO *et al.*, 1995).

A relativa concentração de diferentes formas de nitrogênio pode ser um indicativo do estágio de poluição ocasionada pelo descarte de efluentes e ainda da eficiente depuração destes pela própria natureza do corpo receptor (METCALF; EDDY, 2003).

Das diversas formas de nitrogênio presentes no solo, a amônia (NH₃) e em especial o nitrato (NO₃) são aquelas que irão causar mais

efetivamente a perda de qualidade da água dos mananciais próximos. Embora a amônia estando presente na água seja altamente letal aos peixes pela toxicidade que representa para este grupo da fauna, quando originadas no solo ou aplicada via fertilizantes, essa molécula tende a ser convertida a amônio (NH_4) e este por sua vez é convertido a nitrato, por processos microbianos (RESENDE, 2002).

O nitrato é considerada a principal forma de nitrogênio associada à contaminação da água pelas atividades agropecuárias. Isto ocorre pelo fato de que o ânion nitrato, caracterizado por ser fracamente retido no solo, tende a permanecer mais em solução, principalmente nas camadas superficiais do solo onde a matéria orgânica acentua o caráter eletronegativo das partículas do solo (repelindo o nitrato). Em solução o nitrato é muito propenso ao processo de lixiviação e ao longo do tempo pode haver considerável incremento nos teores de nitrato nas águas profundas (RESENDE, 2002).

Na Figura 3.1 estão representadas as transformações dos compostos nitrogenados no ciclo do nitrogênio, resultantes do metabolismo microbiano nos processos de fixação, nitrificação, desnitrificação, oxidação anaeróbica do amônio via nitrito e redução desassimilatória do nitrato.

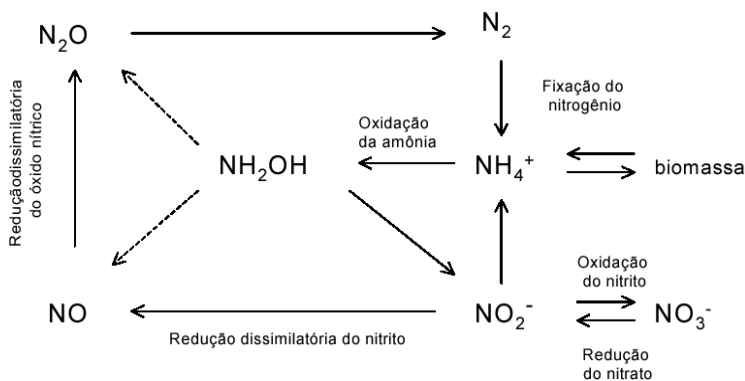


Figura 3.1 - Representação esquemática das reações envolvidas no ciclo do nitrogênio.

Fonte: Ye & Thomas (2001).

O ciclo do nitrogênio, aqui apresentado de forma resumida, tem sido extensiva e periodicamente revisto durante os últimos anos. Verstraete & Philips (1998) sugerem que este ciclo seja muito mais complexo do que se imaginava, devido a novas espécies bacterianas

isoladas, numerosas interações entre comunidades microbianas e interferências entre as rotas metabólicas.

A adaptação e sobrevivência de microrganismos no que se refere à grande variedade de fatores ambientais a que são expostos, depende da capacidade de desenvolverem caminhos alternativos para a obtenção de energia. As vias metabólicas envolvidas no ciclo do nitrogênio inorgânico são realizadas por microrganismos bastante discutidos na literatura e, também, por alguns desconhecidos até o momento (YE; THOMAS, 2001).

A eliminação do nitrogênio se faz altamente necessária hoje, a fim de evitar fenômenos de poluição continuada, além disso, o enquadramento das emissões dentro dos padrões estabelecidos pelos órgãos ambientais vem sendo cobrado mais rigorosamente.

Em termos de legislação, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução no357 de 17 de março de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e dá diretrizes ambientais para os eu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, determina como limite para o lançamento de nitrogênio amoniacal total, concentração inferior a 20 mg N.L⁻¹.

No Estado de Santa Catarina, a legislação ambiental, através do Decreto No. 4.250 de 5 de junho de 1981 - Art. 19º, estipula o limite máximo para nitrogênio total em 10mg N.L⁻¹ para lançamentos em trechos de corpos de água contribuintes de lagoas, lagunas e estuários.

3.2 PROCESSOS BIOLÓGICOS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

Os compostos nitrogenados podem ser removidos de efluentes por intermédio de tratamentos químicos, físicos ou biológicos. Os processos biológicos de remoção de nitrogênio apresentam-se relativamente simples e eficazes, além de fácil projeto, quando comparados a métodos físico-químicos. Desta forma, têm encontrando crescentes aplicações, mesmo sob condições adversas, e vêm substituindo os processos físico-químicos, apresentando, inclusive, vantagens econômicas em relação aos demais (FERREIRA, 2000).

Basicamente, qualquer tratamento biológico para eliminação de nitrogênio consiste em levá-lo a nitrogênio gasoso, o qual é emitido para a atmosfera sem danos ao meio ambiente.

3.2.1 Processo convencional de Nitrificação/Desnitrificação

Por muitos anos o método mais tradicional para remoção de nitrogênio de efluentes tem sido a combinação dos processos de nitrificação-desnitrificação (PAREDES *et al.*, 2007).

A nitrificação envolve dois grupos de bactérias autotróficas filogeneticamente relacionados: as bactérias que oxidam a amônia (predominantemente *Nitrosomonas sp* e *Nitrosospira sp* e as bactérias que oxidam o nitrito (*Nitrobacter sp* e *Nitrospira sp*, em sua maioria). Quase todas as bactérias nitrificantes são, obrigatoriamente, quimiolitototróficas, ou seja, obtêm todo carbono necessário às funções vitais a partir do CO₂ (PHILIPS *et al.*, 2002).

A segunda etapa do processo de remoção biológica do nitrogênio é a desnitrificação. Nesta etapa, bactérias heterotróficas facultativas reduzem NO₃⁻ a N₂, utilizando uma fonte orgânica de carbono.

Tendo em vista as características biológicas distintas destas duas etapas é comum examiná-las separadamente.

Nitrificação

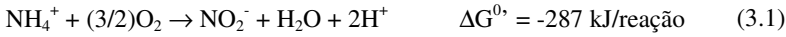
Nesta etapa autotrófica, o oxigênio funciona como substância que aceita os elétrons transportados na cadeia respiratória, permitindo a reoxidação das coenzimas e a geração de ATP, de forma que o amônio, a forma reduzida de nitrogênio, é oxidado a nitrato, via nitrito, sendo esta a etapa denominada de nitrificação (MADIGAN *et al.*, 1997).

Segundo Henze *et al.*, (1997) a oxidação do NH₃ a NO₂⁻ é a etapa limitante do processo, pois a velocidade da reação é relativamente mais lenta que a velocidade de oxidação do nitrito. Em processos convencionais, o NO₂⁻ somente aparecerá em concentrações elevadas (maiores que 1mg N.L⁻¹) quando o processo considerado se encontrar em estado transiente, motivado por variação de cargas, partida e arraste de biomassa, ou outros problemas operacionais.

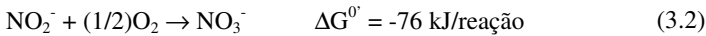
Os microrganismos participantes do processo são autotróficos, ou seja, utilizam o CO₂ como fonte de carbono ou, ainda, quimiolitototróficos, pois oxidam compostos inorgânicos como doadores de elétrons para cadeia respiratória, para a obtenção de energia (MADIGAN *et al.*, 1997).

Apesar do produto da nitrificação ser reconhecidamente o nitrato, este processo é realizado em duas etapas. Numa primeira etapa, bactérias oxidadoras de amônio (BOA), sendo o gênero mais comum as

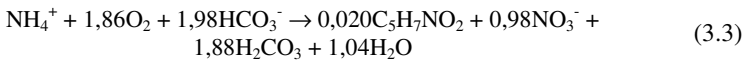
Nitrosomonas, são responsáveis pela oxidação do amônio em nitrito tendo a hidroxilamina como intermediário. Conforme pode ser verificado na Equação 3.1:



Numa segunda etapa, as bactérias oxidadoras de nitrito, sendo o gênero mais conhecido o *Nitrobacter*, hidrolisam o nitrito levando-o finalmente o nitrato, conforme a Equação 3.2. Assim como no caso das BOA, existem outros gêneros bastante freqüentes na oxidação do nitrito, como *Nitrospira* (SCHMIDT *et al.*, 2001).



Como reação global, incorporando o crescimento celular, nos termos propostos por Henze *et al.* (1997), pode-se observar a Equação 3.3:



O consumo de oxigênio durante as reações é de 3,24 mgO₂.mg⁻¹N-NH₄oxidado a nitrito, e 1,01 mgO₂.mg⁻¹N-NO₂oxidado a nitrato, portanto, para a nitrificação completa esta relação é de 4,25 mgO₂.mg⁻¹N-NH₄. Além disto, o fator de conversão de substrato em células é de 0,14mg células. mg⁻¹N-NH₄oxidado e de, 0,02mg células.mg⁻¹N-NO₂oxidado.

A nitritação, como é freqüentemente chamada a primeira etapa da nitrificação, gera íons H⁺ que podem diminuir o pH do meio, caso o efluente não contenha alcalinidade em quantidade suficiente para tamponar a ação destes íons (PHILIPS, 2007).

A reação de nitrificação encontra suas condições ótimas num pH em torno de 7,5 e temperatura entre 28 e 36°C. Sob estas condições, a velocidade específica de crescimento para o *Nitrosomonas*, está entre 0,6 e 0,8 d⁻¹, enquanto para o *Nitrobacter* pode-se esperar velocidade em torno de 0,6 e 1,0 d⁻¹, o que indica baixas velocidades específicas de crescimento (HENZE *et al.*, 1997).

Hoje, sabe-se que vários outros gêneros de BOA, como, por exemplo, *Nitrosolobus* e *Nitrosospira* são capazes de oxidar o amônio a nitrito prevalecendo um ou outro gênero de acordo com as condições ambientais impostas aos microrganismos (SCHMIDT *et al.*, 2001).

Um aspecto importante da nitrificação é o baixo crescimento celular característico de bactérias autotróficas, uma vez que a incorporação do carbono inorgânico demanda grande quantidade de energia e a oxidação do amônio e nitrito gera baixa quantidade de energia, o saldo energético para estas bactérias é pequeno (FERRETI, 2009).

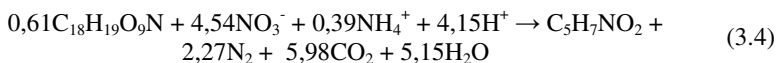
Tais características do processo de nitrificação tornam propício o uso de reatores com reciclo total ou parcial de células visando aumentar as velocidades de conversão dos substratos.

Desnitrificação

Nesta etapa o nitrato gerado na nitrificação ainda pode ser utilizado por microrganismos como receptor de elétrons provenientes de um material orgânico, passando a forma de gás N_2 . A reação tem o óxido nítrico (NO) e o óxido nitroso (N_2O), como possíveis intermediários, igualmente lançados na atmosfera, porém em quantidades normalmente muito baixas.

As bactérias envolvidas na desnitrificação são heterotróficas facultativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*, *Bacillus*.

O material orgânico necessário pode ser adicionado artificialmente, como metanol, etanol, acetato e outros, ou disponível internamente no próprio processo (VON SPERLING, 1997; MADIGAN *et al.*, 1997). A estequiometria a seguir representa a etapa da desnitrificação.



Segundo Metcalf e Eddy (2003), a desnitrificação ocorre em temperaturas na faixa de 10 a 30°C e pH na faixa de 6,5 a 8,0.

Ao contrário da nitrificação, que consome alcalinidade, a desnitrificação produz alcalinidade na proporção de 1 equivalente grama de alcalinidade por mol de N (HENZE *et al.*, 1997).

A presença de oxigênio pode inibir a desnitrificação de maneira reversível. Em condições com altas concentrações de oxigênio dissolvido, a biomassa tem preferência pelo uso do oxigênio para respirar por se tornar energeticamente mais favorável. O efeito inibitório por oxigênio tem sido observado para concentrações abaixo de 0,13 $mgO_2.L^{-1}$ (ORHON; ARTAN, 1994). Teoricamente recomenda-se um

nível máximo de 0,2 a 0,3 mgO₂.L⁻¹, acima deste valor a desnitrificação é reduzida significativamente (Van HAANDEL; MARAIS, 1999).

Atualmente os sistemas que operam mediante o processo de nitrificação e desnitrificação encontram-se bem desenvolvidos e amplamente utilizados. O sistema de lodos ativados é comumente utilizado no processo de nitrificação e desnitrificação para o tratamento de efluentes com baixas cargas de nitrogênio, como é o caso de esgotos domésticos (FERRETI, 2009).

3.2.2 Processos de remoção de nitrogênio via nitrito

Muitas vezes o processo tradicional de nitrificação/desnitrificação encontra barreiras em sua aplicação, como limitação de espaço e questões econômicas, além do desafio quando se trata de efluentes com altas concentrações de amônio (PAREDES *et al.*, 2007). A descoberta recente de novos microrganismos e novas rotas metabólicas vem sendo encarada como a principal solução para os problemas recorrentes.

As vias metabólicas envolvidas no ciclo do nitrogênio inorgânico têm sido conduzidas tanto por microrganismos amplamente descritos na literatura, bem como por alguns ainda pouco conhecidos. Os possíveis caminhos para obtenção de energia e as enzimas envolvidas, estão relacionadas com a adaptação e sobrevivência destes microrganismos sob uma variedade de condições ambientais (YE; THOMAS, 2001).

Recentemente o foco de atenção vem sendo os processos que lançam mão da nitrificação parcial, desnitrificação por nitrificantes, oxidação anaeróbia da amônia (processo Anammox) e ainda de sistemas com a combinação destes, devido aos diversos benefícios em relação ao processo convencional (AHN 2006).

Processos como SHARON, OLAND e CANON, são baseados na nitrificação parcial até nitrito e desnitrificação de nitrito para nitrogênio gasoso, o que implica em altas concentrações de nitrito no meio. Nestes casos, precauções especiais devem ser tomadas devido ao risco de perdas de nitrito para o ambiente via efluente, pois, devido a sua toxicidade, pode trazer prejuízos para as plantas, fauna aquática, microrganismos nitrificantes e até mesmo para saúde humana (PHILIPS; VERSTRAETE, 2001).

Através de combinações entre processos, foram desenvolvidos novos sistemas de tratamento, de modo a atender melhor o tratamento de efluentes com características bem peculiares, como efluentes com altas cargas nitrogenadas e baixas relações C/N. De um modo geral, tais

sistemas baseiam-se na nitrificação parcial (SCHMIDT *et al.*, 2003, AHN, 2006, PAREDES *et al.*, 2007).

Uma vez que o nitrito é um intermediário das reações de nitrificação e desnitrificação, a nitrificação parcial trás um “encurtamento” no processo tradicional, uma vez que a oxidação do amônio pára no nitrito, não chegando a nitrato, como é possível de se visualizar na Figura 3.2:

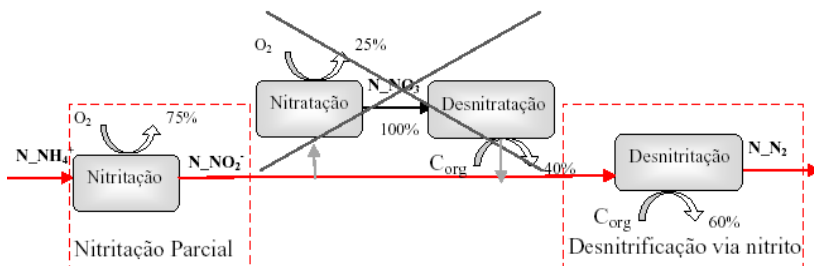


Figura 3.2 - Remoção de nitrogênio via nitrito.

Fonte: Ferreti (2009).

A remoção de nitrogênio via nitrito possibilita tornar os processos da nitrificação e desnitrificação mais econômicos. (PHILIPS *et al.*, 2002). É possível se chegar a uma economia de 25% da aeração necessária e até 40% de redução da quantidade de matéria orgânica requerida numa posterior desnitrificação heterotrófica (BLACKBURNE *et al.*, 2008).

A oxidação anaeróbica do íon amônio via nitrito, está entre as possibilidades mais recentemente discutidas. Baseia-se na capacidade do metabolismo microbiano para converter amônio em nitrogênio gasoso na ausência de oxigênio e de matéria orgânica. As atividades microbianas de oxidação anaeróbica do amônio e desnitrificação são os principais mecanismos na conversão de nitrogênio combinado a nitrogênio gasoso, completando o ciclo do nitrogênio (YE; THOMAS, 2001).

Bodelier *et al.* (1996) já vinham sinalizando para a capacidade das BOA de manterem-se ativas, em condições desfavoráveis, obtendo energia para a sua manutenção de metabolismos secundários. O gênero *Nitrosomonas* têm sido encontrado constantemente em diferentes tipos de lodos de biorreatores, aplicados aos novos processos de eliminação de nitrogênio, mesmo alguns operados sob condições anóxicas (VERSTRAETE; PHILIPS, 1998; UEMOTO; SAIKI, 2000).

O processo SHARON, por exemplo, é conduzido basicamente pela espécie *Nitrosomonas eutropha*. Esta proteobactéria é uma das que tem a maior capacidade desnitrificante entre as nitrificantes e é a maior responsável pelo processo NO_x (SCHMIDT *et al.*, 2003).

Estes processos se fundamentam na possibilidade de se separar ou selecionar as bactérias oxidadoras de amônio (BOA) em detrimento das oxidadoras de nitrito (BON). Na literatura atual são reportadas algumas possibilidades para se fazer esta seleção, sendo sumarizadas por Yoo *et al.*, (1999). Diferenças na energia de ativação, idade do lodo, afinidades com oxigênio e sensibilidade a compostos tóxicos existentes são algumas dessas características que possibilitam a diferenciação entre os grupos de microrganismos (PENG; ZHU, 2006).

A chave para se obter sucesso na remoção via nitrito, está na obtenção de um sistema que opere estável na geração apenas do nitrito. Assim, o controle da nitrificação parcial é realizado, basicamente, pela temperatura, concentração de OD, TRH, idade do lodo, pH e concentração de substrato.

Diversos fatores ambientais exercem influência sobre a atividade dos microrganismos nitrificantes. Dentre os fatores mais significativos pode-se citar a temperatura, a concentração de oxigênio, o pH e a presença de inibidores (ORHON; ARTAN, 1994).

Temperatura

A temperatura exerce forte influência nas velocidades de nitrificação, interferindo na cinética das reações das bactérias nitrificantes. A alteração que provoca na conformação estrutural de enzimas, promove interferências em funções básicas dos microrganismos e ainda afeta a velocidade difusiva de substrato nas células. Grady *et al.* (1980) e Henze *et al.* (1997) relatam que a nitrificação pode ocorrer entre temperaturas de 5 e 50°C.

A Figura 3.3 mostra dados de velocidades específicas máximas de crescimento para *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* em função da temperatura e dos máximos valores das vazões específicas de alimentação em testes de lavagem de células em reator contínuo sem reciclo de células. Para temperaturas superiores a 25°C os dados permitem avaliar uma maior atividade do *Nitrosomonas* em relação ao *Nitrobacter*, o que permite imaginar uma maior possibilidade de acúmulo de nitrito do que em temperaturas mais baixas (VERSTRAETE; PHILIPS, 1998).

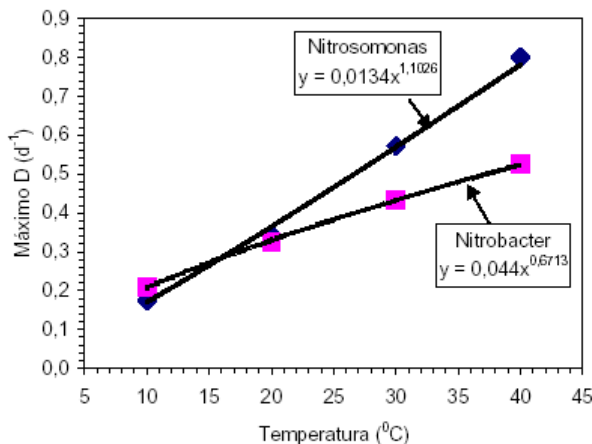


Figura 3.3 - Influência da temperatura e da máxima vazão específica de alimentação, em reator contínuo submetido à lavagem de células.

Fonte: Zdradek, (2005).

pH e substrato

A presença de íons OH^- ou H^+ pode afetar as enzimas envolvidas no metabolismo das bactérias, bloqueando o sítio ativo de forma reversível e causando certa inibição. (PAREDES *et al.*, 2007). Em baixos valores de pH, o CO_2 pode ser removido do sistema por *stripping*, gerando uma deficiência de carbono inorgânico para as autotróficas.

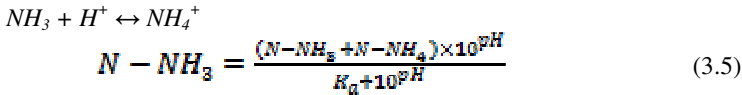
O controle do pH do sistema vem a ser uma das possibilidades para selecionar as bactérias oxidadoras de amônio, já que a concentração de amônia no efluente é dependente do pH do meio. À medida que o pH do meio se eleva, o equilíbrio da reação do amônio em solução é deslocado para a amônia livre (NH_3), sendo esta inibitória tanto para as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) como as bactérias oxidadoras de nitrito (BON), porém as bactérias, principalmente as do gênero *Nitrobacter* parecem ser mais sensíveis a este ocomposto (SCHMIDELL; REGINATTO, 2005).

Os valores ótimos de pH para o *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* se encontram na faixa de 5 a 9, apresentando faixa ótima entre 6,5 e 8,6. O valor de pH influencia na concentração do íon amônio, afetando a nitrificação. De acordo com Epa (1993), valores de pH abaixo de 7,0 e acima de 9,8 reduzem a velocidade de nitrificação em cerca de 50%.

Em valores de pH inferiores a 6,5 a nitrificação praticamente pára, pela falta da amônia livre e alta da concentração de ácido nitroso. Deve-se lembrar que a amônia é também a substância tóxica da nitrificação, o que limita um aumento de pH a valores superiores a 8,5, por acarretarem um aumento considerável desta amônia, causando inibição ao sistema, além de ocasionar “stripping” de amônia (HELLINGA *et al.*, 1998; WIESMANN, 1994).

Conforme também foi observado na Figura 3.3, a temperatura influencia neste equilíbrio, sendo que, o aumento de temperatura favorece a formação de amônia. Este efeito da concentração de amônio, pH e temperatura é descrito pelas seguintes equações (ANTHONISEN *et al.*, 1976; WIESMANN, 1994):

- Equilíbrio amônio/ amônia livre:



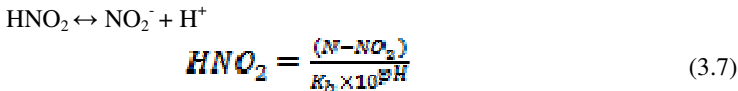
Em que, a constante de equilíbrio K_a é dada por:

$$K_a = \frac{6144}{e^{273+T}} \quad (3.6)$$

sendo,

T = temperatura em graus Celsius.

Equilíbrio nitrito/ácido nitroso:



Em que a constante de equilíbrio K_b é dada pela Equação 3. :

$$K_b = \frac{-2200}{e^{273+T}} \quad (3.8)$$

sendo,

T = temperatura em graus Celsius.

O sistema biológico que promove a nitrificação é intensamente afetado pela concentração de ácido nitroso. Para valores de pH entre 7 e

8 a porcentagem de ácido nitroso é praticamente nula. Entretanto, para valores inferiores a 7 e, em particular, para valores abaixo de 6, esta concentração aumenta, o que provoca grande inibição (ZDRADEK, 2005).

A partir das Equações 3.5 e 3.7 é possível calcular as quantidades de amônia livre e ácido nitroso livre para distintos valores de pH e distintas temperaturas conforme pode ser verificado na Figura 3.4 onde pode-se perceber que, no intervalo de valores de pH entre 7 e 8 a porcentagem de ácido nitroso é praticamente nula, havendo o crescimento desta porcentagem para valores de pH abaixo de 7 e, em particular, para valores abaixo de 6, o que pode provocar uma intensa inibição do sistema biológico (SCHMIDELL; REGINATTO, 2005).

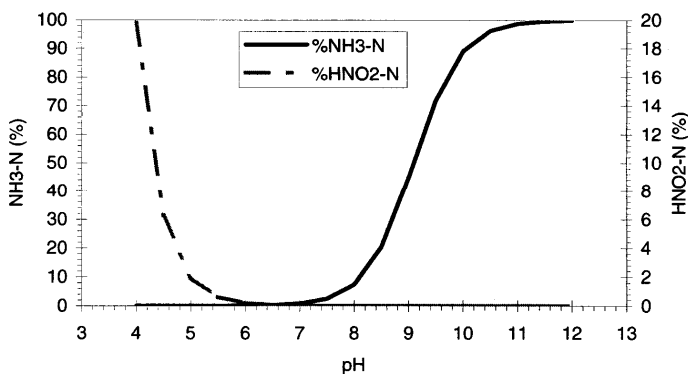


Figura 3.4 - Percentagem de amônia livre como N (em relação ao total de N presente) e percentagem de ácido nitroso como N, em relação à quantidade de nitrito presente.

Fonte: Schmidell & Reginatto, (2005).

A amônia livre atua como inibidor da atividade da nitrito oxidoreductase, enzima localizada na membrana celular das BON. Essa característica torna esse grupo de bactérias mais sensíveis a este composto, em teoria, concentrações relativamente baixas seriam suficientes para promover sua inibição (YANG; ALLEMAN, 1992 *apud* YOO *et al.*, 1999).

Esta relação entre amônia livre (NH_3) e amônia ionizada (NH_4^+) e sua dependência do pH e da temperatura, estão expostas na Figura 3.5. Para valores de pH em torno de 7, apenas íons amônio estão presentes em solução; para pH em torno de 12 apenas amônia na forma livre está presente como gás dissolvido em solução, para valores de pH entre 7 e 12 estão presentes tanto íons amônio (NH_4^+) quanto amônia gasosa (NH_3) (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, 1991).

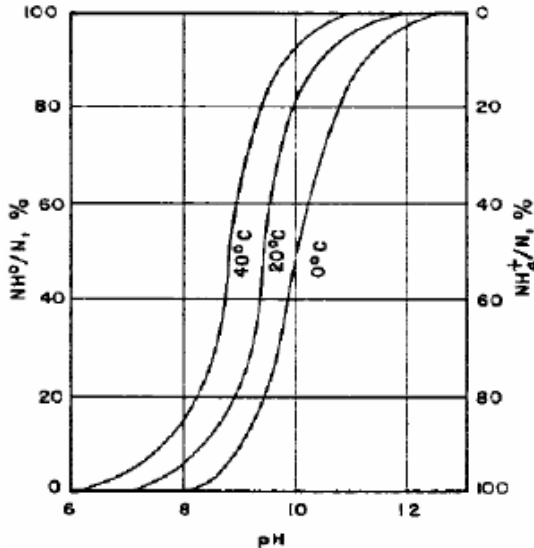


Figura 3.5 - Distribuição da amônia e do íon amônio em função do pH e da temperatura.

Fonte: *Water Pollution Control Federation*, (1991).

Oxigênio Dissolvido

Na literatura, a limitação do oxigênio dissolvido está entre uma das ferramentas mais utilizadas para imprimir condições limitantes ao crescimento das BON, uma vez que sua velocidade específica de respiração celular é bastante limitada.

As BOA e BON possuem diferentes constantes de afinidade pelo oxigênio (K_O) e, deste modo. Concentrações mais baixas de oxigênio dissolvido devem influenciar mais as BON do que as BOA.

De acordo com Pollice *et al.* (2002), a seleção das oxidadoras de amônio em sistemas com alternância de períodos aerados e não aerados é dada pela maior sensibilidade das bactérias oxidadoras de nitrito (gênero *Nitrobacter*) na ausência de oxigênio dissolvido. Deste modo, as bactérias oxidadoras de amônio apresentam uma vantagem na competição em quantidades limitadas de oxigênio e prevalecem em operações transientes por agüentarem melhor as flutuações na concentração de OD

Laanbrok *et al.* (1993), trabalhando com cultura mista de *Nitrosomonas europea* e *Nitrobacter hamburgensis*, demonstraram que

períodos de interrupção na aeração também podem ocasionar o acúmulo de nitrito, mesmo estando o oxigênio em concentrações próximas a 80% da saturação nos períodos aeróbios.

Shrestha *et al.* (2001), ao trabalharem com limitação de oxigênio dissolvido chegaram a 22% de conversão de amônio a N_2 e concluíram que uma baixa pressão parcial do oxigênio assim como condições de ausência desta substância são favoráveis para uma alta produção de nitrogênio gasoso.

É importante salientar que, sendo o oxigênio um co-substrato da nitrificação, sua limitação em termos de níveis de oxigênio dissolvido (OD) pode afetar significativamente a atividade das oxidadoras de amônio. Jianlong e Ning (2004) mostrou que a redução do oxigênio de $1,5 \text{ mgO}_2.L^{-1}$ para $0,5 \text{ mgO}_2.L^{-1}$ foi suficiente para reduzir em 50% a velocidade de consumo de amônio.

Lavagem (wash out)

A aplicação de processos contínuos, sem retenção de biomassa e com altas vazões de alimentação no intuito de garantir a proliferação de um determinado tipo de microrganismo em detrimento de outro é uma técnica já conhecida e estabelecida no processo SHARON.

Hellinga *et al.* (1998), propôs que, para a seleção de bactérias oxidadoras de amônio, fosse utilizado um reator de mistura completa sem retenção de biomassa, operado com um tempo de retenção hidráulico de 1 dia, em uma temperatura entre 30 e 40°C.

Como as células geradoras de nitrato, possuem uma velocidade de crescimento inferior as geradoras de nitrito, quando submetidas a temperaturas relativamente altas, uma elevada vazão de alimentação promoveria a “lavagem” das geradoras de nitrato para fora do reator (MULDER; KEMPEN, 1997; VERSTRAETE; PHILIPS, 1998). De acordo com Wiessman (1994), a 20°C e pH=8,0 as bactérias oxidadoras de amônio teriam uma velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) de $0,77d^{-1}$, enquanto este valor para as oxidadoras de nitrito estaria em torno de $1,08d^{-1}$.

Kieling *et al.* (2004), testaram a lavagem do lodo como forma de seleção de biomassa específica para a partida do processo ANAMMOX e concluíram que este procedimento é efetivo o favorecimento dos microrganismos desejados permitindo a utilização de uma biomassa não especializada inicialmente como inóculo para a aplicação do processo desejado.

3.2.3 Processo SHARON

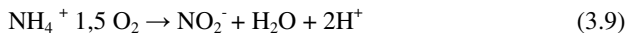
O processo SHARON (*Single reactor High Ammonia Removal over Nitrite*) trabalha com temperaturas em torno de 26°C e sem retenção de biomassa, ou seja, o TRH é exatamente igual ao tempo de retenção celular. O principal conceito deste processo também está na seleção competitiva entre os grupos de BOA e BON, sendo a remoção de nitrogênio diretamente dependente da taxa de crescimento celular dos microrganismos (PAREDES *et al.*, 2007).

A vazão específica de alimentação (D) é ajustada de tal forma que permita às oxidadoras de amônio crescer a uma taxa suficiente para permanecerem no reator, fator que, juntamente com a temperatura adotada se mostra desvantajoso para o outro grupo, das oxidadoras de nitrito.

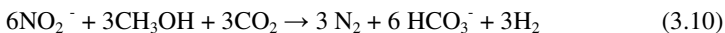
Mulder & Kempem (1997) propuseram intercalar períodos aerados com períodos sem aeração. Nos períodos aerados ocorreria um decréscimo do pH e a formação do nitrito, já em situação anóxica com adição de uma fonte externa de carbono, ocorreria a passagem do nitrito a nitrogênio gasoso, de forma a elevar o pH. Desta forma os períodos aerados e anóxicos eram definidos em função dos valores limites de pH estipulados previamente.

A estequiometria do processo, segundo Mulder & Kempem (1997) é representada pelas seguintes reações:

Nitritação



Desnitrificação



Uma proposta interessante que vem sendo estudada é a combinação dos processos SHARON-ANAMMOX. Um primeiro reator operaria em aerobiose e contaria com a ação das bactérias oxidadoras de amônio, para a geração de nitrito, não sendo necessária a completa conversão do amônio. O efluente deste reator contendo amônio e nitrito estaria em condições de ser introduzido num processo ANAMMOX, a fim de atingir o objetivo de eliminação do nitrogênio.

Esta combinação é um processo de tratamento de águas residuárias mais sustentável quando comparado ao convencional

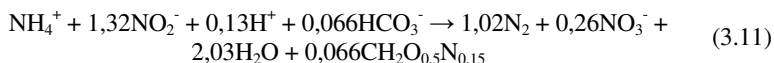
processo de remoção de nitrogênio, necessitando de 40 % a menos de oxigênio (economia de energia), não requerendo fonte externa de carbono além da produção de uma quantidade desprezível de biomassa (ZDRADEK, 2005).

3.2.4 Processo ANAMMOX

No processo ANAMMOX (*Anaerobic ammonium oxidation*) o amônio é oxidado a nitrogênio gasoso, em condições anóxicas e utilizando o nitrito como aceptor de elétrons. Sendo ainda um processo autotrófico, não necessita de adição de fontes extras de carbono orgânico. Devido a sua elevada eficiência de remoção, sua aplicação se viabiliza para efluentes com elevadas concentrações de nitrogênio.

Na literatura as bactérias ANAMMOX frequentemente mencionadas como *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua brodae*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Scalindua sorokinii* e *Candidatus Anammoxoblobus propionicus*. Estas espécies são quimiolitototróficas e possuem uma fisiologia muito peculiar (SCHMIDT *et al.*, 2001; 2003, JETTEN *et al.*, 2001).

A partir de uma possível rota metabólica para oxidação anaeróbia do amônio, proposta por van de Van Graaf *et al.* (1997), foram realizados alguns estudos visando a determinação de parâmetros estequiométricos da reação, utilizando-se um reator do tipo SBR, com eficiente retenção de biomassa (>90%). Desta maneira, foi proposta a estequiometria da oxidação anaeróbia do amônio, conforme a reação:



O processo ANAMMOX requer um controle bastante rígido das condições do sistema, uma vez que os microrganismos envolvidos apresentam grande sensibilidade. Segundo Jetten *et al.* (2001), concentrações de oxigênio acima de 0,06 mg.L⁻¹ e de nitrito acima de 230 mg.L⁻¹ promoveram inibição reversível do processo. STROUS *et al.* (1999), trabalhando em condições semelhantes o se depararam com inibição em concentrações de nitrito acima de 20mM, embora concentrações maiores que 10mM já sejam desfavoráveis.

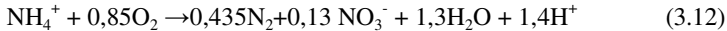
Cabe salientar também que, sendo o íon nitrito um substrato deste processo, que é estritamente anaeróbio, há a necessidade de utilização de

um pré-tratamento que converta parcialmente o amônio em nítrito (STROUS *et al.*, 1998; JETTEN *et al.*, 1999).

3.2.5 Processo CANON

O processo CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite*), como os outros processos citados anteriormente que estudam a possibilidade de eliminação de nitrogênio em um único reator, utiliza células autotróficas, objetivando uma redução nos custos de operação do processo. O processo vem sendo desenvolvido praticamente pelo mesmo grupo que apresentou a idéia do processo ANAMMOX.

Após as BOA oxidarem parcialmente o amônio a nítrito, em condições de limitação de oxigênio, bactérias capazes de oxidar anaerobiamente o amônio (ANAMMOX), convertem o nítrito produzido com parte do amônio remanescente em nitrogênio gasoso, sendo uma pequena fração de nítrato formado durante as reações. A estequiometria proposta para este processo é:



3.2.6 Processo OLAND

Este processo é baseado ação das bactérias nitrificantes, em eliminar o nitrogênio diretamente da amônia sob condições de limitação de oxigênio. Segundo VESTRAETE; PHILIPS (1998).

Jetten *et al.* (1999), observaram que culturas puras de *Nitrosomonas eutropha* utilizando hidrogênio molecular como doador de elétrons para a redução do nítrito, promoveram a geração de N_2 e N_2O como produtos finais.

De acordo com a rota metabólica proposta, apresentada na Figura 3.6, inicialmente ocorre a oxidação da amônia a hidroxilamina, sendo esta reação dependente de oxigênio. Subseqüentemente, ocorre a oxidação da hidroxilamina a nítrito, a qual é catalisada pela enzima hidroxilamina oxirredutase. O autor reporta o fato das *Nitrosomonas* adaptarem-se à limitação de oxigênio, ocorrendo desta maneira baixos níveis de nitrificação e conseqüentemente pouco nítrito formado, sendo este reduzido a compostos gasosos nitrogenados, dos quais o N_2 é o principal produto (SHRESTHA *et al.*, 2001).

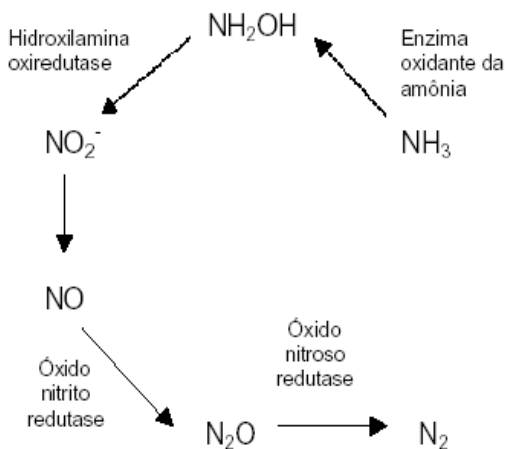


Figura 3.6 - Possível rota metabólica para a conversão da amônia a nitrogênio gasoso, pelo *Nitrosomonas europaea*.

Fonte: Shrestha *et al.*, (2001).

Embora o processo OLAND possua vantagens como a realização da remoção em um único reator, economia de oxigênio e matéria orgânica, a sua aplicação é demasiada limitada uma vez que a eficiência de remoção de nitrogênio alcançada foi baixa (menor que 40%) e as condições de processo ainda se encontram parcialmente compreendidas (ZHU *et al.*, 2008).

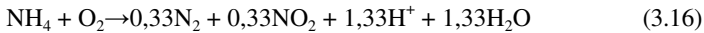
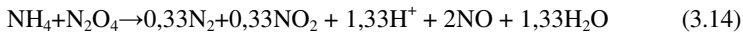
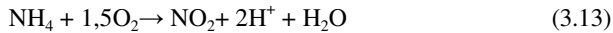
3.2.7 Processo NOx

Sabe-se que a oxidação do amônio pelas BOA ocorre em duas etapas catalizadas pelas enzimas amônia monooxigenase (AMO) e hidroxilamina oxidorreductase (HAO). A primeira cataliza a oxidação de NH_3 a hidroxilamina (NH_2OH) e, na sequência, a hidroxilamina é oxidada a NO_2^- com ajuda da HAO (ARP *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas, as *Nitrosomonas* começaram a aparecer como microrganismos desnitrificantes também, utilizando nitrito redutase e, provavelmente, óxido nitroso redutase para formar ácido nitroso e nitrogênio gasoso (ZART; BOCK, 1998). Em pesquisas recentes, os genes que codificam as principais enzimas que participam da desnitrificação foram encontrados nos genomas da grande maioria das BOA (BEAUMONT *et al.*, 2004).

Esta capacidade de eliminar nitrogênio autotroficamente, tanto em ambientes aeróbios como anóxicos, está associada a estímulos ocorridos em virtude da presença de óxidos de nitrogênio (NO_x). Estudos com culturas puras de *Nitrosomonas* revelaram que é possível a substituição do oxigênio pelo dióxido de nitrogênio (NO₂) ou ainda pelo tetraóxido de nitrogênio (N₂O₄ – forma dímera do NO₂), na oxidação do amônio tendo como produto a hidróxilamina e o NO (SCHMIDT *et al.*, 2001).

Segundo Leitão *et al.* (2007), a relação entre os óxidos de nitrogênio (NO, NO₂, N₂O₄) com a conversão aeróbia da amônia pode ser traduzida pelas Equações 3.13 e 3.14, observando-se a formação de óxido nítrico (NO) como um produto adicional da oxidação da amônia pelo N₂O₄. O óxido nítrico formado, em condições aeróbias, é oxidado para NO₂ (dióxido de nitrogênio), transformando-se na sua forma dímera N₂O₄, voltando a participar da oxidação da amônia.



Em trabalho realizado por Zart & Bock (1998), foi mostrado que, sob condição de aeração plena com a adição de NO ou NO₂ gasoso, uma cultura de *Nitrosomonas eutropha* é capaz de realizar o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneo, chegando a 51% de remoção do nitrogênio inicial.

O processo NO_x original consiste na adição de traços de NO ou NO₂ na corrente gasosa, para estimular a atividade de desnitrificação autotrófica das bactérias oxidadoras de amônio, como *Nitrosomonas sp.*, que ocorre simultaneamente com o processo de nitrificação parcial sob condições aeróbias (SCHMIDT *et al.*, 2003).

No entanto, Leitão *et al.* (2006), trabalhando com cultura adaptada a nitrificação, mostrou que é possível observar elevadas eliminações de nitrogênio, durante a oxidação de amônio a nitrito por *Nitrosomonas sp.*, sem adição de gases adicionais, desde que se observe também elevadas velocidades de reação. Estes autores chegaram a remoções de nitrogênio próximas a 50%.

Posteriormente estes autores trabalharam com uma sem

adaptação prévia submetendo-a apenas ao processo de lavagem do lodo como forma de seleção e também obtiveram valores relativamente elevados de nitrogênio através do acúmulo de intermediários por altas velocidades de oxidação de amônio (LEITÃO *et al.*, 2007).

Estes resultados levam a concluir que, em certas condições ambientais, seja possível a produção de NO durante o processo de nitrificação e a concomitante eliminação de parte do nitrogênio amoniacal suprido ao reator, sem a necessidade da adição dos óxidos de nitrogênio.

Uma vez que o acúmulo de intermediários de processos metabólicos como o NO, é frequentemente observado durante o cultivo de microrganismos sob excesso de substrato, os microrganismos tendem a partir para rotas metabólicas menos favoráveis ao seu crescimento, mas que priorizem o consumo e/ou redução destes compostos a fim de se proteger dos seus efeitos tóxicos (ZENG; DECWER, 1995).

3.3 FISH - FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION

A técnica FISH foi desenvolvida recentemente e consiste em uma poderosa ferramenta da biologia molecular na caracterização de populações em uma comunidade microbiana, além de possibilitar a determinação da distribuição espacial das populações em diferentes níveis taxonômicos.

É uma técnica relativamente simples e rápida, sendo bastante interessante utilizá-la em amostras ambientais de águas e solos e também em sistemas de tratamento biológico (BOUVIER; GIORGIO, 2003).

A técnica baseia-se na observação de que existem seqüências conhecidas e específicas do ácido ribonucleico ribossômico (RNAr) de um organismo, que permitem que se desenhe uma seqüência complementar (sonda) à primeira. O RNAr está presente nas células metabolicamente ativas em grande número, o que permite a hibridização da sonda fluorescente (marcadas com um radioisótopo) aos ribossomos de células individuais específicas. Usualmente, a sonda fluorescente é uma seqüência pequena (15 a 30 nucleotídeos) de DNA de fita simples, ligada a fluoróforos, tais como: fluoresceína (Fluos), cianinas (Cy3 e Cy5) e rodamina. A sonda liga-se à seqüência complementar no RNAr 16S e o microrganismo pode ser detectado por microscopia de fluorescência (AMANN *et al.*, 1990).

Geralmente utilizada para determinações qualitativas e

quantitativas de microrganismos, esta técnica determina a abundância relativa de um grupo de bactérias de interesse em relação a todas as células, através da utilização de marcadores como o DAPI (4,6 diamidino – 2 – phenylindol) que se une ao DNA (possibilitando que sejam coradas todas as células), ou através da porcentagem do número de bactérias do domínio Bacteria, utilizando a sonda EUB (pois caso as células que não hibridizam com a sonda EUB, indicam condições metabólicas inativas ou não permeáveis aos nucleotídeos da sonda pelo procedimento padrão de fixação). A relação EUB/DAPI dá uma idéia aproximada da proporção de células bacterianas metabolicamente ativas, as células coradas apenas com DAPI podem estar mortas ou inativas (ETCHEBEHERE; MENES, 2005 *apud* FERNANDES, 2009).

Dentre as vantagens deste método estão a sensibilidade, rapidez, baixo custo e sua aplicação direta sobre a amostra sem as restrições que implicam o cultivo e a extração do DNA e a amplificação por PCR, não havendo necessidade de purificação prévia da amostra (PHILIPS, 2007; JETTEN *et al.*, 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), inserido no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1 INÓCULO

A biomassa utilizada nos ensaios foi coletada em duas unidades distintas de tratamento de esgotos da Companhia de Saneamento do Estado de Santa Catarina (CASAN), ambas em Florianópolis.

4.1.1 ETE Canasvieiras

Vazões: 30 a 70L.s⁻¹ (variações devido a temporada de verão, quando a população aumenta em função da atividade turística).

População Atendida: 33.000 a 44.000 habitantes

Cargas: 1.782 a 2.376 kg_{DBO}/dia.

Corpo receptor: Rio Papaquara, Rio do Brás e alguns canais próximos.

Configuração: Pré-tratamento (Gradeamento e desarenador) + 1 Zona de desnitrificação + 3 valos de aeração + 1 decantador + desinfecção com gás cloro.

O tratamento secundário tem início no seletor biológico que evita o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis ao tratamento e melhora a sedimentabilidade do lodo. Na câmara de desnitrificação o nitrato é parcialmente removido sob a ação de microrganismos. Tanto nesta unidade quanto na anterior as condições são anóxicas. Em seguida, a mistura vai para o reator biológico formado por três valos de oxidação rasos onde acontece a digestão biológica da matéria orgânica carbonácea e a nitrificação do nitrogênio orgânico total remanescente do afluente bruto. No decantador secundário os flocos formados nos tanques de aeração se sedimentam, sendo parte deste lodo utilizado para recirculação ao seletor biológico e o excesso descartado. O lodo recirculado passa por um “tanque de reciclo”, no qual foram realizadas as coletas de material para os experimentos.

4.1.2 ETE Insular

Vazões: 278 a 417 L/s.

População Atendida: 150.000 habitantes.

Cargas: 8.100 kg_{DBO}/dia.

Corpo receptor: Mar (emissário submarino de 80 m na baía sul/Florianópolis)

Tipo: Lodos Ativados (Aeração Prolongada)

Configuração: Pré-tratamento (gradeamento e desarenação) + 2 Zonas de desnitrificação + 2 tanques de aeração + 3 decantadores.

A primeira unidade do processo secundário é o seletor biológico, cuja função é misturar o esgoto bruto afluente com o lodo ativado proveniente do processo de aeração prolongada, evitando assim o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis ao tratamento e melhorando a capacidade de sedimentação do lodo. A mistura segue para uma câmara de desnitrificação, sendo ambas as unidades operadas sob condições anóxicas.

Após este processo, a mistura segue para os tanques de aeração, nos quais o oxigênio fornecido propicia o desenvolvimento de bactérias aeróbias que irão digerir a matéria orgânica carbonácea e propiciar a nitrificação do nitrogênio orgânico total remanescente no afluente bruto. Então, os flocos formados nos tanques de aeração seguem para um decantador secundário para promover a sedimentação, sendo o lodo utilizado para recirculação ao seletor biológico e o excesso descartado.

As coletas nesta estação foram realizadas em dois pontos diferentes. Primeiramente dentro do próprio reator biológico. A baixa concentração de sólidos encontrada no material levou a adoção de uma estratégia diferente, passando-se a coletar o lodo no tanque de reciclo.

4.2 MEIO DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado foi o descrito por Campos *et al.* (1999), e sua composição é apresentada nas tabelas 4.1 e 4.2, abaixo. Como se pode observar, a concentração de amônio expressa em N é de 500mg N-NH₄ . L⁻¹.

Tabela 4.1 - Composição de nutrientes do meio sintético.

Componentes	Concentração (mg.L ⁻¹)
NH ₄ Cl	956
(NH ₄) ₂ SO ₄	1178
MgSO ₄	250
KH ₂ PO ₄	123
NaCl	1000
NaHCO ₃	1250
Solução de Micronutrientes	0,7*

* mL.L⁻¹**Fonte:** Campos *et al.*, (1999).**Tabela 4.2** - Composição da solução de micronutrientes.*

Componentes	Concentração (mg.L ⁻¹)
EDTA	50000
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1036
MnCl ₂	3220
ZnSO ₄	12354
CaCl ₂	5540
CoCl ₂	880
CuSO ₄	1004
FeSO ₄	2728

*pH da solução ajustado em 6,0 com KOH.

Fonte: Campos *et al.*, (1999).

4.3 EQUIPAMENTO UTILIZADO

Visando a obtenção de dados experimentais, foi utilizado um biorreator/fermentador MF114, fabricado pela New Brunswick, o qual possui um *upgrade* no seu sistema de monitoramento e controle de variáveis, através da inclusão do sistema TECBIO-C e de um transmissor de oxigênio marca Mettler Toledo (Impro 6800) que permitiu realizar os procedimentos experimentais de forma automatizada. A Figura 4.1 apresenta um diagrama esquemático do sistema utilizado. O equipamento possui como elementos de medição sensores para o acompanhamento das grandezas: oxigênio, pH (eletrodo Mettler Toledo Impro 3250/325/PT100), temperatura, vazão de aeração e velocidade de agitação. Adicionalmente como elementos de atuação: bomba peristáltica, um sistema de suprimento de ar e um sistema de circulação de água externo para controle de temperatura.

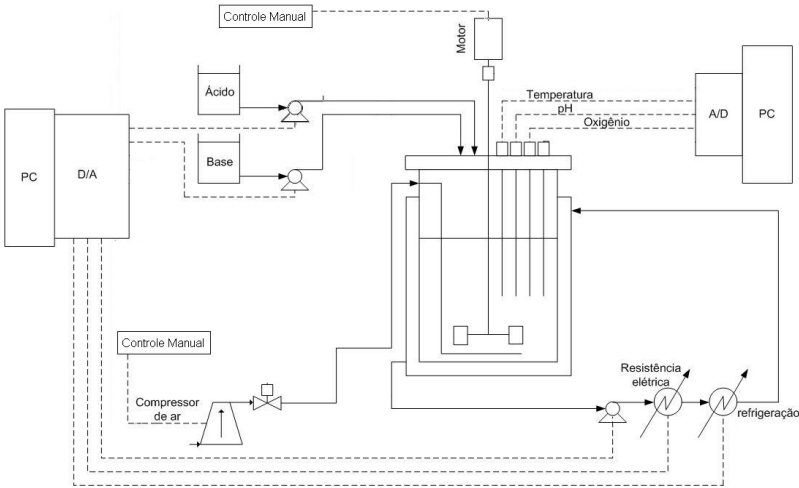


Figura 4.1 - Biorreator / Fermentador. Diagrama de processo.

O monitoramento e controle são realizados através da interface de operação apresentada na Figura 4.2.

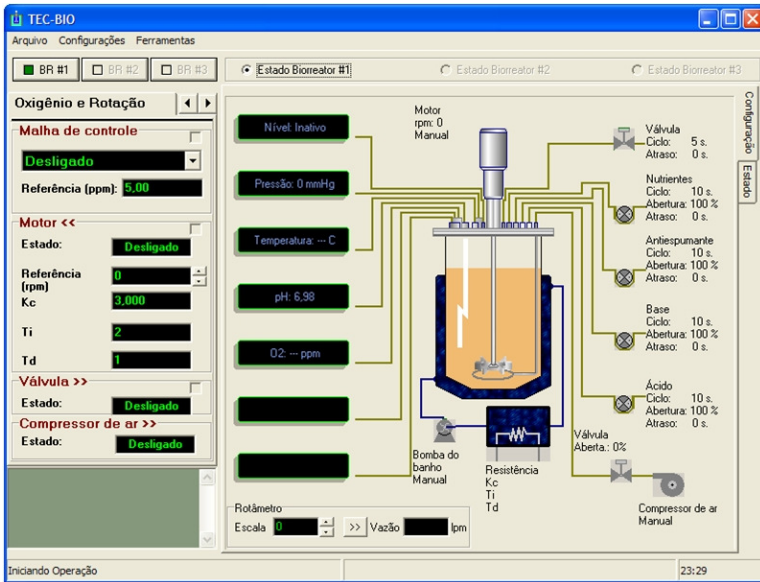


Figura 4.2 - Tela principal do programa de monitoramento e controle do biorreator.

As malhas de controle dentro do programa supervisor usam estratégias de controle do tipo PID e *on/off*.

No caso do oxigênio dissolvido não existe uma malha de controle automática implementada, e o sistema somente monitora o valor, sendo a correção realizada de forma manualmente através da vazão de entrada de ar, medida e ajustada através de um rotâmetro acoplado ao sistema.

A malha de pH tem implementada uma estratégia de controle “on/off”. O objetivo dentro desta malha é manter um valor desejado do pH no meio da reação. As variáveis manipuladas são as vazões de soluções de ácido e base, controladas através de um sistema de suprimento através de bombas peristálticas de ciclo de operação variável.

A malha de temperatura funciona através de um controlador PID que mantém um valor da temperatura do meio de biorreação. A variável manipulada é a potência entregue a uma resistência elétrica localizada dentro de um *loop* de circulação que contém um fluido que termostatiza o reator. Para o controle fino, uma válvula permite a renovação de fluido atuando como um elemento de refrigeração.

A agitação atua de forma manual através do ajuste do operador que assim pode manter um valor de agitação desejado sobre o sistema. A variável manipulada é a potencia entregue ao sistema haste e impelidores através de um motor de corrente alternada.

4.4 SISTEMA EXPERIMENTAL

A temperatura de referência nos experimentos foi de 35°C. Sendo a variação inerente ao sistema de controle de até $\pm 1^\circ\text{C}$. A velocidade de agitação aplicada durante os ensaios foi de 400rpm, sendo reduzida para 200rpm durante os testes de respirometria.

O pH foi mantido em 7,5 pela adição de NaOH 2N ou HCl 10% (v/v) através do sistema de controle. Como se trabalhou basicamente com nitratação, a tendência é a queda de pH, sendo utilizada na maior parte do tempo a base para correção.

O controle manual da aeração foi feito através do rotâmetro, acoplado ao próprio equipamento, o qual media a vazão do ar provido por uma bomba de vácuo externa da Tecnal Modelo TE 0581. O volume de reação foi mantido em 3L e para manter o meio sempre próximo à saturação em oxigênio a vazão de ar foi mantida em $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (1vvm).

4.4.1 Processo de Seleção por Lavagem (wash out)

A cada novo ensaio o lodo foi coletado diretamente na estação de tratamento de esgotos e submetido a um processo de “lavagem”, empregando-se vazões específicas de alimentação relativamente elevadas. A estratégia de lavagem é baseada na diferença de velocidades de crescimento entre as bactérias nitrificantes. O objetivo era selecionar as bactérias que oxidam amônio a nitrito (BOA), descartando as bactérias que oxidam o nitrito a nitrato (BON).

O processo de lavagem foi realizado em sistema contínuo, mantendo-se sempre as condições de pH, aeração e temperatura citadas no item anterior, impondo-se ao meio de entrada (citado no item 4.2), que possuía uma concentração média de $500 \text{ mg N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, uma vazão específica de alimentação suficientemente elevada, de maneira a efetuar a drenagem das células por arraste no fluxo líquido.

A Figura 4.3 mostra o esquema prático montado para realização do procedimento de lavagem das células.



Figura 4.3 - Reator 1 (R1) e Reator 2 (R2) sendo operados simultaneamente.

A partir das vazões aplicadas e considerando-se os 3L de volume útil do reator obteve-se dois Tempos de Retenção Hidráulica (TRH) diferentes, de um dia e 1,5 dias. Esses valores não eram fixos em vista das variações na velocidade de funcionamento da bomba peristáltica (Milan, BP-200) responsável pelas vazões de entrada e saída.

Segundo Facciotti *et al.* (2001), para um biorreator considerado homogêneo operado em sistema contínuo, o balanço material para o microrganismo pode ser escrito como:

$$V \left(\frac{dX}{dt} \right) = FX_0 - FX + r_x * V \quad (4.1)$$

no qual:

F = vazão de alimentação (L.h⁻¹)

X = concentração celular no reator (g.L⁻¹)

X₀ = concentração celular na alimentação (g.L⁻¹)

V = volume do reator (L)

r_x = velocidade de crescimento das células (g.L⁻¹.h⁻¹)

Admitindo que X₀ = 0 (não há microrganismos na alimentação)

sendo:

D = F/V = vazão específica de alimentação

μ = velocidade específica de crescimento

$$\mu = \frac{1}{X} r_x$$

no estado estacionário: dX/dt = 0, portanto:

$$D = \mu$$

A igualdade D=μ apenas será possível caso D < μ_{max}, ou seja, a vazão específica de alimentação deve ser menor que a velocidade específica máxima de crescimento das células, para que ocorra o estado estacionário com dX/dt = 0.

Fazendo D > μ_{max} ocorrerá o arraste das células, pois faz-se com que a vazão específica de alimentação (D), seja maior que a velocidade que elas conseguem crescer (FACCIOTTI *et al.*, 2001). Neste caso não mais será possível a ocorrência do estado estacionário, sendo a equação de balanço material para o microrganismo:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{\max} - D)X \quad (4.2)$$

Integrando a equação:

$$X = X_i * e^{(\mu_{max} - D) * t} \quad (4.3)$$

onde:

X = concentração celular no reator no instante t (g.L⁻¹).

X_i = concentração celular no início do período de lavagem (g.L⁻¹).

Considerando o expoente negativo na Equação 4.3, observa-se que ocorre um decréscimo exponencial da concentração celular em função do tempo. Neste caso, fica evidente que o microrganismo que apresentar menor valor de μ_{max} entre aqueles com diferentes valores de velocidade específica de crescimento, será arrastado para fora do reator, durante o processo de lavagem, com maior facilidade.

No caso deste trabalho, sendo a concentração celular medida em Sólidos Suspensos Totais (SST), pode-se escrever a Equação 4.4, tendo como variável dependente a concentração de SST, e, assim, ajustar os dados para obter-se os valores da velocidade específica de crescimento apresentada em cada ensaio, ou seja:

$$SST = SST_0 * e^{(\mu - D) * t} \quad (4.4)$$

onde:

SST = concentração de biomassa no reator no instante t=0 (g.L⁻¹)

SST₀ = concentração de biomassa no instante t (g.L⁻¹)

μ = velocidade específica de crescimento a partir do ajuste da curva (h⁻¹)

Conforme já mencionado no item 3.2.2 (página 43), é possível oferecer condições que possam favorecer a diferenciação entre os valores de μ_{max} para as células que se pretende separar. Segundo Verstraete e Philips (1998), temperaturas relativamente elevadas (por exemplo, 35°C), contando com valores de μ_{max} maiores para o *Nitrosomonas*, que para o *Nitrobacter*, podem ser efetivas na separação destes dois microrganismos quando aplicada vazão específica de alimentação maior que a velocidade de crescimento das células.

4.4.2 Ensaios cinéticos

Ao chegar a uma concentração celular - medida através dos Sólidos Suspensos Totais (SST) - próxima a 1g.L⁻¹ a bomba de

alimentação era desligada e, conseqüentemente, o processo de lavagem era interrompido. As demais condições do sistema (temperatura, pH, aeração) seguiam inalteradas e o reator passava a ser operado como um SBR (*Sequencing Batch Reactor*).

Segundo Ferreti (2009) o SBR – Reator operado em bateladas seqüenciais – consiste, basicamente, em um tanque similar ao de lodos ativados, que tem por diferencial a operação em ciclos de enchimento-descarga. São caracterizados pelas etapas de: enchimento, reação, decantação e retirada de efluente.

Os ensaios cinéticos baseavam-se no consumo de amônia e o tempo de cada um era determinado pela queda na concentração do nitrogênio amoniacal. Após cada cinética interrompia-se a aeração e a agitação, a fim de permitir a sedimentação das células. O líquido sobrenadante era retirado do reator, efetuando-se uma nova alimentação, com o mesmo meio utilizado na etapa anterior, promovendo-se a cinética seguinte com a mesma biomassa. Todos os ciclos foram realizados sem limitação de oxigênio.

As velocidades de consumo de amônio ($QN-NH_4 X$) e velocidade específica de consumo de amônio ($QN-NH_4$) foram determinadas em cada ensaio cinético pela regressão linear das concentrações em função do tempo, tendo em vista o comportamento linear observado, seja após uma fase inicial de adaptação da biomassa, seja nas cinéticas em que a atividade microbiana se dava imediatamente após seu início.

4.4.3 Ensaios cinéticos com lodo não lavado

A título de comparação foram realizados ensaios para verificar a cinética de consumo de amônia utilizando como inóculo lodo bruto, ou seja, sem passar por um processo de lavagem para a seleção de biomassa específica.

Para tanto, efetuou-se a diluição do material em meio com alta concentração de amônia (aproximadamente $500mg.L^{-1}$) e composição idêntica à dos ensaios com lavagem prévia. A quantidade de lodo utilizada dependia de sua concentração, já que ao final da diluição pretendia-se chegar a $1g SST.L^{-1}$. A fim de dar à biomassa as mesmas condições de aclimação ao meio que poderiam estar sendo proporcionadas pelo período de lavagem, o enchimento do reator, após ser inoculado, era feito de forma progressiva, utilizando uma bomba peristáltica Milan, modelo BP-200, que proporcionava uma vazão de enchimento similar à vazão da lavagem.

Após completar os 3L de volume do reator a primeira cinética era imediatamente iniciada. Para as demais seguia-se o mesmo procedimento citado no item anterior.

4.4.4 Ensaios *stripping* amônia

Como já foi mencionado no item 3.2.2 (o pH influencia diretamente no equilíbrio entre as formas que a amônia pode se apresentar no meio. Quanto mais alto o valor do pH e da temperatura, maior a presença de amônia livre (NH_3). Desta forma, a aeração e agitação do meio podem colaborar para que haja a transferência da amônia do meio líquido para a atmosfera, o chamado “*stripping de amônia*” (CERVANTES, 2009).

No intuito de verificar se o decréscimo de amônia, ao longo dos ensaios, não estaria sendo influenciado pela ocorrência de *stripping* no reator, foram realizados testes, em condições abióticas, utilizando meio com a mesma composição e concentração de nitrogênio amoniacal inicial (aproximadamente $500\text{mg N-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$) dos ensaios biológicos. As demais condições também permaneceram, ou seja, 35°C , 400rpm de agitação e aeração de $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (1vvm).

Utilizando-se 3L de meio foram conduzidos três diferentes ensaios, com tempo mínimo de 40 horas cada, variando entre eles o valor do pH aplicado: 7,5; 8,0; 8,5.

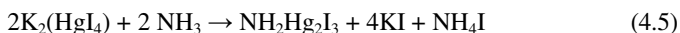
4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.5.1 Determinação de amônio

A determinação de amônio foi realizada segundo o método de Nessler, descrito por VOGUEL (1981). O reagente de Nessler - solução alcalina de tetraiodo-mercurato (II) de potássio - é preparado dissolvendo-se 100g de iodeto de mercúrio (II) e 70g de iodeto de potássio em 100 mL de água, a seguir adiciona-se 700mL de uma solução fria contendo 160g de hidróxido de sódio e completa-se o volume para 1000mL. O reagente é utilizado apenas após alguns dias, período necessário para a decantação do precipitado que se forma. Cloreto de amônio é utilizado para a construção da curva padrão, sendo a faixa de NH_4^+ utilizada entre $0\text{-}20\text{mg NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$.

Quando o reagente de Nessler é adicionado a uma solução diluída

de sal de amônio, a amônia liberada reage com a solução alcalina de iodeto de mercúrio (II) em iodeto de potássio com certa rapidez, mas não instantaneamente, com formação de um produto laranja-marrom, que permanece em solução na forma coloidal, floculando com o tempo. A comparação colorimétrica deve ser feita antes da floculação. A reação com o reagente de Nessler pode ser representada por:



Para cada 5mL de amostra analisada é adicionado 100µL do reagente de Nessler e após 10 minutos realizada a leitura da absorbância. A análise foi realizada colorimetricamente em espectrofotômetro, HACH-DR2010, a 525nm.

4.5.2 Determinação de nitrito

A concentração de nitrito presente ao longo dos ensaios foi determinada através do kit analítico Nitriver 2, da Hach Company. O método emprega sulfato ferroso em meio ácido para reduzir o nitrito para óxido nítrico. O óxido é, então, convertido em um cromógeno através da reação com cádmio, o complexo marrom-esverdeado formado tem proporção direta com o nitrito presente, permitindo a leitura em espectrofotômetro a 585 nm. A curva de calibração é preparada com NaNO₂, abrangendo a faixa de 0-150 mg N-NO₂.L⁻¹. Na análise utiliza-se 10mL de amostra e um envelope de reagente, diluindo-se com agitação vigorosa. Para leitura da absorbância é preciso aguardar 10 minutos para a reação ocorrer.

4.5.3 Determinação de Nitrato

A determinação de nitrato foi realizada pelo método do ácido salicílico, conforme procedimento descrito por CATALDO *et al.* (1975). Para a análise da concentração de nitrato são utilizados 0,2 mL de amostra ao qual é adicionado 0,8mL do reagente AS-H₂SO₄, esta solução é preparada pela dissolução de 50g de ácido salicílico em um litro de ácido sulfúrico concentrado. Após 20 minutos de reação, são adicionados 19mL de solução NaOH 2N, preparada pela dissolução de 80g de NaOH para cada litro de água destilada. A reação de neutralização libera bastante calor. Após resfriar, é feita a leitura da

absorbância em espectrofotômetro a 410nm.

A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio, abrangendo a faixa 0 - 70mg N-NO₃.L⁻¹.

4.5.4 Determinação dos Sólidos Suspensos Totais e Sólidos Suspensos Voláteis (SST e SSV)

A variável utilizada para observação da concentração celular foi a concentração de sólidos suspensos totais segundo a metodologia proposta por OLSSON; NIELSEN (1997), descrita por ZDRADEK *et al.* (2005). Para a realização desta análise foi efetuada a secagem de papel filtro em forno de microondas, ajustado na potência de 180 Watts, durante 15 minutos, filtração da amostra com este papel filtro, de massa já conhecida, e posterior secagem do filtro com amostra nas mesmas condições descritas anteriormente. A concentração de sólidos suspensos totais era obtida pela diferença de peso do papel filtro antes e depois da secagem sendo considerado o volume de amostra utilizado para a análise.

Para a determinação dos sólidos suspensos voláteis, utilizou-se o método descrito no *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, o qual utiliza a queima da biomassa em mufla a 600°C por 15 minutos (APHA, 2005).

4.5.5 Cálculo da remoção de nitrogênio a partir dos dados analíticos

A remoção de nitrogênio, para um dado instante de cada cinética efetuada, foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Remoção de N} = N_0 - N_t \quad (4.6)$$

onde:

N_0 = Concentração de nitrogênio no instante inicial (mg N-NH₄.L⁻¹)

N_t = Soma das concentrações de amônio (mg N-NH₄.L⁻¹), nitrito (mg N-NO₂.L⁻¹) e nitrato (mg N-NO₃.L⁻¹) para o instante t considerado.

A remoção percentual de amônio em um dado instante “t” foi calculada pela Equação 4.7:

$$\text{Remoção percentual de N} = \frac{\text{Remoção de N no instante t}}{N_0} * 100 \quad (4.7)$$

4.6 DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE RESPIRAÇÃO DA BIOMASSA

Ao longo dos ensaios cinéticos, principalmente daqueles realizados imediatamente após a lavagem determinou-se a cinética de consumo de oxigênio a partir do substrato utilizado. A respirometria, técnica simples e rápida, foi realizada no próprio reator, em espaços de tempos alternados e aleatórios. Para tanto, a aeração era desligada, interrompendo o fornecimento de oxigênio ao reator e a velocidade de agitação reduzida de 400 para 200rpm. Os dados da queda na concentração de O_2 ficam registrados pelo próprio programa utilizado para acompanhamento do reator.

Através da respirometria calcula-se a velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X), onde QO_2 é a velocidade específica de respiração celular e X é a concentração celular, que é obtida quando se plota a variação na concentração de oxigênio dissolvido ($mgO_2.L^{-1}$) em função do tempo, a partir do instante em que se elimina a aeração.

Segundo Schmidell (2001), um reator descontínuo aerado e agitado, tem como balanço de oxigênio a seguinte equação:

$$\left(\frac{dC}{dt}\right) = k_L a (C_s - C) - Q_{O_2} X \quad (4.8)$$

C = concentração de oxigênio dissolvido no instante t ($mg.L^{-1}$).

C_s = concentração de oxigênio dissolvido na saturação ($mg.L^{-1}$).

$k_L a$ = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (min^{-1}).

$Q_{O_2} X$ = velocidade de consumo de oxigênio ($mgO_2.L^{-1}.min^{-1}$).

Q_{O_2} = velocidade específica de respiração ($mgO_2.SST^{-1}.min^{-1}$).

X = concentração celular ($gSST.L^{-1}$).

t = tempo (min).

Considerando que ao interromper a aeração a transferência de oxigênio para o líquido seja praticamente nula ($K_L a = 0$), desta forma:

$$-Q_{O_2} X = \left(\frac{dC}{dt}\right) \quad (4.9)$$

A integração da Equação 4.9, fornece a equação da reta, na qual os valores de C determinados no experimento em função do tempo permitem o cálculo de QO_2X (coeficiente angular da reta), conforme a Equação 4.10:

$$C = C_0 - Q_{O_2}K * t \quad (4.10)$$

onde:

C_0 = concentração de oxigênio dissolvido no instante t_0 em que se interrompeu a aeração.

4.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para verificar as características microbiológicas do inóculo e acompanhar as modificações ocorridas na microbiota ao longo dos ensaios realizados, foram utilizadas técnicas de biologia molecular (FISH) e microscopia óptica.

4.7.1 FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*)

A técnica de FISH foi realizada, conforme descrito por Amann (1995). Após a coleta da amostra, diretamente do reator, procedia-se sua fixação em paraformaldeído conforme segue:

Preparo dos reagentes:

- Tampão PBS 3X (390mM NaCl, tampão fosfato 30mM à pH 7,2-7,4): para o preparo do tampão fosfato de sódio 0,5M pH 7,2-7,4 foram misturados 280mL de Na_2HPO_4 0,5M com 720mL de Na_2HPO_4 0,5M. O tampão PBS 3X foi preparado misturando-se 23,4mL de NaCl 5M, 18,0mL de tampão fosfato de sódio 0,5M e 258,6mL de água destilada.
- Tampão PBS 1X: prepara-se diluindo-se uma parte de PBS 3X para duas de água.
- Solução 4% de PFA – PBS: 4g de paraformaldeído (PFA) foram adicionados em 66 mL de água destilada a 60°C e gotas de NaOH 10N a fim de promover a dissolução do PFA. Após esfriar acrescentou-se 33mL de PBS 3X e o pH foi ajustado a 7,2-7,4 com gotas de HCl concentrado. A solução pronta pode ser armazenada a 4°C por até duas semanas.

Procedimento analítico para fixação da amostra

Para a fixação foram utilizados 300 µL de suspensão de lodo, o qual foi colocado em um tubo *ependorf* e centrifugado a 5000rpm por 10 minutos. Após descartado o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com PBS 1X agitando vigorosamente e novamente centrifugado. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado resuspendido em 100µL de PBS 1X. Após foram agregados 300µL de solução 4% PFA – PBS e incubado de 3 a 18 horas a 4°C.

Ao final do período de incubação a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com PBS 1X. Novamente centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos e resuspendido em 100µL de PBS 1X. Então, são agregados 300µL de etanol absoluto, e a amostra assim pode ser armazenada pôr vários meses a -20°C.

Hibridização das amostras fixadas

Seguem-se as etapas para hibridização das sondas ao RNA das amostras previamente fixadas.

- Imobilização e desidratação das células sobre a lâmina;
- Hibridização das células com oligonucleotídeos fluorescentes (sondas);
- Lavagem das lâminas com água destilada, preferencialmente gelada, para otimização da estringência;
- Coloração das células com DAPI (*DNA intercalating dye 4,6 diamino-2 phenylindole*). O DAPI não é específico e cora tanto bactérias quanto eucariontes;
- Adição de um anti “fading” (CitiFluor) sobre a amostra recém preparada (para evitar a perda de fluorescência) e cobertura da lâmina com lamínula;
- Observação em microscópio epifluorescente.

A Tabela 4.3 apresenta as sondas, especificidade e sequencias específicas, utilizadas nos processos de hibridização.

Tabela 4.3 - Sondas e seqüência de nucleotídeos utilizados na análise de FISH.

Sonda	Seqüência de Nucleotídeos (5'-3')	Grupo / Espécie a ser determinada
EUB mix	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubactérias
Nso190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Betaproteobactérias oxidadoras de amônia
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter</i> spp
NEU	CCCCTCTGCTGCACTCTA	<i>Nitrosomanas</i> sp. e <i>Nitrosococcus mobilis</i>

A ligação da sonda, à qual está acoplado o fluorocromo do tipo Cy3, com a seqüência complementar no rRNA foi detectada por microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus modelo BX-41) que apresenta sistema de captura e armazenamento de imagens.

4.7.2 Microscopia óptica

Em algumas amostras retiradas ao longo dos ensaios foi possível fazer a observação dos flocos em microscópio óptico. O material foi mantido a 4°C entre o momento da coleta e análise, sem qualquer tratamento prévio. Para observação uma pequena alíquota foi posta em lâmina sobreposta com lamínula.

Os materiais foram analisados e fotografados em microscópio Olympus BH-2 com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América Ind.).

4.8 RESUMO DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS REALIZADOS

Para facilitar a exposição dos dados e entendimento dos procedimentos, a Tabela 4.4 apresenta um resumo dos ensaios expostos neste trabalho, como a procedência do inóculo utilizado, a vazão de alimentação aplicada à lavagem do lodo (F), o tempo total de duração da lavagem, o TRH aplicado, a vazão específica de alimentação (D) obtida e número de ciclos de alimentação realizados em cada ensaio.

Tabela 4.4 - Dados referentes aos ensaios realizados entre abril de 2009 e março de 2010.

Ensaio	Inóculo	F (mL.h⁻¹)	Tempo Lav. (h)	TRH (dias)	D (h⁻¹)	Número ciclos
Abr/2009	Reciclo ETE Canas	123	63	1,02	0,041	3
Jul/2009	Reciclo ETE Canas	68	137	1,84	0,023	5
Ago/2009	Tanque lodo ativ. ETE Insular	67	44	1,86	0,0223	6
Set/2009	Tanque lodo ativ. ETE Insular	122,5	30	1,02	0,0408	7
Out/2009	Reciclo ETE Insular	121,8	46	1,03	0,0406	6
		118,4	48	1,06	0,0395	5
Jan/2010	Reciclo ETE Insular	ench. gradual (~80mL/h)	-	-	-	5
Mar/2010	Reciclo ETE I nsular	118,2	51	1,06	0,0394	5
		127,2	48	0,92	0,0454	5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente são apresentados os dados referentes aos ensaios abióticos de “*stripping*” de amônia. Na seqüência, a exposição dos resultados se dá na ordem cronológica em que foram realizados os ensaios biológicos. Cada um deles apresentado e discutido – dividido nas fases de lavagem e cinéticas subseqüentes, quando ambas existiam. Ao final do capítulo encontram-se as análises microbiológicas e, nas considerações finais, a discussão comparativa entre todos os ensaios realizados, confrontando os dados com aqueles existentes na literatura. Nos Apêndices constam as tabelas com as determinações analíticas das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₄), nitrito (N-NO₂) e nitrato (N-NO₃), além das medidas de pH e temperatura referentes ao instante da coleta de cada amostra. Também constam os respectivos valores da constante de equilíbrio (K_a) e amônia livre calculados através das equações fornecidas por Anthonisen *et al.* (1976) e Wiesmann (1994) apresentadas no item 3.2.2 (páginas 40 e 41).

Embora tenham sido calculados também os valores de HNO₂ para todos os pontos de amostragem, eles não são apresentados na forma de tabelas, já que a maioria se apresentou bastante irrelevante (abaixo de duas casas decimais), sendo apenas comentados ao longo da discussão quando pertinentes.

5.1 TESTES DE ELIMINAÇÃO DE AMÔNIA SEM A PRESENÇA DE MICRORGANISMOS (*STRIPPING*).

Como já comentado nos capítulos anteriores, a amônia livre é uma preocupação nos ensaios biológicos, uma vez que é o verdadeiro substrato dos microrganismos ao mesmo tempo em que passa a ter efeito inibidor quando encontrada acima de determinadas concentrações. O equilíbrio entre as formas é fundamental para o bom andamento do processo. São dois fatores que atuam de forma efetiva no equilíbrio entre as concentrações de amônio e amônia livre: o pH e a temperatura. Os testes abióticos foram realizados no sentido de se observar a influência destes fatores num meio com concentração igual à utilizada nos experimentos com biomassa e, assim, certificar-se da real atuação dos microrganismos na remoção de amônio diante das condições aplicadas ao processo.

Os resultados dos ensaios realizados para verificar a perda de amônia a partir de *stripping* são apresentados nas figuras 5.1 e 5.2.

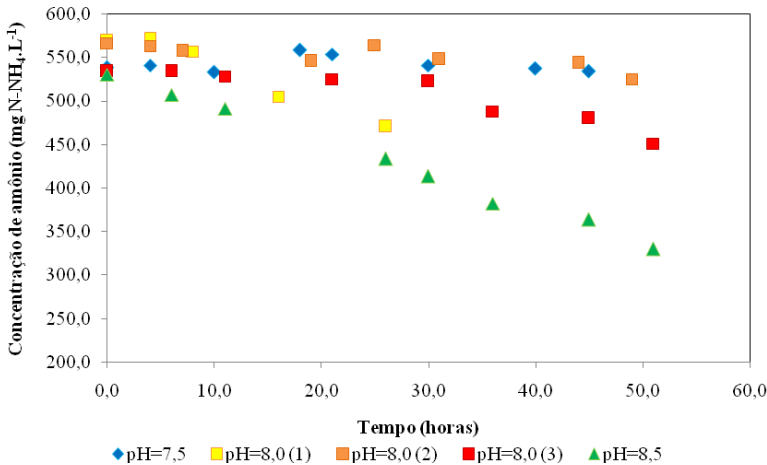


Figura 5.1 - Acompanhamento das concentrações de amônio (expresso como N) ao longo dos cinco testes abióticos realizados com diferentes valores de pH.

A influência do pH fica clara ao se observar os três comportamentos distintos no gráfico – quanto mais alto o valor de pH maior a perda de amônia. Cabe lembrar que a velocidade de eliminação de amônia também é influenciada pela vazão de aeração e velocidade de agitação empregada. No caso deste trabalho, $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e 400rpm , respectivamente, para todos os ensaios realizados. Considerando o meio abiótico e a presença de amônia livre como é apresentado na Figura 5.2 essa perda pode ser atribuída ao fenômeno de *stripping*.

Quando se trata do $\text{pH}=8,5$ tem-se um comportamento praticamente linear na queda da concentração de amônio, o ajuste da curva nos fornece uma velocidade de remoção de $3,9\text{mg N-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, algo bastante significativo quando comparado com os ensaios biológicos, conforme ficará bastante claro mais adiante.

Para $\text{pH}=8,0$ foram realizados três ensaios em momentos diferentes. Isto porque foi difícil estabelecer um padrão de comportamento, como a própria Figura 5.1 mostra. É razoável considerar que este valor de pH seja um ponto limitante entre a ocorrência ou não do fenômeno de *stripping* nas condições de temperatura, vazão de aeração e velocidade de agitação empregadas.

Os valores de amônia livre apresentados na Figura 5.2 foram

obtidos através das equações que descrevem o equilíbrio entre as formas de amônio (íon) e amônia livre, propostas por Anthonisen *et al.* (1976) e Wiesmann (1994), também mencionadas no início deste capítulo.

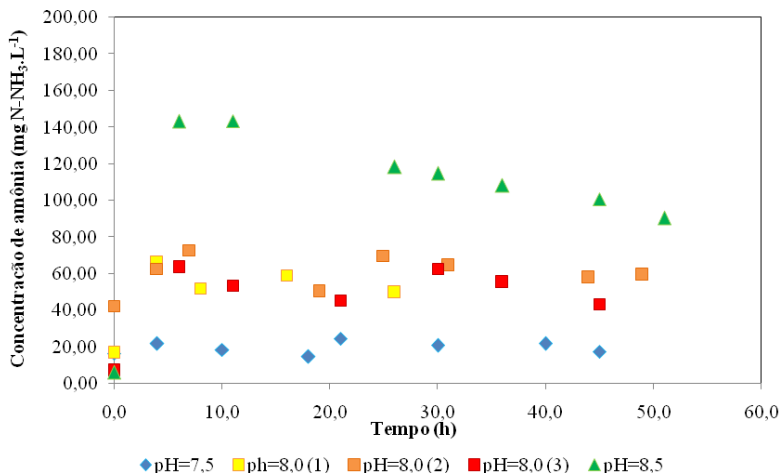


Figura 5.2 - Acompanhamento das concentrações de amônia livre presentes no reator conforme equação proposta por Anthonisen *et al.* (1976) e Wiesmann (1994) ao longo dos testes realizados com diferentes valores de pH.

Quando o pH é mantido em 7,5 a concentração de amônio permanece praticamente constante, embora exista a presença de amônia livre no meio, cuja concentração permanece em torno de 20mg.L⁻¹ durante todo o período. Isto mostra que, trabalhando com este valor de pH nos ensaios biológicos e conservando as demais condições empregadas (vazão de aeração, temperatura e velocidade de agitação), tem-se uma condição em que existe substrato para as BOA e toda a remoção de amônia verificada pode ser considerada biológica.

Quando se trata do pH=8,0, nos três ensaios realizados a concentração de N-NH₃ fica na faixa de 50-70mg N-NH₃.L⁻¹ o que poderia indicar uma maior disponibilidade de substrato desde que se tivesse um controle rigoroso para que não ocorresse “*stripping*”. Contudo, se segundo Anthonisen *et al.* (1976), a inibição das BON inicia a 0,1-1mg N-NH₃.L⁻¹ e para as BOA entre 10-150mg N-NH₃.L⁻¹, trabalhar com a faixa entre 1-10mg N-NH₃.L⁻¹, pode ser ideal para o fenômeno biológico proposto aqui.

De qualquer forma, buscou-se trabalhar com o pH o mais próximo possível do valor 7,5, ou seja, no valor em que o “*stripping*” pode ser desprezado.

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

A diferença entre os ensaios biológicos realizados se dá, na maior parte deles, no procedimento adotado com a biomassa coletada ao inocular o reator e antes de operá-lo como um SBR. A “lavagem” do lodo (*wash out*) foi empregada como forma de seleção das BOA em detrimento das BON, sua eficiência foi testada através das cinéticas de consumo de amônia e de maneira comparativa ao mesmo processo conduzido com um lodo “não-lavado”.

5.2.1 Ensaio abril/2009

Neste primeiro ensaio, o lodo coletado na ETE Canasvieiras apresentava, após ter sido passado por uma peneira simples para retirada de resíduos mais grosseiros, uma concentração de $12,52\text{g SST.L}^{-1}$. Após ser submetido ao processo de lavagem, o qual durou 64 horas, a concentração celular final do lodo chegou a $0,74\text{g SST.L}^{-1}$. A vazão média de alimentação (F) foi mantida em $123,0 \pm 8,8\text{mL.h}^{-1}$, equivalendo, em termos de vazão específica de alimentação (D), a $0,041\text{h}^{-1}$. A Figura 5.3 mostra a concentração celular do lodo em função do tempo.

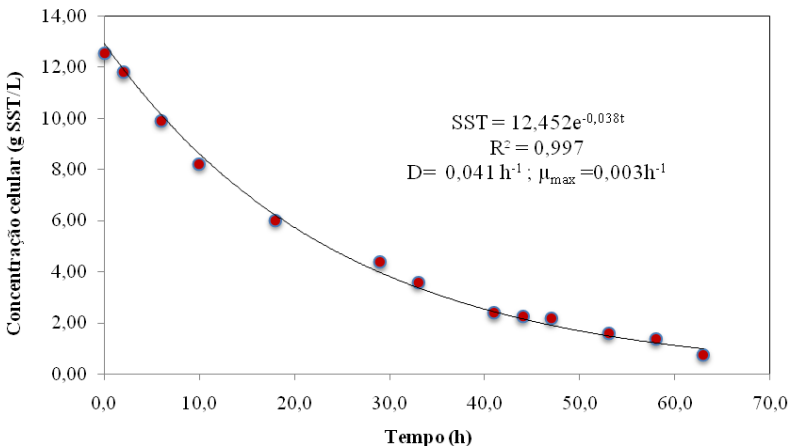


Figura 5.3 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.

O ajuste da equação exponencial, conforme Equação 4.4 (página 58) permitiu estimar o valor da grandeza $(D-\mu_{max}) = 0,038h^{-1}$, resultando um μ_{max} de $0,003h^{-1}$. Embora este valor seja menor que os encontrados na literatura para *Nitrobacter* ($0,022h^{-1}$) ou para *Nitrosomonas* ($0,033h^{-1}$) (VERSTRAETE; PHILIPS, 1998), cabe lembrar que se partiu de uma cultura mista de células, enquanto os dados da literatura são relativos a culturas puras.

Na Figura 5.4 são apresentados os dados de acompanhamento dos compostos nitrogenados (NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^-) ao longo da lavagem. Lembrando que, nesta etapa, o reator foi alimentado continuamente com meio contendo cerca de $500mg\ N-NH_4.L^{-1}$. O aumento da concentração de nitrogênio amoniacal no reator, enquanto as concentrações de nitrato e nitrito permanecem baixas, aponta uma baixa atividade do lodo, fato evidenciado também pela velocidade específica de crescimento mencionada.

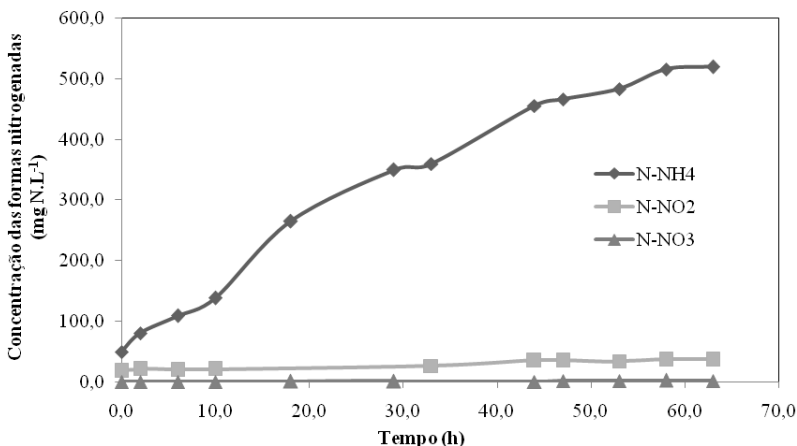


Figura 5.4 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.

Ao final do processo de lavagem, o reator passou a ser operado como um SBR e imediatamente deu-se início a primeira cinética, mantendo-se as demais condições de operação inalteradas. Após cerca de 76 horas, a concentração de nitrogênio amoniacal chegou a níveis próximos a zero, encerrando o primeiro ciclo. Seguiu-se um período de sedimentação do lodo e posterior retirada do sobrenadante, priorizando a retenção da biomassa. Ao preencher o volume do reator com o meio de

mesma concentração utilizado na lavagem ($500\text{mg N-NH}_4\text{.L}^{-1}$), deu-se início a segunda cinética e procedeu-se da mesma forma em uma terceira.

Os dados de acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas no meio, para os três ciclos de alimentação realizados, seguem apresentados da Figura 5.5. Ressalta-se que, no gráfico, não é considerado o tempo de decantação entre uma cinética e outra.

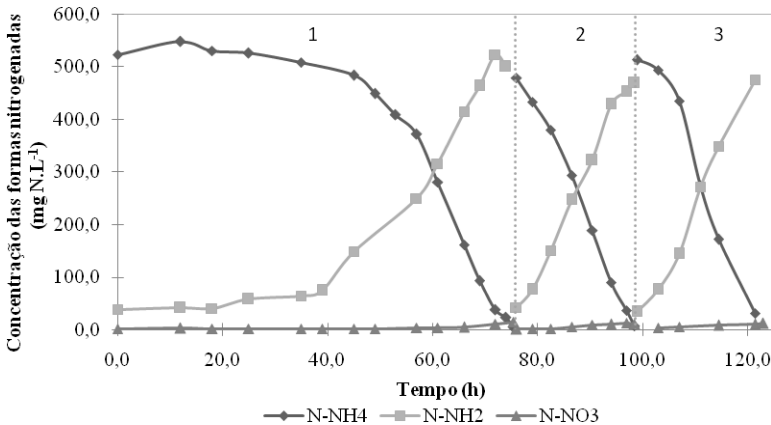


Figura 5.5 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das três cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.

É possível observar que nas primeiras 40 horas após a lavagem não houve, praticamente, consumo de amônio, remetendo à baixa atividade celular novamente. Este comportamento foi recorrente em todos os ensaios posteriores, apenas apresentando variação no período necessário para a adaptação e também foi observado por Leitão *et al.* (2007), quando utilizou lodo sem pré adaptação.

Passado este primeiro período de adaptação dos microrganismos, a concentração de amônia começa a decair quase proporcionalmente ao aumento da concentração de nitrito, enquanto os níveis de nitrato não sofrem alteração, seguindo baixos e demonstrando um desequilíbrio entre as populações de bactérias oxidadoras de amônio, em especial as *Nitrosomonas*, e as oxidadoras de nitrito (como as *Nitrobacter*).

Os períodos reservados para decantação da biomassa para se efetuar nova alimentação, sem a presença de agitação e aeração, não deixam de ser seletivos em relação à população microbiana presente, uma vez que as BOA têm uma maior afinidade pelo oxigênio do que as

BON, prevalecendo em sistemas com pouco oxigênio dissolvido. Além do mais no instante inicial de cada ciclo não há substrato para as BON, além da alta concentração de amônio, aliada a alcalinidade do sistema promover a presença de quantidades de amônia livre que, de acordo com a faixa proposta por Anthonisen *et al.* (1976), pode ser inibitória para esses microrganismos.

Na tabela 5.1 constam os tempos de duração de cada cinética, assim como a remoção total obtida ao final de cada ciclo, a velocidade específica de consumo de amônio (Q_{NH_4}) e velocidade específica de formação de nitrito (Q_{NO_2}), estas últimas obtidas ao se considerar as relações lineares de variação de concentração dos dois compostos em função do tempo.

O valor da concentração celular (X_m) das cinéticas foi obtido através da média entre as medidas realizadas ao longo de cada uma (vide valores nos apêndices) a qual está acompanhada do intervalo de confiança entre as médias obtido através do desvio padrão da amostra populacional, com nível de significância de 95%.

Tabela 5.1 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 3 ciclos de alimentação.

	Tempo (h)	Remoção (%)	X_m (g SST.L ⁻¹)	Q_{NH_4} (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	Q_{NO_2} (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	75,5	9,21	1,44±0,39	0,29	0,22
Ciclo 2	22,5	7,48	1,23±0,22	0,48	0,44
Ciclo 3	24,0	12,27	1,92±0,50	0,33	0,35

Os valores de remoção apresentados são referentes ao total de nitrogênio que teria sido removido na forma de N₂ ao final de cada ciclo de alimentação.

De uma maneira geral, os microrganismos autotróficos apresentam baixas velocidades específicas de crescimento e, além disso, trabalha-se com concentrações de substratos relativamente baixas. Deve-se também lembrar que ocorria a retirada de amostras para as determinações analíticas. Destes fatos decorre que a concentração celular, durante a execução de um ciclo, pode ser considerada como aproximadamente

constante. Acrescente-se que, de um ciclo para outro, como se efetua a sedimentação para a retirada e descarte do sobrenadante, pode eventualmente ocorrer a perda de células com o efluente.

Comparando com valores reportados na literatura as velocidades específicas encontradas neste experimento são consideradas muito baixas. Leitão *et al.*, (2007) tendo submetido lodo de tratamento de esgoto doméstico ao mesmo procedimento de lavagem e trabalhando com um valor médio de $0,37 \text{ g SST.L}^{-1}$, obteve valores superiores a $3,4 \text{ g N-NH}_4.\text{g}^{-1} \text{ SST.d}^{-1}$, cerca de 10 vezes maiores que os registrados nas cinéticas 1 e 3. Estes mesmo autores observaram uma eliminação média de 35% do nitrogênio suprido ao reator.

Embora o sistema de controle de pH ainda não tivesse sido instalado neste período, não houve variações bruscas como é possível constatar nas tabelas (Apêndices), que pudessem causar danos ao sistema microbiano, como o acúmulo de amônia livre ou HNO_2 .

5.2.2 Ensaio julho/2009

Uma nova coleta de material foi realizada no mesmo ponto da ETE Canasvieiras no mês de julho. Desta vez aplicou-se, na lavagem, metade da vazão do processo anterior (68 mL.h^{-1}), resultando numa vazão específica de alimentação de $0,023 \text{ h}^{-1}$, o que também proporcionou o dobro do TRH (próximo a 2 dias) como é apresentado na Tabela 4.4. Os dados de concentração celular estão presentes na Figura 5.6, abaixo.

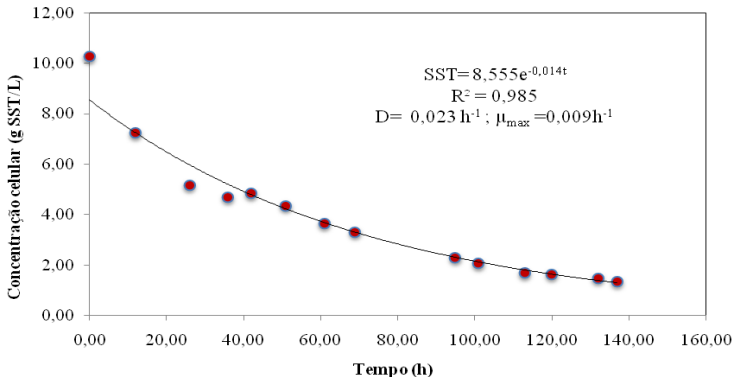


Figura 5.6 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.

A velocidade específica de crescimento celular obtida através do ajuste exponencial da curva foi de $\mu_{\max} = 0,009\text{h}^{-1}$, o triplo do valor anterior e acima do valor obtido por Leitão *et al.* (2007), de $1,25 \cdot 10^{-3} \text{h}^{-1}$ mas ainda inferior a valores encontrados por Wiessmann (1994), por exemplo, de $0,125\text{h}^{-1}$ trabalhando a 35°C também.

Embora a biomassa inicial tivesse uma concentração celular menor ($10,3\text{g SST.L}^{-1}$), o tempo total do processo se estendeu por quase 140 horas. Este período foi suficiente para que ocorresse atividade celular ainda durante a lavagem (também observado através do valor relativamente maior de μ_{\max}), motivo pelo qual a concentração de amônio atingida não chegou a $250\text{mg N-NH}_4.\text{L}^{-1}$, metade dos $500\text{mg N-NH}_4.\text{L}^{-1}$ presentes no meio introduzido no reator. Isto pode ser observado na Figura 5.7, juntamente com as concentrações de nitrito e nitrato desta fase.

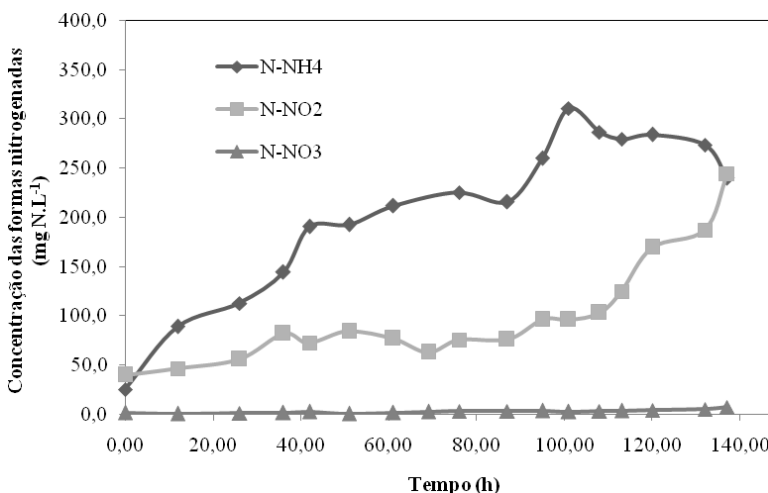


Figura 5.7 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.

Neste experimento foram realizadas cinco ciclos de alimentação após a lavagem, seguindo os mesmos procedimentos citados anteriormente. Na Figura 5.8 são apresentados os dados referentes às formas nitrogenadas ao longo de todos eles.

Cabe citar que, entre o quarto e quinto ciclos houve um intervalo de 10 dias em que a biomassa ficou armazenada a 4°C , sem fornecimento de oxigênio ou substrato.

Tappe *et al.* (1999), mostram que cultura de *Nitrosomonas europaea*, mantida por 17 dias em carência de oxigênio, recobrou totalmente a atividade em poucas horas de aeração, indicando a boa capacidade de “adaptação” destas bactérias.

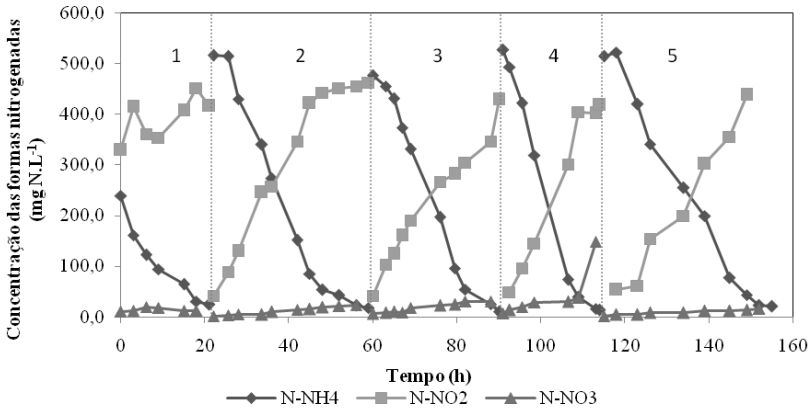


Figura 5.8 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das cinco cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.

Pode ser observado que o ensaio realizado na seqüência da lavagem foi o mais rápido entre todos, consequência da atividade microbiana ter se iniciado ainda na fase de lavagem. A alta concentração de nitrito ainda no período inicial poderia ter prejudicado o experimento, já que, por ser o substrato das BON, estaria favorecendo esse tipo de microrganismo em detrimento das BOA.

No quinto ciclo percebe-se um aumento significativo no tempo de processo que até então apresentava um comportamento de queda entre um ensaio e outro, como pode ser visto nos dados da Tabela 5.2. Também se observa um retrocesso na velocidade de consumo de amônio além da queda na concentração celular, consequências do período em que o lodo ficou estocado, sem atividade.

A alta remoção obtida na primeira cinética poderia levar a acreditar que a alta concentração de nitrito, formado ainda ao longo da lavagem, não interferiu de maneira negativa. Porém, não foi possível manter valores semelhantes de remoção nas cinéticas seguintes.

Tabela 5.2 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação.

	Tempo (h)	Remoção (%)	Xm (g SST.L ⁻¹)	QNH ₄ (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	QNO ₂ (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	21,0	52,78	1,48±0,24	0,17	0,16
Ciclo 2	37,0	10,56	1,28±0,08	0,39	0,28
Ciclo 3	30,0	11,03	1,06±0,16	0,51	0,25
Ciclo 4	23,0	21,71	1,31±0,1	0,56	0,32
Ciclo 5	40	11,52	0,93±0,14	0,36	0,32

Embora até a quarta cinética os valores das velocidades específicas de consumo de amônio e formação de nitrito fossem crescentes eles continuaram se apresentando bastante baixos quando comparados aos obtidos Leitão *et al.* (2006), que chegou a velocidades próximas a 10 g N-NH₄.g⁻¹ SST.d⁻¹, embora estivessem trabalhando com culturas que haviam passado por um período longo de adaptação.

Segundo Zdradek (2005) a respirometria é uma ferramenta bastante útil para quantificar o estado fisiológico das células. Portanto é de interesse utilizá-la neste trabalho como dado adicional para entender melhor o comportamento dos microrganismos. Foram realizadas determinações periódicas de velocidade de respiração celular, em intervalos de tempo aleatórios ao longo de cada ciclo deste e dos demais ensaios. A Figura 5.9 traz as velocidades específicas de consumo de oxigênio obtidas em cada ensaio respirométrico, e calculadas conforme indicado no item 4.6 (página 63) em função do tempo.

As velocidades específicas de respiração (QO₂) dos microrganismos foram determinadas nas condições operacionais aplicadas ao próprio processo, mudando-se apenas a velocidade de agitação para 200rpm, além da interrupção da aeração no reator. Ao longo de cada cinética a velocidade específica de respiração vai sofrendo um aumento, até seu valor máximo, quando os microrganismos estão em plena atividade.

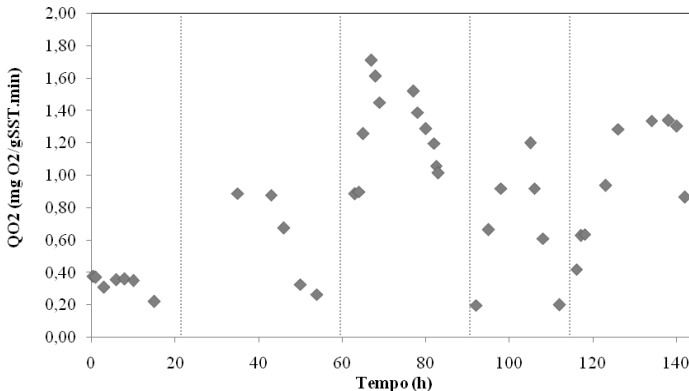


Figura 5.9 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.

Além do intervalo de tempo que os microrganismos ficam sem atividade, em virtude do tempo necessário para a sedimentação e retirada de sobrenadante, o substrato poderia influenciar de duas maneiras a velocidade de respiração. Quando está em concentrações elevadas poderia inibir a atividade dos microrganismos, principalmente no primeiro ciclo, quando ainda não estão totalmente adaptados às condições de operação, o que pode ser observado nos primeiros pontos do gráfico. Ao final de cada cinética, os níveis baixos de substrato se tornam limitantes da atividade microbiana e conseqüentemente do consumo de oxigênio.

A baixa eficiência na remoção de nitrogênio apresentada pelos processos nos experimentos realizados até este momento, principalmente quando comparados aos resultados obtidos por Leitão *et al.* (2006), que trabalhou com condições muito semelhantes às apresentadas aqui, levaram ao questionamento da qualidade do lodo coletado. Verificou-se que alguns problemas técnicos estariam comprometendo a qualidade do tratamento da ETE Canasvieiras, a qual recebe diariamente um volume considerável de resíduo de caminhões “limpa-fossas” com alta concentração de gorduras.

De acordo com os profissionais responsáveis pela estação, desde janeiro de 2009, havia problemas operacionais ligados a esta questão. Dificuldades na decantação do lodo (lodo não floculento), ausência de metazoários nas análises microscópicas do lodo – os quais são indicativos de qualidade em sistemas de tratamento de esgoto – e turbidez na saída do efluente. Fatores que revelam o comprometimento da qualidade da biomassa coletada.

5.2.3 Ensaio Agosto/2009

Constatado o problema com lodo da ETE Canasvieiras, a coleta passou a ser efetuada na ETE Insular, na região central de Florianópolis. Procurando por uma biomassa mais ativa e homogênea, o ponto de coleta escolhido foi a parte central do reator de lodo ativado da estação.

Na Figura 5.10 encontram-se os dados de acompanhamento da concentração celular ao longo do período de lavagem do lodo, a qual foi realizada com uma vazão de alimentação de $67,3 \pm 3,8 \text{ mL.h}^{-1}$ e uma vazão específica de alimentação de $0,022 \text{ h}^{-1}$.

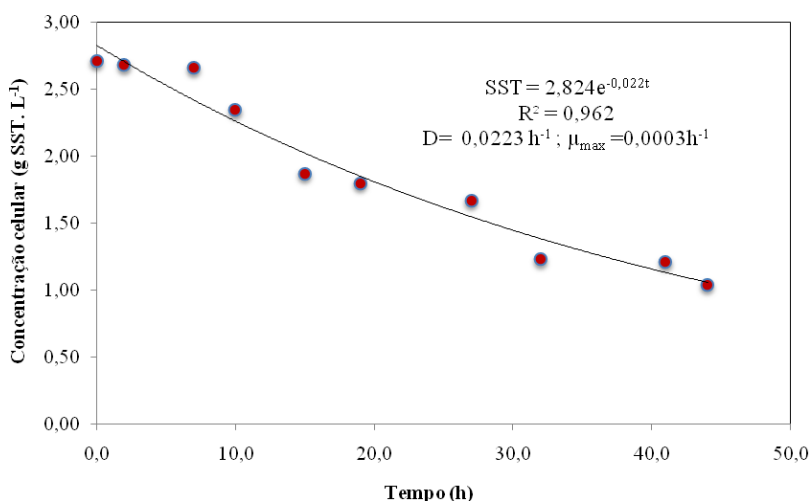


Figura 5.10 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.

Como é possível verificar, mesmo trabalhando com uma vazão específica de alimentação bastante baixa e, conseqüentemente, um tempo de retenção hidráulica próximo a dois dias, o tempo total da lavagem foi de pouco mais de 40 horas. Isso porque a concentração celular encontrada no lodo coletado era relativamente baixa ($2,71 \text{ g SST.L}^{-1}$). Estes fatores contribuíram para uma das velocidades específicas de crescimento mais baixas entre todos os ensaios de $0,0003 \text{ h}^{-1}$.

Ainda na Figura 5.10, é visível uma dispersão maior nos valores plotados, reflexo da dificuldade em manter a vazão de entrada regular,

além da baixa concentração celular inicial, que acabava sendo bastante influenciada por qualquer perda adicional de biomassa como, por exemplo, a adesão de células na parede do reator, o que é comum de acontecer diante da velocidade de agitação com que se trabalhava.

A Figura 5.11 que traz as concentrações das formas nitrogenadas durante este período.

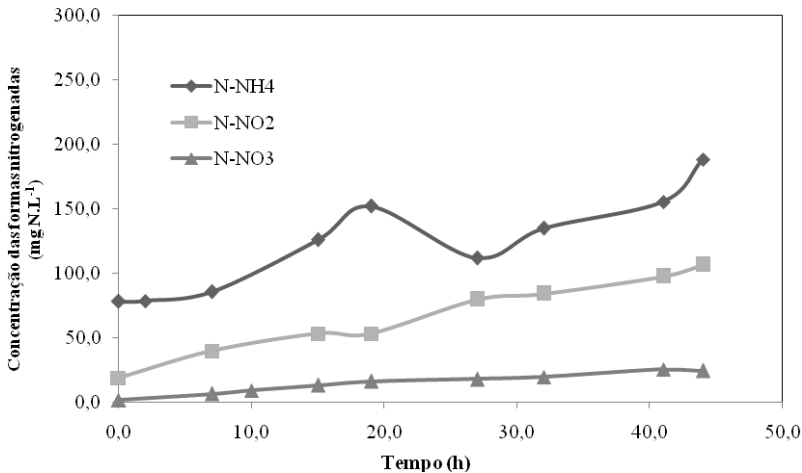


Figura 5.11 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.

O acúmulo de amônio esperado, em função de sua alta concentração no meio de alimentação, não se consumiu, uma vez que houve geração de nitrito e até mesmo de nitrato, formas que, durante a lavagem, esperava-se ficarem em níveis mais baixos.

Na seqüência da lavagem foram realizados 6 ciclos de alimentação, lembrando que o primeiro deles tem início no mesmo momento em que o processo de lavagem é encerrado e os demais são intercalados com períodos reservados à decantação da biomassa para posterior alimentação em batelada. As formas nitrogenadas monitoradas ao longo das cerca de 140 horas de experimento, referentes às cinéticas estão expostas na Figura 5.12.

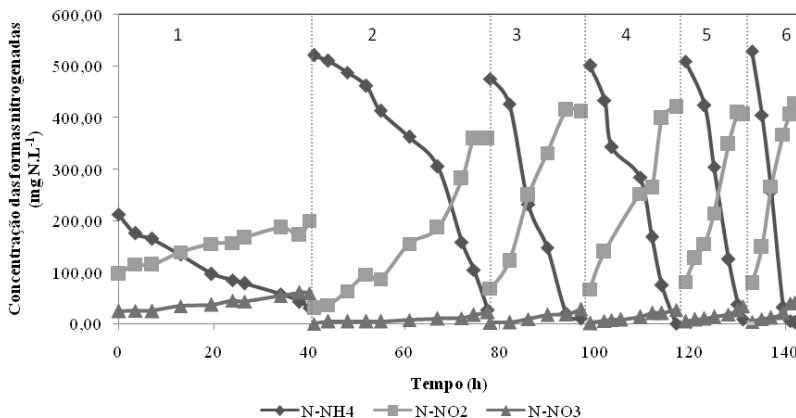


Figura 5.12 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.

No quarto ciclo, um problema no sistema de controle do pH permitiu que este chegasse a valores abaixo de 6,5. Através do próprio gráfico é possível constatar uma mudança de comportamento no consumo de amônio entre o terceiro e quarto pontos de amostragem, indicando uma provável inibição do sistema. Zdradek (2005) trabalhando com processo de nitrificação constatou inibição acentuada do sistema para valores de pH abaixo de 7,0 e concentrações elevadas de nitrito. Anthonisen *et al.* (1976), indica a ocorrência de inibição da nitrificação pelo HNO_2 na faixa de 0,22 e 2,8mg N.L⁻¹. Neste caso, chegou-se a uma concentração de 0,64 mg.L⁻¹ de ácido nitroso.

No quinto ciclo o sistema de aquecimento também apresentou problemas e o reator trabalhou em temperatura ambiente nas primeiras horas. Fica claro que a influencia do pH é maior que da temperatura, já que neste ciclo o sistema não demorou em se recuperar, apresentando, inclusive, a melhor remoção entre todos os ciclos. As porcentagens de remoção, velocidades de consumo de amônio e produção de nitrito, além das concentrações celulares médias de cada ciclo, são apresentadas na Tabela 5.3.

Pelos dados da Tabela 5.2, a queda na concentração celular entre as cinéticas não interferiu de maneira negativa nas variáveis observadas e, apesar das questões levantadas na lavagem, ou dos problemas técnicos que surgiram, este experimento conta com valores de remoção mais constantes e relativamente altos em relação aos obtidos anteriormente.

Tabela 5.3 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 6 ciclos de alimentação.

	Tempo (h)	Remoção (%)	X_m (g SST.L ⁻¹)	Q_{NH_4} (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	Q_{NO_2} (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	40,0	24,28	1,01±0,07	0,10	0,06
Ciclo 2	36,5	28,75	0,81±0,09	0,49	0,27
Ciclo 3	19,0	20,75	0,9±0,07	0,87	0,60
Ciclo 4	18,0	24,31	0,77±0,08	0,87	0,60
Ciclo 5	12,0	29,14	0,74±0,08	1,91	1,05
Ciclo 6	9,0	26,37	0,73±0,09	2,33	1,51

É possível de se observar também um aumento nas velocidades específicas de consumo de amônio e produção de nitrito especialmente entre as últimas cinéticas, valores superiores aos registrados por Campos *et al.* (2007), de até 0,6g N-NH₄. g⁻¹ SSV.d⁻¹, considerando que SSV=0,8SST, ainda teríamos 0,75g N-NH₄. g⁻¹ SST.d-1, ao trabalhar com limitação de oxigênio dissolvido em reator nitrificante.

A Figura 5.13 ainda traz as velocidades específicas de consumo de oxigênio obtidas a partir das respirometrias realizadas ao longo do experimento.

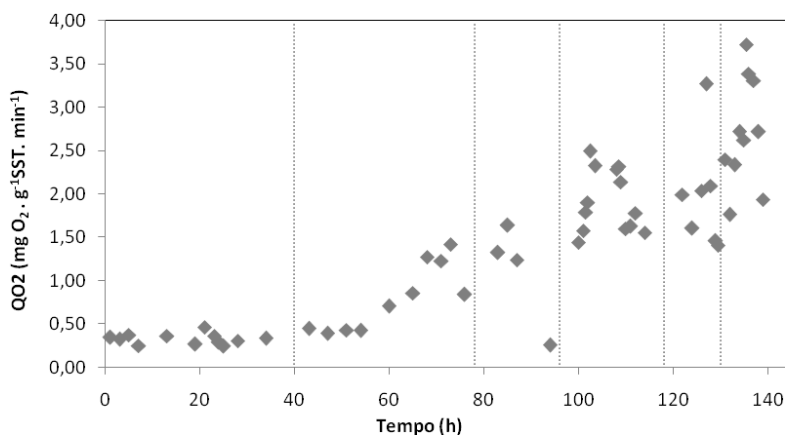


Figura 5.13 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.

Pode-se observar que, medida em que se tem valores maiores para a velocidade específica de respiração, conta-se com tempos menores de ciclo, ou seja, com maiores velocidades de oxidação do amônio.

A queda dos valores de QO_2 nas atividades respirométricas realizadas mais próximas ao fim de cada ciclo, comportamento observado em todos os ensaios, pode ter explicação tanto na baixa concentração de substrato quanto na presença de alta concentração de nitrito. Stein e Arp (1998) *apud* Kieling (2004) sugeriram que a presença de nitrito em concentrações acima de 128 mg N- NO_2/L poderia provocar inativação enzimática irreversível das BOA.

Para Ferreti (2005), assim como neste trabalho, a redução de QO_2 observada, mesmo quando a medida foi realizada em presença de quantidades maiores de nitrito, não se apresentou de forma tão significativa quanto descrito na literatura. Isto pode ter explicação na adaptação gradativa das células às altas concentrações, tanto de amônio, quanto de nitrito.

Na Figura 5.14 estão indicadas as velocidades de consumo de oxigênio obtidas experimentalmente em função das velocidades de consumo de amônio. A título de comparação foram calculadas as velocidades de consumo de oxigênio teóricas, considerando que todo amônio presente no meio fosse oxidado a nitrito, conforme a estequiometria do processo de nitrificação:

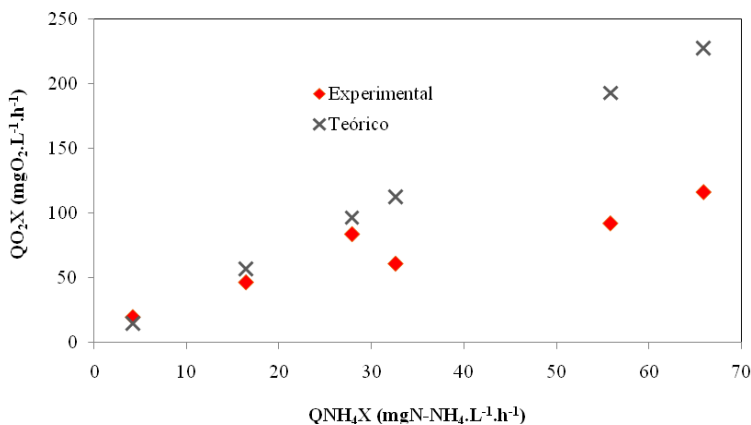
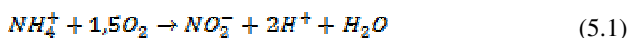


Figura 5.14 - Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) em função da velocidade de consumo de amônio (QNH_4X).

Os valores de QO_2X foram obtidos considerando-se as médias dentro da faixa de valores em que situava-se a maior parte das respirometrias realizadas em de cada ciclo.

Nota-se que, para valores de $QN\text{H}_4X$ mais elevados, os valores de QO_2X experimentais são inferiores àqueles previstos pela estequiometria do processo, o que pode estar indicando que o amônio não foi todo oxidado a nitrito, evidenciando a ocorrência de uma via metabólica distinta, possivelmente, a desnitrificação aeróbia através do processo NO_x .

Como a adoção de uma vazão específica de alimentação menor na lavagem não apontou vantagens consideráveis ao processo, apenas servindo para tornar essa mais demorada optou-se por adotar, nos experimentos seguintes, a maior vazão entre as ensaiadas.

5.2.4 Ensaio setembro/2009

Uma nova coleta de lodo foi realizada no dia 22 de setembro de 2009 no mesmo local da anterior. Neste ensaio optou-se por voltar a imprimir uma vazão maior para a lavagem ($122,5 \pm 3,7 \text{ mL.h}^{-1}$) garantindo uma vazão específica de alimentação de $0,041 \text{ h}^{-1}$ e um TRH próximo a um dia. A Figura 5.15 mostra os dados da concentração celular em queda.

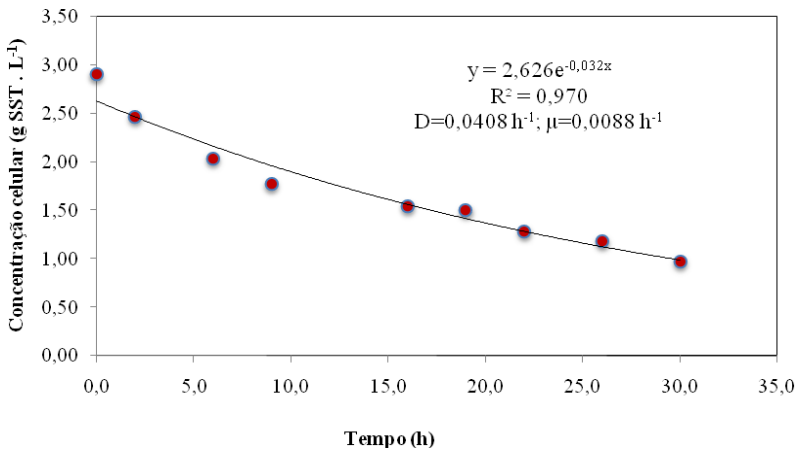


Figura 5.15 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.

Considerando que a concentração celular do lodo coletado continuou inferior a 3 g SST.L^{-1} o período de lavagem resultante foi ainda menor que o ensaio de agosto. Esses fatores, juntamente com a vazão mais elevada aplicada, resultaram num valor de $\mu_{\max}=0,0088 \text{ h}^{-1}$, obtido através do ajuste exponencial da curva. Embora não esteja entre as velocidades específicas de crescimento mais baixas registradas neste trabalho, este valor é maior do que o registrada por Leitão et al. (2006), de, aproximadamente, $0,0013 \text{ h}^{-1}$.

A Figura 5.16 traz as concentrações das formas nitrogenadas ao longo da lavagem.

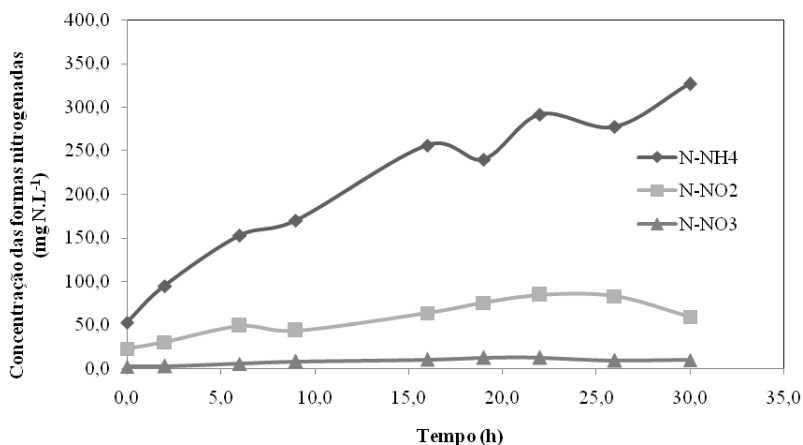


Figura 5.16 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.

Mesmo com apenas 30 horas de lavagem houve um acúmulo maior de amônio no sistema, embora ainda se observe formação de nitrito. Os baixos níveis de nitrato confirmam que praticamente não houve atividade por parte dos microrganismos oxidadores de nitrito.

Após a lavagem foram realizados sete ciclos de alimentação, acompanhando cinéticas de consumo de amônio. Adotaram-se os mesmos procedimentos dos experimentos anteriores. Na Figura 5.17 são apresentados os dados referentes às concentrações das formas nitrogenadas no reator ao longo dos ensaios.

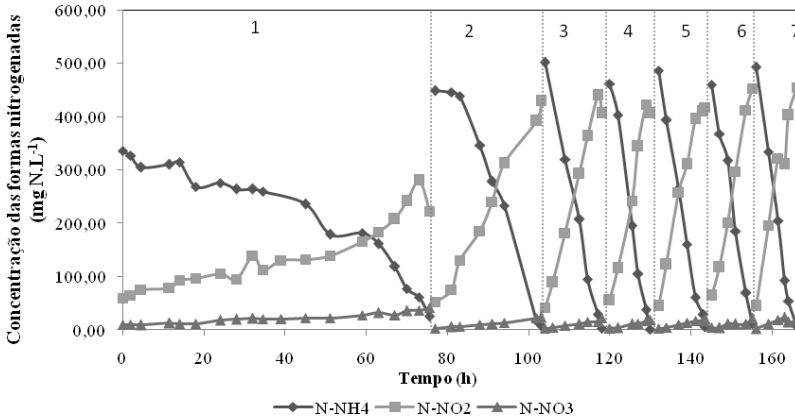


Figura 5.17 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.

É notável que a velocidade de queda na concentração de amônio aumenta ao longo da seqüência de ensaios, indicando uma adaptação dos microrganismos às altas concentrações iniciais de substrato. Conforme esperado, não é observada formação significativa de nitrato, refletindo uma lavagem eficiente, além da condução do próprio processo de forma adequada.

Na Tabela 5.4 é possível observar mais claramente essa evolução gradativa do processo principalmente em relação aos valores de Q_{NH_4} e Q_{NO_2} .

Tabela 5.4 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 7 ciclos de alimentação.

Tempo (h)	Remoção (%)	X_m (g SST.L ⁻¹)	Q_{NH_4} (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	Q_{NO_2} (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	75,5	37,31	0,89±0,03	0,14
Ciclo 2	26	10,35	0,76±0,09	0,70
Ciclo 3	14	22,96	0,88±0,06	0,99
Ciclo 4	10	20,42	0,72±0,11	1,67
Ciclo 5	11,5	19,02	0,72±0,11	1,57
Ciclo 6	10	9,47	0,69±0,05	1,59
Ciclo 7	10	12,10	0,69±0,05	1,94

Os valores de velocidade específicas de consumo de amônio encontrados neste experimento e no anterior (Agosto/2009) são os maiores encontrados ao longo de todos os experimentos realizados, enquanto Leitão *et al.* (2006), trabalhando com lodo nitrificante, previamente adaptado por longo período, atingiu velocidades de até $9,3\text{gN g}^{-1}\text{SST. d}^{-1}$ em seus experimentos, demonstrando a importância da adaptação prévia da biomassa.

Embora as velocidades específicas de consumo de amônio e formação de nitrito tenham sido relativamente elevadas, isto não se refletiu nas porcentagens de remoção obtidas, principalmente, nos dois últimos ciclos.

A Figura 5.18 traz a evolução das velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo dos sete ciclos.

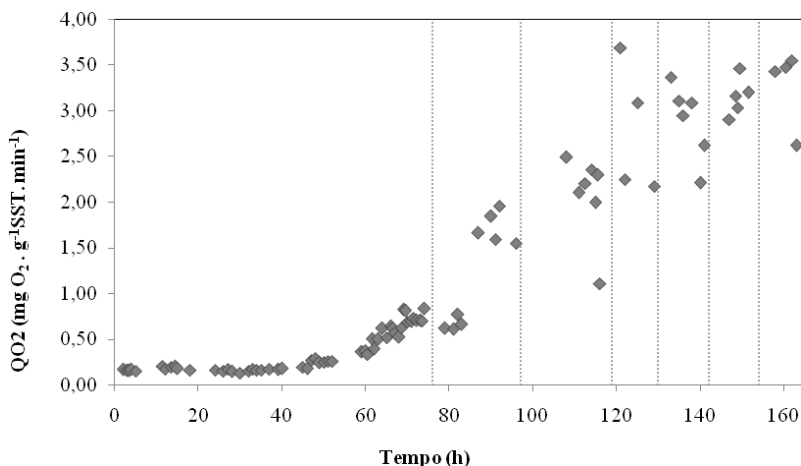


Figura 5.18 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.

Novamente, a tendência global dos valores de QO_2 é um aumento gradativo ao longo do tempo. Contudo, quando se observa isoladamente um dos ciclos (cada divisória do gráfico representa um ciclo), percebe-se que os pontos não definem uma constância de valores (conforme já observado nos ensaios anteriores), mas uma tendência a aumento e depois a um decréscimo, atingindo um ponto de máximo. Neste caso, tanto a redução na quantidade de substrato disponível e, conseqüentemente a ser oxidada, quanto a presença de uma grande concentração de nitrito podem ser fatores de influência.

Zdradek (2005) trabalhando com nitrificação parcial em SBR observou que a velocidade de respiração celular não pareceu ser afetada por variações nas concentrações de amônio ou nitrito e nem mesmo o acúmulo das concentrações deste último (valores de até $490\text{mg N-NO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) parece ter tido efeito inibitório.

Na Figura 5.19 é feito o comparativo entre as velocidades de consumo de oxigênio experimental e estequiométrica em função de $\text{QN}_{\text{H}_4\text{X}}$.

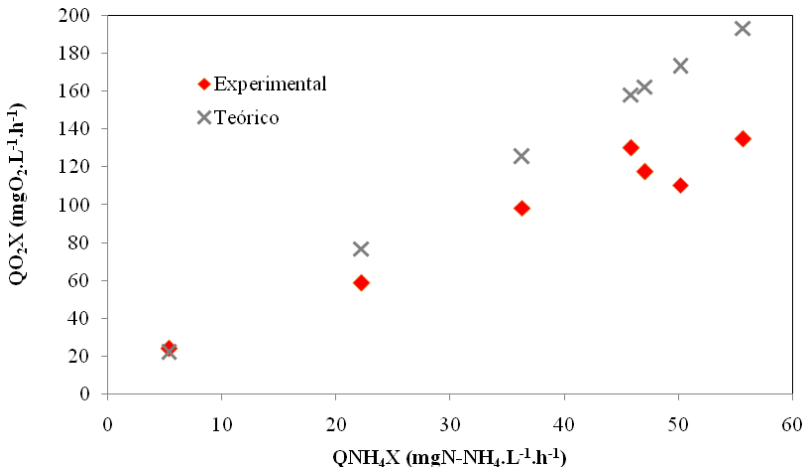


Figura 5.19 - Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) em função da velocidade de consumo de amônio ($\text{QN}_{\text{H}_4\text{X}}$).

O mesmo efeito observado anteriormente ocorre aqui, com velocidades experimentais de respiração celular estando abaixo das obtidas através da estequiometria proposta para a etapa de nitrificação. Este mesmo tipo de fenômeno é observado por Leitão *et al.* (2006), trabalhando com processo semelhante.

O lodo coletado diretamente do tanque de aeração não era denso suficiente para proporcionar um período de lavagem satisfatório, principalmente em relação à aclimação. Isso pode ser verificado pelo tempo extremamente longo da cinética conduzida na sequência da lavagem. A nova estratégia adotada foi a coleta no tanque de reciclo de lodo.

5.2.5 Ensaio de Outubro/2009

A partir deste ensaio passou-se a coletar o lodo no tanque de reciclo da ETE Insular, buscando uma concentração celular maior e proporcionando assim um período de lavagem mais longo para tornar a seleção mais efetiva.

Após ser coletado na estação o lodo passou por um período de decantação e retirada do sobrenadante, para evitar a presença de formas nitrogenadas ainda no início do processo. O mesmo foi re-suspensão, em volume menor, com meio de composição semelhante ao utilizado na lavagem, apenas livre de amônia e bicarbonato. Isto resultou em um inóculo adensado, ou seja, com uma concentração celular maior.

A Figura 5.20 mostra a variação da concentração celular durante a lavagem do lodo, na qual a vazão de alimentação empregada foi de $121,8 \pm 4,8 \text{ mL.h}^{-1}$, resultando numa vazão específica de alimentação de $0,0406 \text{ h}^{-1}$ e um TRH de 1,03 dia.

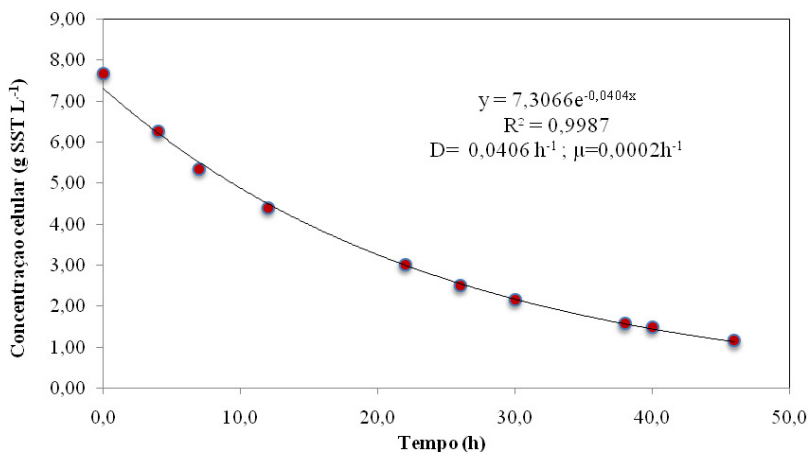


Figura 5.20 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.

Após 42 horas de lavagem a velocidade específica máxima de crescimento dos microrganismos foi de $0,0002 \text{ h}^{-1}$, o valor mais baixo encontrado entre todos os experimentos, o que reflete tanto a heterogeneidade do lodo quanto uma provável condição de baixa atividade das bactérias devido ao novo local de coleta. A baixa atividade celular, porém, possibilitou um acúmulo maior do amônio presente no meio de alimentação, menor geração de nitrito ao longo do

processo e praticamente nenhuma geração de nitrato, como pode ser visto na Figura 5.21.

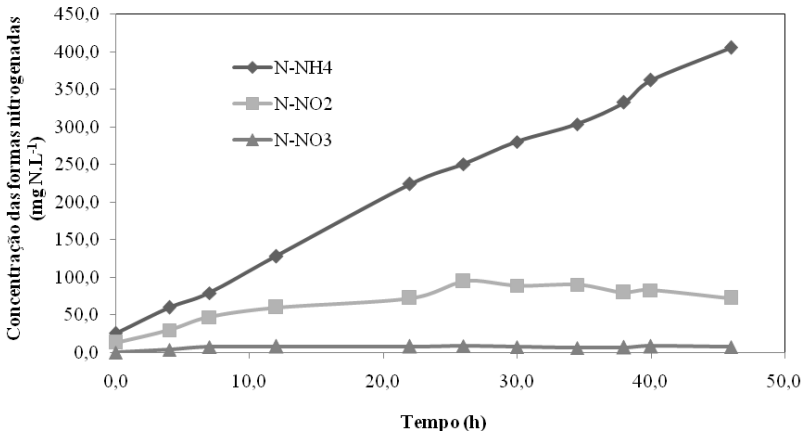


Figura 5.21 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.

Na Figura 5.22 são apresentadas as variações das concentrações das formas nitrogenadas em função do tempo, nas seis cinéticas referentes aos ciclos de alimentação que se seguiram após a lavagem.

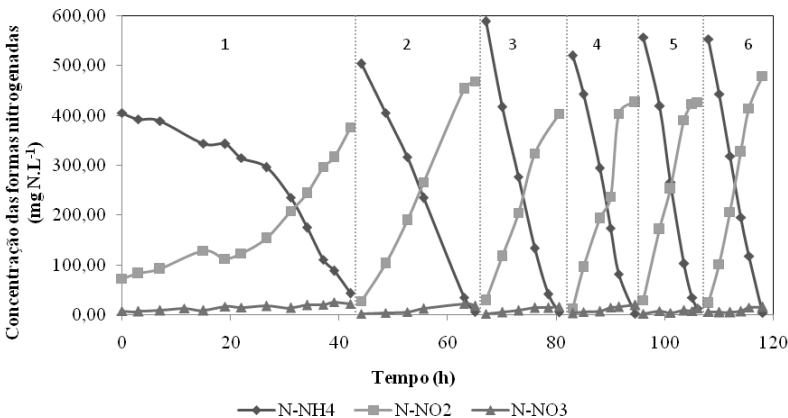


Figura 5.22 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.

Assim como no experimento anterior, o processo evolui ao longo dos ensaios cinéticos em termos de consumo de substrato, inclusive nas

velocidades específicas de consumo de amônio e formação de nitrito. O desequilíbrio entre as populações de microrganismos fica claro quando se observa as baixas concentrações de nitrato ao longo de todos os ciclos.

Apenas o comportamento em relação à eficiência de remoção de nitrogênio se apresentou instável, como se pode observar na Tabela 5.5. Apesar disso, no terceiro ciclo tem-se uma das melhores remoções de nitrogênio obtidas neste trabalho (33%). Embora autores como Zart e Bock (1998) cheguem a 50% de remoção, esses autores trabalham com acréscimo de NO na corrente de aeração, promovendo a remoção de nitrogênio, segundo o processo NOx, conforme proposto por Schimdt *et al.* (2003).

Tabela 5.5 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 6 ciclos de alimentação.

	Tempo (h)	Remoção (%)	X_m (g SST.L ⁻¹)	QNH ₄ (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	QNO ₂ (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	42,0	10,8	1,16±0,02	0,28	0,25
Ciclo 2	21,0	8,2	0,91	0,65	0,58
Ciclo 3	13,5	33,07	1,03±0,09	1,11	0,67
Ciclo 4	11,5	16,95	0,88±0,11	1,41	1,12
Ciclo 5	10,0	24,36	0,78±0,05	1,86	1,39
Ciclo 6	10,0	14,87	0,67±0,06	2,11	1,90

Os valores de QNH₄ ainda podem estar bastante abaixo dos obtidos por alguns autores, contudo, quando comparado com valores determinados por Zdradek (2005) de 0,44g N-NH₄.g⁻¹SST.d⁻¹, que operou um reator nitritante em condições próximas às aplicadas neste trabalho, a partir do segundo ciclo todos são superiores, com o último chegando a ser quase cinco vezes maior.

Os cálculos para concentrações de HNO₂ revelaram valores irrelevantes. Os valores de amônia livre (NH₃) se apresentam um pouco mais elevados no início de cada ciclo. Isto se dá em função da alcalinidade elevada do meio inicial, condição necessária para tamponar a reação de nitrificação que, como visto anteriormente, libera íons H⁺ acidificando o meio. No início do quinto ciclo tem-se algo em torno de

22mg N-NH₃.L⁻¹ (Tabelas nos Apêndices), poderia significar alguma inibição, conforme sugerido por Anthonisen *et al.* (1976), ou seja, a partir de 10mg N-NH₃.L⁻¹.

Na Figura 5.23 estão expostos os resultados obtidos nas respirometrias realizadas, com os valores de QO₂ em função do tempo.

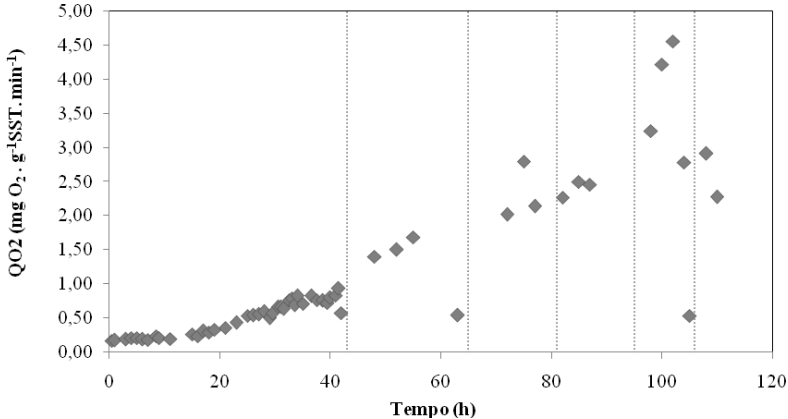


Figura 5.23 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo, ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.

O comportamento apresentado ao longo do tempo se assemelha aos resultados obtidos nos ensaios anteriores, em que a disponibilidade de substrato parece influenciar na velocidade específica de respiração celular. Contudo, de forma geral, existe uma evolução dos valores à medida que mais ciclos cinéticos são realizados, indicando uma adaptação e aumento da eficiência da biomassa na proporção em que o processo se estabelece.

A Figura 5.24 traz as velocidades de consumo de oxigênio, obtidas experimentalmente ao longo dos seis ciclos de alimentação, em função das velocidades de consumo de amônio. Também constam as velocidades de respiração celular obtidas estequiometricamente, caso toda concentração de amônio tivesse sido convertida a nitrato.

Novamente, para valores mais elevados de QNH₄X, os valores experimentais de QO₂X não fecham com os estequiométricos, mostrando que parte do amônio não foi oxidado pela reação convencional de nitrificação.

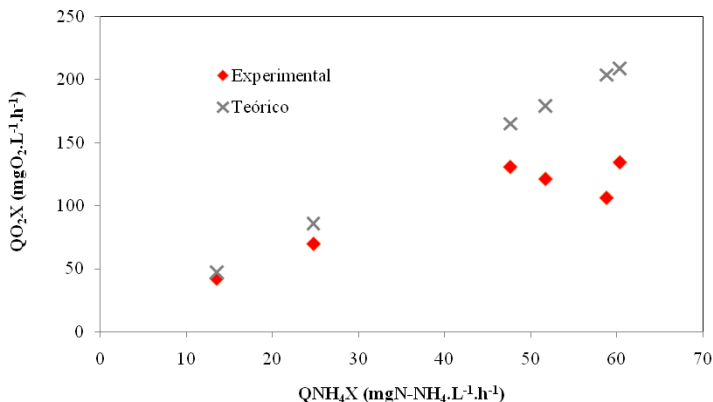


Figura 5.24 - Velocidade de consumo de oxigênio (QO₂X) em função da velocidade de consumo de amônio (QNH₄X).

5.2.6 Ensaio de Janeiro/2010

Sentindo a necessidade de dados comparativos para demonstrar a real importância da lavagem, enquanto ferramenta de seleção de microrganismos e garantia de resultados mais eficientes no processo, partiu-se para uma nova estratégia com a realização de ensaios sem a lavagem do lodo ao mesmo tempo que aqueles em que esta etapa tenha sido aplicada.

Em janeiro/2010, após um período de espera de 10 dias para restabelecimento do sistema de tratamento da CASAN, o qual sofreu danos com a elevação acima do normal da maré, efetuou-se uma nova coleta de lodo para a realização de dois experimentos concomitantes, sendo um com lavagem do lodo e outro apenas a diluição gradual de uma parcela de lodo, a fim de obter nos dois ensaios uma concentração celular próxima a 1g SST.L⁻¹. Ambos chegando a uma concentração celular similar e, então, dando início às cinéticas de consumo de amônio.

A realização simultânea dos ensaios teve por objetivo garantir a ambos as mesmas condições de operação, inclusive no que se refere à procedência do lodo inoculado em cada reator.

Ensaio com lavagem do lodo (Ensaio1)

Para facilitar a discussão nomeou-se este como sendo o “Ensaio1”. As condições aplicadas durante a lavagem foram as mesmas

dos demais experimentos. Partindo de uma concentração celular de $7,7\text{g SST}\cdot\text{L}^{-1}$ e aplicando uma vazão de $118 \pm 5,9\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$. O processo de lavagem se estendeu por um período de 48 horas, como pode ser visto na Figura 5.25.

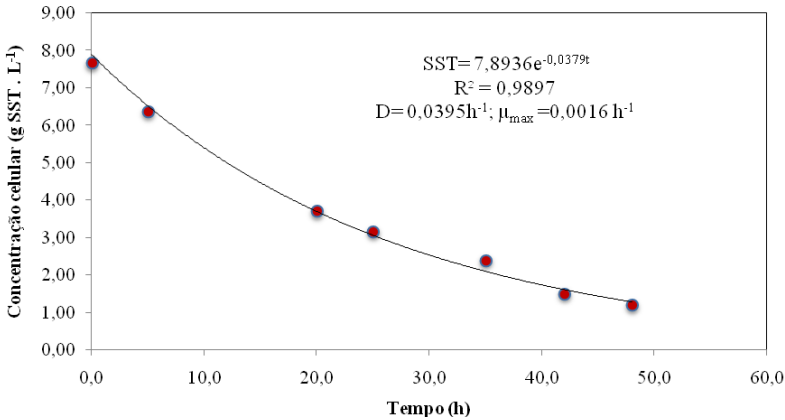


Figura 5.25 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.

Através do ajuste exponencial da curva de concentração celular em função do tempo chegou-se a uma velocidade específica máxima de crescimento celular de $0,0016\text{h}^{-1}$. A Figura 5.26 traz os dados de concentração das diferentes formas nitrogenadas ao longo da lavagem.

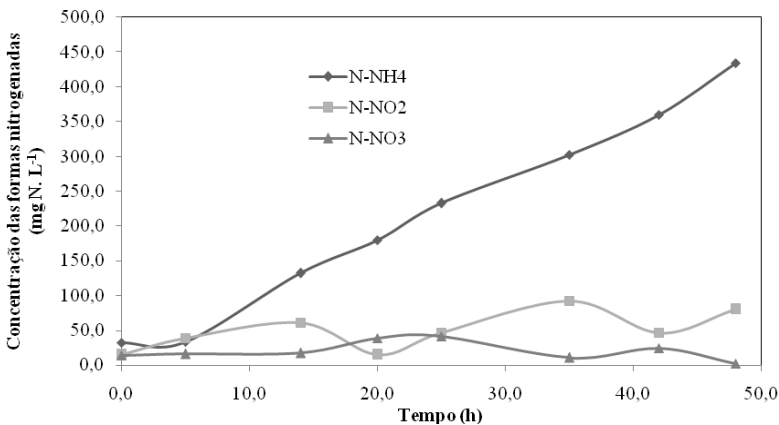


Figura 5.26 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.

Apesar da oscilação apresentada na concentração de nitrito e nitrato, demonstrando uma possível atividade do lodo, eles permanecem em níveis baixos enquanto o aumento na concentração de nitrogênio amoniacal tem um comportamento bem próximo do linear. Cinco ciclos de alimentação se seguiram à lavagem. Lembrando que, como nos experimentos anteriores, o início do primeiro se dá no instante em que a concentração celular chega próxima ao valor esperado, na lavagem, e então o reator passa a ser operado como um SBR. Os demais ciclos cinéticos se dão sempre após um período de decantação do lodo, retirada do sobrenadante e nova alimentação.

Na Figura 5.27 são encontrados os dados de acompanhamento das concentrações de amônio, nitrito e nitrato durante os ensaios cinéticos.

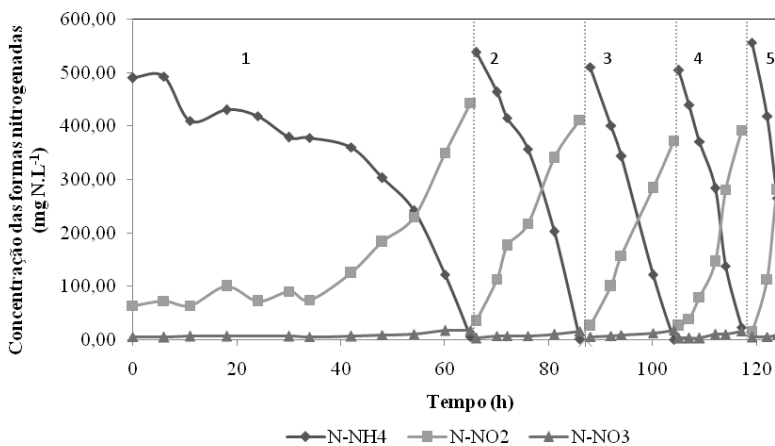


Figura 5.27 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.

A primeira cinética apresenta uma queda bastante lenta nas primeiras 40 horas, apontando um período de adaptação da biomassa às condições aplicadas. A partir do segundo ensaio o comportamento do gráfico passa a ser linear e o tempo de processo é reduzido significativamente, chegando às 10 horas no último ciclo, tempo mínimo alcançado nos experimentos até aqui. A velocidade específica de consumo de substrato também aumenta gradativamente, assim como o QNO_2 , como pode ser visto na Tabela 5.6.

Conforme esperado, as concentrações de nitrato se mantiveram baixas durante todo o experimento.

Tabela 5.6 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação.

	Tempo (h)	Remoção (%)	X_m (g SST.L ⁻¹)	Q_{NH_4} (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	Q_{NO_2} (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	65,0	19,12	0,92±0,12	0,24	0,31
Ciclo 2	20,0	27,48	0,78±0,09	0,81	0,58
Ciclo 3	16,0	29,52	0,79	0,99	0,67
Ciclo 4	12,0	21,03	0,65	1,57	1,17
Ciclo 5	10,0	20,04	0,78	1,75	1,36

Os valores de concentração celular, não acompanhados de um “intervalo de confiança da média”, são médias obtidas a partir de apenas duas ou três amostras, cujos valores são bastante próximos (vide Apêndices).

Embora a terceira cinética ainda apresente um Q_{NH_4} baixo é nela que se verifica a maior remoção de nitrogênio deste ensaio (próximo a 30%).

Na Figura 5.28 constam os valores de Q_{O_2} em função do tempo medidos apenas ao longo dos dois primeiros ciclos cinéticos.

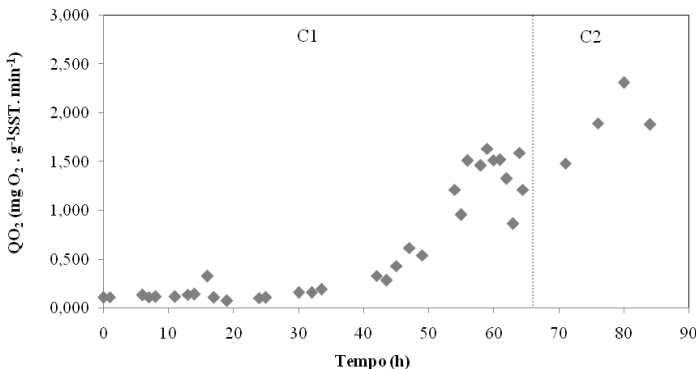


Figura 5.28 - Velocidades específicas de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo de duas, das cinco cinéticas realizadas neste ensaio.

A velocidade específica de respiração parte de valores muito baixos e, inclusive, de difícil determinação nos instantes iniciais, apresentando um aumento significativo ainda no primeiro ciclo. No

segundo, atinge valores da ordem de $2,4\text{mg O}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{SST}\cdot\text{min}^{-1}$, valores da ordem de 10 vezes o inicial.

Ferreti (2009) encontrou comportamento semelhante no que se trata das velocidades específicas de respiração, em relação à concentração de amônio disponível no reator. Para o autor, a operação do reator em baixas concentrações de substrato se apresenta desvantajosa, ressaltando que existe um limite para a contribuição de substrato sobre a atividade, uma vez que a amônia livre pode ser um inibidor da atividade das oxidadoras de amônio

Ensaio sem lavagem do lodo inoculado (Ensaio 2)

Neste ensaio, foram utilizados 450 mL do mesmo lodo submetido à lavagem no Ensaio 1, quantidade necessária para, após diluição no meio até completar os 3L de volume do reator, garantir uma concentração de cerca de $1\text{g SST}\cdot\text{L}^{-1}$. Após inoculado e completado o volume com meio (de mesma composição do ensaio anterior) até 600mL, procedeu-se um período de 15 horas de aclimação, nas mesmas condições de temperatura, aeração e pH utilizadas na lavagem. Após este período, o enchimento do reator foi feito de maneira gradual com vazão de entrada do meio de cerca de $80\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$.

Na Figura 5.29 constam os valores das concentrações das formas nitrogenadas acompanhados, analiticamente, durante os cinco ciclos de alimentação efetuados.

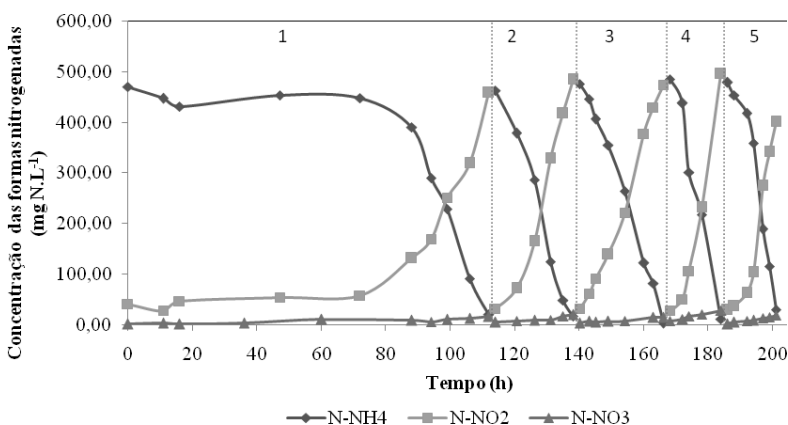


Figura 5.29 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas.

As primeiras amostras, retiradas ainda na etapa de enchimento do reator, apresentaram certa dificuldade para serem filtradas. Observou-se a presença de uma substância coloidal no meio. Ao mesmo tempo, a sedimentabilidade da biomassa neste ensaio foi relativamente melhor que no Ensaio 1.

Mesmo havendo um período prévio de adaptação da biomassa – um total de 48 horas entre aclimação e enchimento gradual do reator – a primeira cinética teve um longo período inicial. Só a partir de 80 horas inicia-se o consumo de amônio. Já fica evidente a importância da lavagem enquanto forma de adaptação da biomassa.

Nos ciclos seguintes o processo ocorre de maneira mais parecida com os ensaios anteriores, diminuindo drasticamente o período necessário para o consumo de todo o substrato, como é possível verificar na Tabela 5.7, que também mostra a evolução gradual das velocidades específicas de consumo de amônio e formação de nitrito.

Tabela 5.7 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação.

	Tempo (h)	Remoção (%)	X_m (g SST.L ⁻¹)	Q_{NH_4} (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	Q_{NO_2} (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	112,0	4,04	0,96±0,05	0,28	0,24
Ciclo 2	24,0	-	0,89	0,55	0,54
Ciclo 3	26,0	4,04	0,72	0,64	0,60
Ciclo 4	16,0	-	0,90	0,89	0,99
Ciclo 5	15,0	13,36	0,95	1,12	1,01

Os valores das velocidades específicas de formação de N-NO₂ se aproximam muito mais dos valores de velocidade específica de consumo de N-NH₄, do que o observado nos ensaios anteriores, o que pode revelar um acúmulo menor de intermediários e, conseqüentemente, menor remoção, conforme proposta feita por Leitão *et al.* (2006). De fato, as porcentagens de remoção são bem inferiores às apresentadas anteriormente, havendo ciclos em que essa remoção não existiu. Inclusive as velocidades específicas de consumo de N-NH₄ são menores do que as observadas no Ensaio 1, a não ser para o Ciclo 5, no qual já se observa uma eliminação da ordem de 13%. Isto indica que uma seleção

também deve estar em curso ao longo das cinéticas.

Foram realizados ensaios respirométricos ao longo dos três primeiros ciclos deste ensaio. Os resultados estão expostos na Figura 5.30.

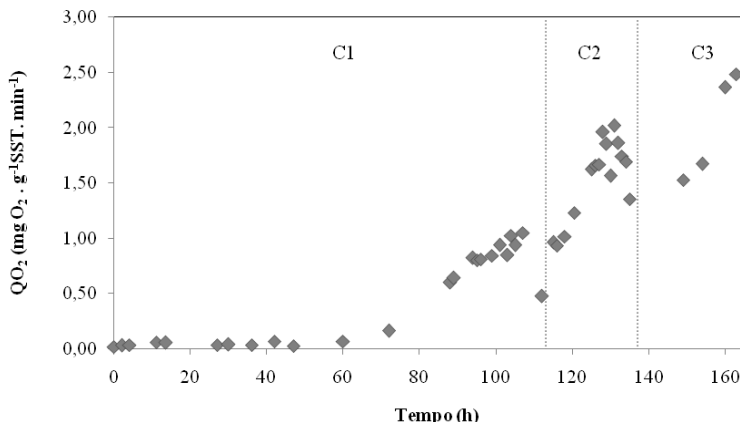


Figura 5.30 - Velocidades de consumo de oxigênio em função do tempo ao longo das seis cinéticas realizadas para este ensaio.

Embora os valores de QO₂ iniciais sejam ainda mais baixos que os obtidos nos ensaios anteriores, existe a mesma tendência de aumento gradativo. Neste caso, no terceiro ciclo já se observam medidas próximas aos 2,5 mg O₂ · g⁻¹SST · min⁻¹, valores atingidos no segundo ciclo do ensaio conduzido após a lavagem do lodo, o que volta a indicar que uma seleção entre a população microbiana estaria em curso.

5.2.7 Ensaios de Março/2010

Dois últimos ensaios concomitantes foram realizados para avaliar a influência da relação entre o substrato e a concentração celular (S_0/X_0) no processo estudado. Em ambos o lodo, após ser coletado na ETE Insular, passou pelo processo de lavagem, entre os quais se procurou manter a maior uniformidade possível das características. O meio utilizado na lavagem era exatamente o mesmo para ambos, assim como vazão de aeração (3L · min⁻¹), velocidade de agitação (400rpm) e temperatura do sistema (35°C). As pequenas variações sofridas foram em decorrência dos equipamentos utilizados, principalmente no que se refere às bombas peristálticas utilizadas na alimentação.

Após a realização das lavagens, efetuaram-se dois ciclos cinéticos em igualdade de condições em cada ensaio. A seguir, em um dos ensaios (Ensaio 1) utilizou-se meio de cultivo com a metade da concentração de amônio (aproximadamente 250mg N.L^{-1}), enquanto que no outro ensaio (Ensaio 2) manteve-se a concentração de amônio no valor costumeiro (cerca de 500mg N.L^{-1}). As variações de concentração celular após a lavagem foram decorrentes do próprio processo, não havendo retirada ou adição de células intencionalmente.

Ensaio 1

A lavagem foi efetuada com uma vazão de alimentação de $118,2\pm 4,8 \text{ mL.h}^{-1}$, $D=0,04\text{h}^{-1}$, proporcionando um TRH de 1,06 d. Na Figura 5.31 é apresentado o acompanhamento da concentração celular no reator ao longo das 51 horas de processo.

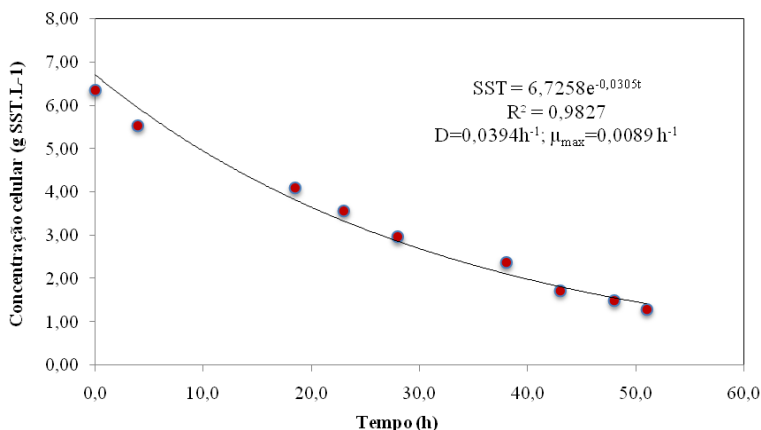


Figura 5.31 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.

A velocidade específica máxima de crescimento celular, dada pelo ajuste exponencial da curva, foi de $0,0089\text{h}^{-1}$.

A Figura 5.32 expõe os valores das concentrações das formas nitrogenadas ao longo da lavagem.

Embora entre as 10 e 20 horas tenha se verificado um comportamento incomum, com uma queda acentuada na concentração de amônio, a partir deste momento a concentração passa a aumentar linearmente. Ao final da lavagem acumulou-se pouco menos de 300mg N-

NH_4 . L^{-1} , além disso, a formação de nitrito foi superior ao que costuma ser nesta fase.

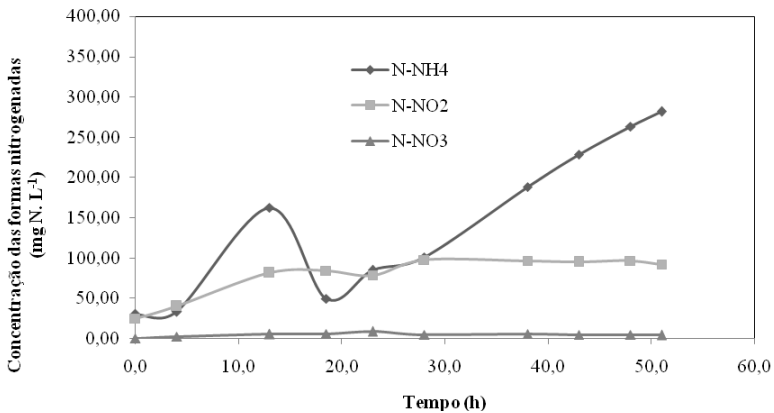


Figura 5.32 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.

A Figura 5.33 traz as concentrações das formas nitrogenadas ao longo dos cinco ciclos de alimentação posteriores à lavagem. Chama-se a atenção para as concentrações iniciais de substrato, em torno de $250\text{mg N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, compatíveis com o meio de alimentação que passou a ter a metade da concentração de nitrogênio amoniacal que nos demais testes, inclusive no Ensaio 2, comparativo a este.

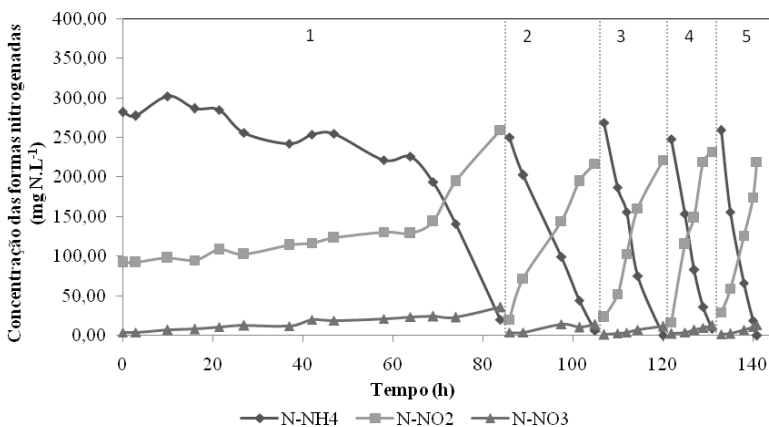


Figura 5.33 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.

Mais uma vez, segue-se um longo período com baixa atividade na sequência da lavagem, com consumo efetivo de substrato apenas após 60 horas iniciais do primeiro ciclo, apesar de se contar com uma concentração menor de amônio. Neste ciclo também se observa um acúmulo de nitrato mais significativo que o esperado, embora ainda representando uma concentração baixa.

As demais cinéticas seguem normalmente, contudo sem uma redução no período de reação como seria esperado considerando a concentração inicial do substrato. No mesmo sentido, as velocidades de consumo de amônio e formação de nitrito também não atingiram valores significativos, como se pode observar na Tabela 5.8

Tabela 5.8 -Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrito para cada um dos 5 ciclos de alimentação.

	Tempo (h)	Remoção (%)	X_m (g SST.L ⁻¹)	Q_{NH_4} (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	Q_{NO_2} (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	84,0	23,94	1,3±0,06	0,11	0,04
Ciclo 2	19,0	15,18	1,09	0,28	0,22
Ciclo 3	13,0	22,3	0,80	0,62	0,48
Ciclo 4	9,0	5,69	0,86	0,86	0,78
Ciclo 5	8,0	22,42	0,78	0,97	0,71

Os cálculos de concentração de HNO₂ mostraram, novamente, valores irrisórios, dados sustentados pelo fato do pH estar acima de 7,2 ao longo de todo o experimento (dados nos Apêndices). O valor mais elevado de amônia livre foi registrado no início do quinto ciclo (19,5mg N-NH₃.L⁻¹), mais uma vez, influência da alcalinidade alta do meio. Neste caso o pH foi rapidamente corrigido com adição de HCl 10% manualmente para evitar qualquer efeito negativo sobre o processo.

Ensaio 2

Paralelamente ao Ensaio 1, efetuou-se o Ensaio 2, procurando manter as mesmas condições aplicadas a ambos. A vazão de alimentação empregada foi de 127,2±4,2 mL.h⁻¹, levemente maior que a

do Ensaio 1, o que resultou num TRH comparativamente menor, de 0,92d.

Na Figura 5.34 são apresentados os valores da concentração celular no reator ao longo da lavagem.

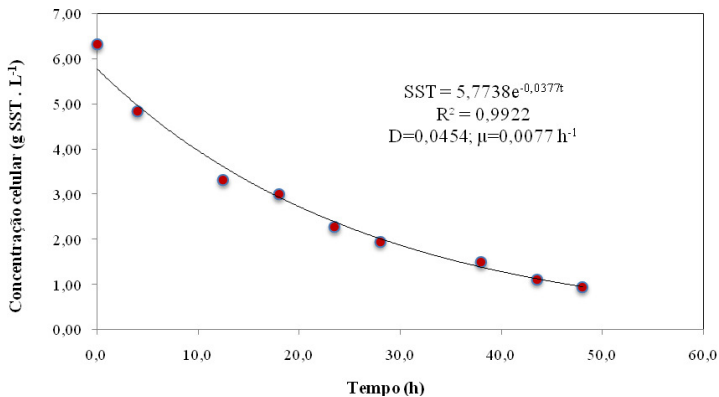


Figura 5.34 - Variação da concentração celular em função do tempo durante o processo de lavagem do lodo.

Conduzido com uma vazão específica de alimentação de $0,0454 \text{ h}^{-1}$ o processo de lavagem se estendeu por 48 horas e o ajuste exponencial da curva gerada forneceu um μ_{max} de $0,0077 \text{ h}^{-1}$, valor dentro da faixa comum aos obtidos nos ensaios anteriores.

Na Figura 5.35 constam os valores das concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato medidos ao longo da lavagem.

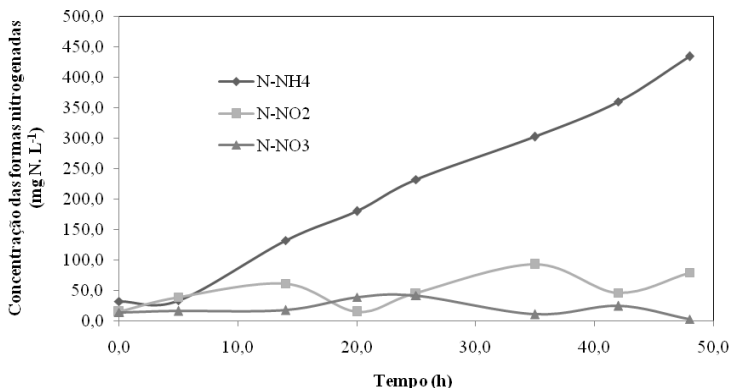


Figura 5.35 - Dados referentes à concentração das formas nitrogenadas no reator ao longo do processo de lavagem.

As oscilações nas concentrações de nitrito e nitrato durante o período de lavagem revelam que a atividade microbiana não ficou totalmente comprometida durante o processo. No entanto, os níveis de nitrato não chegaram a valores que pudessem comprometer a qualidade e efetividade da seleção desejada.

A seguir, são apresentados os acompanhamentos cinéticos nos cinco ciclos de alimentação realizados (Figura 5.36).

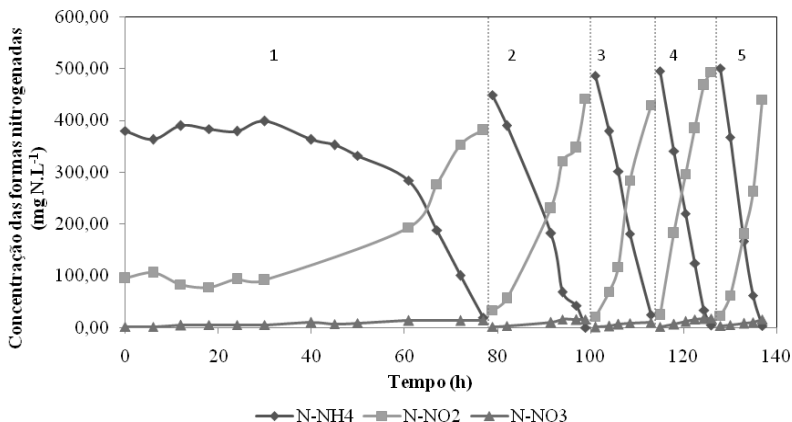


Figura 5.36 - Dados da concentração das formas nitrogenadas presentes no reator ao longo das seis cinéticas realizadas após a lavagem do lodo.

Como já citado anteriormente, este ensaio foi conduzido no mesmo formato que os dos meses anteriores, re-suspendendo a biomassa, após cada período de decantação e retirada do sobrenadante, em meio com concentração próxima a $500 \text{ mg N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$.

No Ensaio 2 as velocidades específicas de consumo de amônio e formação de nitrito voltam a ter valores maiores chegando a $1,77 \text{ g N-NH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SST} \cdot \text{d}^{-1}$, como pode-se conferir na Tabela 5.9.

A Tabela 5.10 traz os valores de S_0/X_0 relativos a cada um dos 5 ciclos de alimentação dos dois ensaios concomitantes de março/2010.

As relações entre substrato e concentração celular utilizadas no Ensaio 2, em alguns ciclos, chegam quase ao dobro daquelas do Ensaio 1. Considerando que os dois ensaios partiram do mesmo lodo e foram submetidos a condições mais próximas possíveis, tanto ao longo da lavagem quanto no decorrer dos ciclos de alimentação, pode-se dizer que, valores maiores de S_0/X_0 garantiram maiores velocidades de reação, mas isso não se refletiu necessariamente nas porcentagens de remoção de nitrogênio dos ciclos.

Ferreti (2005), ao estudar a relação S_0/X_0 para ensaios de atividades específicas em processos de nitrificação, estabeleceu a melhor faixa para os testes entre $0,05 < S_0/X_0 < 0,1 \text{ gN-NH}_4/\text{gSST}$, faixa dentro da qual se encontram as relações dos dois ensaios realizados.

Tabela 5.9 - Dados do tempo de duração, porcentagem de remoção total, concentração celular média, velocidade específica de consumo de amônio e velocidade específica de formação de nitrato para cada um dos 5 ciclos de alimentação.

	Tempo (h)	Remoção (%)	X_m (g SST.L ⁻¹)	Q_{NH_4} (g N-NH ₄ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)	Q_{NO_2} (g N-NO ₂ .g ⁻¹ SST.d ⁻¹)
Ciclo 1	77,0	17,27	1,05±0,05	0,23	0,14
Ciclo 2	20,0	5,97	1,17	0,47	0,41
Ciclo 3	12,0	9,42	0,92	1,02	0,95
Ciclo 4	11,0	1,25	1,04	1,12	1,00
Ciclo 5	9,0	13,49	0,86	1,77	1,45

Tabela 5.10 - Valores de S_0/X_0 (g N-NH₄.g⁻¹SST) referentes a cada ciclo de alimentação dos ensaios 1 e 2.

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5
S_0/X_0 (1)	0,22	0,23	0,34	0,30	0,36
S_0/X_0 (2)	0,40	0,38	0,53	0,52	0,62

5.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

O estudo da microbiota dos flocos presentes nas diferentes etapas dos ensaios realizados se deu através de observação em microscópio ótico, bem como pela técnica de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH).

5.3.1 Análise microscópica por hibridização (FISH)

Conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.7.1, página 64) a técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) foi

empregada nas amostras dos ensaios realizados a partir de agosto/2009. Eram coletadas amostras de biomassa antes da lavagem (inóculo), ao final da lavagem e em algum instante do último ciclo de alimentação de cada ensaio. Estas amostras eram fixadas num período máximo de 24 horas após a coleta e posteriormente armazenadas a -20°C até o momento da hibridização. Como já mencionado, as sondas utilizadas na hibridização de todas as amostras, foram EUBmix, NSO, NIT e NEU.

Enquanto o DAPI se liga ao DNA de qualquer célula presente na amostra, correspondendo assim ao total de células presentes, as sondas de RNA que correspondem ao EUBmix se ligam apenas ao grupo das Eubactérias. A relação EUB/DAPI dá uma idéia aproximada da proporção de células bacterianas metabolicamente ativas, as células coradas apenas com DAPI podem estar mortas ou inativas (FERNANDES, 2009 *apud* ETCHEBEHERE; MENES, 2005).

Cabe salientar que a avaliação dos resultados destas análises é subjetivo e embora o método possa servir para quantificação, aqui ele é uma ferramenta de avaliação mais qualitativa, servindo de apoio para embasar os resultados já obtidos através das análises físico-químicas.

A caracterização geral das amostras do lodo antes da lavagem revelou a presença de bastante flocos celulares, heterogeneidade, muitos filamentos longos, além de células no formato de bacilos, diplobacilos, bastonetes e cocos.

A Figura 5.37 traz as imagens obtidas no microscópio de epifluorescência de amostras do lodo inoculado antes do processo de lavagem. É possível observar a diversidade celular, com diferentes formatos, tamanhos e tipos de aglomerados.

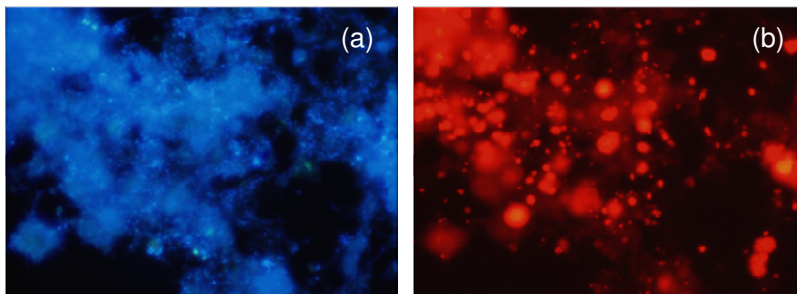


Figura 5.37 - Coloração com DAPI (a) e sonda EUB (b) de amostra antes da lavagem do lodo, referente ao ensaio de março/2010. Aumento de 100X.

As análises seguiram uma tendência geral nos diferentes ensaios. Enquanto nas amostras anteriores a lavagem, a porcentagem de EUBmix em relação ao DAPI apresentava uma grande variabilidade entre os ensaios (70-90). Após o processo de lavagem, em todas as amostras esta mesma proporção foi próxima ou superior a 90%.

Assim também aconteceu em relação às bactérias oxidadoras de amônio, que antes da lavagem se apresentavam em proporções semelhantes aos demais grupos existentes no meio, após a lavagem já eram mais da metade da população microbiana, embora em flocos mais dispersos e menores, cuja tendência, à medida que se realizavam mais ensaios, era ficarem cada vez mais densos, homogêneos e maiores.

Correspondendo as expectativas, nos ciclos finais a quantidade de bactérias oxidadoras de amônio era predominante em todas as amostras onde a lavagem foi realizada como forma de seleção. As sondas NSO e NEU apresentaram porcentagens sempre superiores a 80% do DAPI. Apenas no ensaio em que não foi realizada a lavagem (Ensaio 2 de Jan/2010) a proporção de material hibridizado com a sonda NEU, em relação ao DAPI, foi de 40%.

O aparecimento de bactérias oxidadoras de nitrito, neste caso representadas por *Nitrobacter sp.*, com o qual RNAr a sonda NIT hibridiza, foi nitidamente menor que o grupo das BOA, em muitos casos nem mesmo sendo detectado pela análise, principalmente nas amostras finais dos ensaios.

Na Figura 5.38 é possível visualizar a imagem de microscopia de fluorescência (aumento de 100X) referente à hibridização realizada numa amostra do último ciclo de alimentação no Ensaio 2 de março/2010.

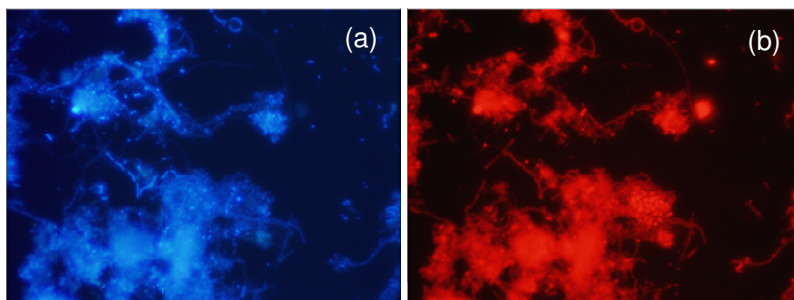


Figura 5.38 - Imagens referentes à coloração com DAPI (a) e com a sonda NEU (b).

Observa-se a grande quantidade de colônias, características de *Nitrosomonas* sp que aparecem na imagem “b” correspondente a sonda NEU, específica para este tipo de células.

De acordo com Nielsen et al (2009) os grupos de BOA relacionados a *Nitrosomonas* usualmente formam agregados, praticamente esféricos, de células compactadas. O diâmetro dos flocos de BOA varia entre 10-50µm. Essas formações esféricas foram freqüentes nas imagens das amostras finais dos experimentos.

5.3.2 Microscopia ótica

Apenas algumas amostras de biomassa escolhidas aleatoriamente entre os ensaios realizados puderam ser observadas em microscópio ótico, em função da disponibilidade do equipamento utilizado, pertencente ao Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

Nos ensaios em que houve lavagem do lodo uma tendência comum se estabeleceu entre as amostras observadas. Antes da lavagem, os flocos apresentavam-se maiores, mais densos e heterogêneos. Após a lavagem as partículas inertes ficaram mais escassas e aconteceu certa dispersão da biomassa. Após alguns ciclos de alimentação os flocos aumentaram de tamanho e densidade, apresentando uma composição mais homogênea.

A Figura 5.39 mostra a imagem de um floco presente no inóculo antes da lavagem, no ensaio de Setembro/2009. Nela é possível observar a grande quantidade de filamentosas, bactérias importantes na formação do floco, mas que devem ter seu crescimento controlado no tanque de aeração.

Após a lavagem, mesmo ocorrendo certa desestruturação do floco bacteriano, ainda se observa (Figura 5.40) a presença das filamentosas, formando uma “trama” entre as demais espécies da microbiota.

Dentre as filamentosas, encontra-se a *Zoogloea ramigera*, bactéria gelatinosa formadora de flocos aeróbios, mais comumente encontrada em sistemas de lodos ativados. Além da *Sphaerotilus natans*, bactéria filamentosa também comumente encontrada nesses sistemas – característica de ramificação falsa. A *Thiothrix* sp, também encontrada aqui, é a menos comum entre estas espécies (BITTON, 2005).

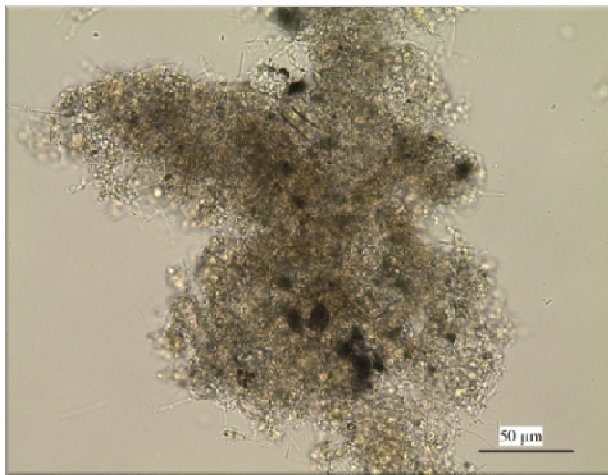


Figura 5.39 - Floco do inóculo do ensaio de setembro de 2009 antes do processo de lavagem do lodo. Aumento de 400x.

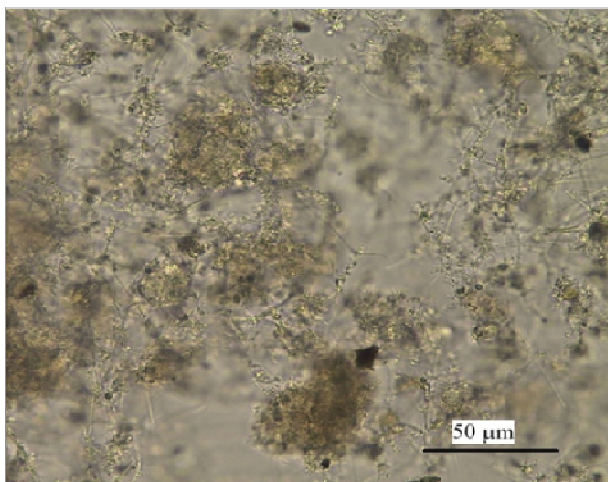


Figura 5.40 - Floco do lodo no ensaio de setembro de 2009 logo após o processo de lavagem. Aumento de 400x.

A Figura 5.41 traz a imagem de um floco do lodo, do mesmo ensaio de Setembro/2009. As formações típicas de bactérias oxidadoras de amônio podem ser observadas e parecem predominantes em relação às demais.

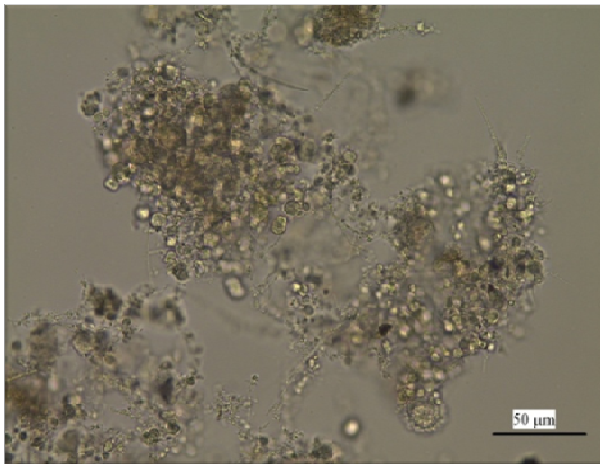


Figura 5.41 - Floco do lodo no ensaio de setembro de 2009, final do sexto ciclo de alimentação. Aumento de 400x.

A Figura 5.42 traz em detalhe as imagens dessas formações de BOA, flocos como esses foram encontradas em todas as observações feitas a partir de amostras de biomassa nos ciclos finais de cada ensaio.

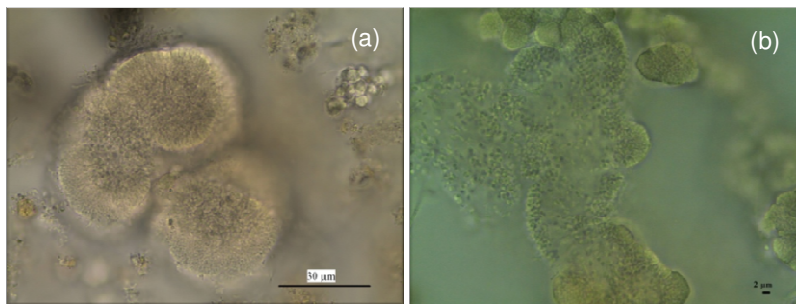


Figura 5.42 - Amostras dos ciclos finais dos ensaios de setembro/2009 (a) e Janeiro/2010 (b). Aumento de 1000x.

Embora menos comum, a presença de rotíferos também foi constatada. De acordo com Fernandes (2008) estes microrganismos são comuns em ambientes de menor carga orgânica, aparecendo principalmente na estação de maior temperatura, sendo esta, assim como o oxigênio dissolvido, os fatores de maior influência no desenvolvimento deste grupo.

Muitas amostras também apresentaram microalgas, principalmente as diatomáceas penadas, além de clorofíceas.

A presença de ciliados e flagelados vivos foi bastante comum nas amostras analisadas, principalmente naquelas de antes e logo após a lavagem, diminuindo um pouco nas amostras finais. A Figura 5.43 traz a imagem de um destes protozoários encontrado na amostra retirada do reator logo após o processo de lavagem.

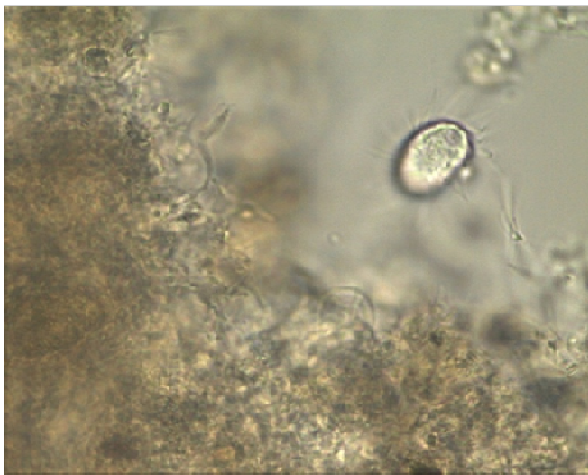


Figura 5.43 - Detalhe de ciliado presente em amostra do ensaio de outubro/2009. Aumento 1000x.

Segundo Philips (2007) tais microrganismos têm seu crescimento limitado através da utilização de efluente sintético, juntamente com altas concentrações de nitrato e nitrito. Este autor também se deparou com a presença de ciliados em reatores de biodiscos utilizados na nitrificação.

A função dos protozoários é frequentemente discutida, especialmente em reatores nitrificantes. Van Dongen *et al.* (2001), trabalhando com reator sharon de fluxo contínuo e TRH de um dia, constatou que os ciliados livres exerceram um efeito negativo sobre a estabilidade e eficiência do reator. Já Roessink e Eikelboom (1997) demonstraram que os ciliados livres têm sua importância na qualidade de efluentes de sistema mistos de biofilmes.

No caso deste trabalho não se pode concluir que a presença de protozoários tenham influenciado, positiva ou negativamente, uma vez que os períodos de operação do reator são relativamente curtos. Além disso, em nenhum momento foi observada grande quantidade destes

organismos.

A caracterização microbiológica das amostras serviu como ferramenta auxiliar na certificação dos resultados obtidos. Estas análises também foram essenciais na comprovação da lavagem do lodo, enquanto método seletivo para os microrganismos.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As velocidades específicas de crescimento encontradas nos diversos processos de lavagem, realizados ao longo deste trabalho, apresentaram valores bem abaixo dos $3d^{-1}$ relatados em EPA(1993) como a velocidade específica máxima de crescimento para as células oxidadoras de amônio, a $35^{\circ}C$. Embora isto possa indicar que o período de seleção de células poderia ser mais efetivo, não se pode deixar de lembrar que a referência é relacionada a culturas puras.

Ainda assim, uma possibilidade seria submeter o lodo a um período prévio de aclimação às altas concentrações de amônio no meio e, só então, submetê-lo ao processo de lavagem.

Zdradek (2005), procurando selecionar BOA através de lavagem da biomassa, testou diferentes vazões específicas de alimentação ($D=0,075h^{-1}$; $D=0,064h^{-1}$; $D=0,076h^{-1}$). Nos três casos, valores mais altos de D que os utilizados neste trabalho. Este autor, sentindo dificuldades em estabelecer um processo que fosse efetivo na remoção das BON, fato evidenciado pela insistente presença do nitrato no reator, resolveu partir para a limitação de oxigênio aos microrganismos, através do controle do oxigênio dissolvido no meio.

Outros autores relataram a dificuldade de selecionar BOA pelo processo de lavagem, registrando a oxidação de parte do nitrito formado (Blackburne et. al., 2008). Este autor registrou uma capacidade de nitrificação de $0,38Kg\ N.\ m^{-3}.\ d^{-1}$, operando o reator sob limitação de oxigênio e vazão específica de alimentação de $0,017\ h^{-1}$.

Kieling *et al.* (2004), também usou o método de lavagem do lodo na partida do reator para o estabelecimento do processo ANAMMOX e, segundo os autores, este processo acentuou a seleção de microrganismos, originando uma biomassa muito mais especializada no processo de interesse: oxidação anaeróbia do amônio via nitrito, sob condições anóxicas.

De qualquer forma outros fatores são importantes para a manutenção do processo de nitrificação parcial. Xue *et al.* (2009), afirma que a manutenção de elevadas concentrações de nitrogênio

amoniaco no reator e na alimentação do sistema é muito importante para o estabelecimento deste processo.

Na literatura encontram-se relatos sobre como operações com temperaturas relativamente altas, como a utilizada neste trabalho (35°C), favorecem o crescimento das bactérias oxidadoras de amônio, em relação às oxidadoras de nitrito (WYFFLES *et al.*, 2003). Vários trabalhos utilizaram com sucesso a limitação do nível oxigênio dissolvido (OD) para inibir a ação das oxidadoras de nitrito e promover acúmulo deste composto. Laanbroek *et al.* (1993), verificaram que reduções do oxigênio dissolvido no meio permitem o crescimento das oxidadoras de amônio limitando paralelamente o crescimento das oxidadoras de nitrito. Estes mesmos autores, trabalhando com cultura mista de *Nitrosomonas europaea* e *Nitrobacter hamburgensis*, demonstraram que períodos de interrupção na aeração também podem ocasionar o acúmulo de nitrito, mesmo estando o oxigênio em concentrações próximas a 80% da saturação nos períodos aeróbios.

Neste trabalho a lavagem consolida-se como um procedimento auxiliar na partida de um reator, destacando-se por permitir o estabelecimento, em um curto intervalo de tempo, de um processo específico como a oxidação parcial de amônio, além da sua eliminação, a partir de uma biomassa heterogênea, não adaptada, previamente, às condições de nitrificação.

Leitão *et al.* (2007), ao fazer uso do mesmo procedimento de lavagem e das mesmas condições de operação do reator, obteve resultados superiores, chegando a velocidades de consumo de amônio de até $5,4\text{gN-NH}_4.\text{g}^{-1}\text{SST.d}^{-1}$ e porcentagens de remoção de nitrogênio acima de 35%. No presente desenvolvimento, os valores máximos obtidos entre todos os ensaios, são de $2,33\text{gN-NH}_4.\text{g}^{-1}\text{SST.d}^{-1}$ e os valores de remoção total de nitrogênio raramente superaram os 30%. Estas diferenças podem indicar que, a procedência do lodo coletado, assim como as condições de operação e do efluente da estação de tratamento de origem, tem uma grande influência sobre a eficiência do processo posterior, mesmo após aclimação ou qualquer processo de seleção (como a lavagem).

Estas mesmas diferenças foram verificadas entre os ensaios expostos neste trabalho. Observou-se diferenças mais acentuadas quando se tratava de coletas realizadas nas diferentes estações da CASAN (Canasvieiras e Insular), mas também foram observadas dependendo do ponto de coleta e as condições de operação no período.

A composição microbiológica em plantas de tratamento depende da composição do efluente. Certos grupos funcionais são dominantes

apenas se processos específicos forem incluídos ainda no projeto da planta de processo, como é o caso da remoção de nitrogênio (NIELSEN *et al.*, 2009).

O mesmo autor ainda afirma que, estudos investigativos a respeito das características microbiológicas de um reator, e da influência que os fatores tanto ambientais, operacionais ou de projeto exercem sobre essa biomassa, ainda são pouco aprofundados.

O fato dos microrganismos envolvidos na nitrificação terem um crescimento bastante lento, implica que qualquer fator ambiental que interfira no meio tenha um grande impacto, já que o restabelecimento da população microbiana pode levar tempo.

A importância de manter velocidades de consumo de amônio o mais elevada possível, está justamente na necessidade do acúmulo de intermediários, uma vez que, teoricamente, a desnitrificação autotrófica ocorre a partir daí. De um modo geral, para baixos valores de Q_{NH_4} há tendência de que ocorra basicamente apenas a nitrificação, havendo baixa eliminação de nitrogênio (Leitão *et al.*, 2007).

Zart e Bock (1997) trabalhando com um cultivo de *N. eutropha*, na presença de NO (50ppm), obtiveram 51% de remoção de nitrogênio, neste caso, a oxidação do amônio ocorreu em uma velocidade específica de $5,8g\ N-NH_4.(gprot)^{-1}\ d^{-1}$. Considerando que as proteínas são cerca de 50% da composição celular, tem-se um valor estimado de $2,32g\ N-NH_4.g^{-1}SST.d^{-1}$. Embora os valores mais altos de velocidade específica de consumo de amônio encontrados não estejam muito distantes deste, o fato destes autores fazerem a suplementação de NO no cultivo, o desvincula da necessidade de acúmulo de intermediários através de velocidades maiores de reação, além de trabalharem com cultura pura.

Os experimentos foram conduzidos sem suplementação de gases NOx, justamente para observar a capacidade da própria reação acumular estes intermediários e tornar o processo mais viável economicamente. Além disso, Zart e Bock (1998) relataram que, em alguns casos, o fornecimento de NO para o reator na corrente de aeração provocou a morte das células em poucos dias. Este mesmo problema não foi verificado quando o gás fornecido era o NO₂, provavelmente porque este último apresenta-se menos tóxico quando comparado ao NO (MANCINELLI; MCKAY, 1983 apud ZART; BOCK, 1998).

A utilização de intermediários NO₂ e óxido nítrico (NO) como aceptores de elétrons, levando o nitrito a ser reduzido diretamente a N₂, é explicada como uma forma das BOA se protegerem contra os efeitos tóxicos do acúmulo de nitrito. A idéia da desnitrificação autotrófica é fortalecida pela presença dos genes que codificam as enzimas de

desnitrificação no genoma de espécies como a *N. europaea* (BEAUMONT *et al.*, 2002).

A execução de rotas metabólicas menos favoráveis ao crescimento, é uma alternativa para os microrganismos no sentido de diminuir os efeitos tóxicos que compostos intermediários, acumulados numa situação de excesso de substrato, possam causar (ZENG; DECKWER, 1995).

Por outro lado, a presença de excesso de substrato permite a obtenção de elevadas velocidades de consumo (LEITÃO *et al.*, 2007). A partir disso, a geração de elevadas quantidades desses intermediários desempenham um claro papel indutor nesse metabolismo desnitrificante (SCHMIDT *et al.*, 2004).

Ainda, a possibilidade da emissão de gases tóxicos que contribuem para o aquecimento da atmosfera é uma questão a ser levada em consideração. Estudos conduzidos por Kim *et al.* (2010), indicaram que a emissão de N_2O – gás com potencial de aquecimento 300 vezes maior que o CO_2 – durante a nitrificação depende, justamente, da capacidade e intensidade de desnitrificação pelas BOA. Emissões significativas de N_2O por culturas puras de nitrificantes e desnitrificantes já foram detectadas (Kester *et al.*, 1997).

A despeito dos baixos valores de remoção encontrados, quando comparados a autores que trabalharam especificamente com processos semelhantes de desnitrificação autotrófica, não se pode deixar de enfatizar que as vantagens deste tipo de processo permanecem. Além da economia de oxigênio, promovida pela nitrificação parcial, obtém-se um efluente final livre de amônio, contendo apenas nitrito, podendo ser utilizado em uma desnitrificação heterotrófica, na qual a necessidade de fontes de carbono seria obviamente reduzida, ou ser utilizado em um processo ANAMMOX para uma desnitrificação autotrófica via amônio.

Leitão *et al.* (2006), obteve eliminação de nitrogênio de até 50%, trabalhando estas mesmas condições, mas após um período longo de adaptação da cultura. Estes autores conseguiram, simultaneamente, a oxidação aeróbia do amônio, e sua oxidação anaeróbia, via nitrito, sem a adição de indutor enzimático (NO), e sugeriram um esquema (Figura 5.44) para a seqüência de reações que poderia estar acontecendo.

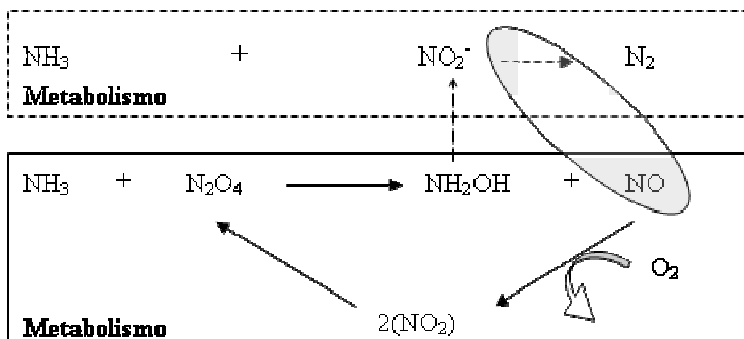


Figura 5.44 - Esquema sugerido por Leitao et al., (2006) para o metabolismo induzido nas BOA diante da presença dos intermediários NOx.

6 CONCLUSÕES

- Os testes de *stripping* de amônio revelaram que em pH= 7,5, nas condições de temperatura, aeração e agitação empregadas, não ocorre a liberação de amônia livre na atmosfera pelo fenômeno de *stripping*. Para valores de pH mais próximos a 8,0 haveria mais disponibilidade de substrato (NH_3), porém nesta faixa existe uma instabilidade em relação a perda de amônio pelo fenômeno estudado.
- A lavagem do lodo se revelou uma forma eficiente de selecionar os microrganismos desejados, fato comprovado pela baixa geração de nitrato observada ao longo dos ensaios e pela técnica de biologia molecular FISH, a qual revelou uma evolução na população de BOA após a lavagem e ao longo dos ciclos de alimentação. Desta forma, o efluente do SBR contém apenas nitrito, sendo adequado para uma desnitrificação heterotrófica com menor consumo de fonte de carbono ou, alternativamente, para a junção a um processo Anammox.
- A biomassa sofre uma adaptação gradativa às condições impostas, como as altas concentrações de substrato ($500\text{mg N-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$) e temperaturas elevadas (35°C). Esse comportamento ocorre tanto com o lodo lavado, quanto com o que não passou pelo processo anteriormente, revelando a capacidade dos microrganismos de estabelecerem o processo desejado independentemente da aplicação de uma seleção prévia, quando se trabalha com SBR.
- A procedência do lodo coletado antes da lavagem revelou ter influência na qualidade dos ensaios realizados. Problemas de ordem técnica nas estações de tratamento de origem do lodo pareceram se refletir na eficiência de remoção dos testes em laboratório.
- Os ensaios com variação da relação S_0/X_0 não foram conclusivos quanto à diferença na eficiência na remoção de nitrogênio, uma vez que foi possível estabelecer um padrão no comportamento da biomassa entre os dois ensaios paralelos.

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Trabalhos no sentido de encontrar um pH ideal para trabalho, considerando um equilíbrio entre disposição de substrato (N-NH₃), inibição e ocorrência de stripping.
- Melhor explorar dados sobre So/Xo, trabalhando tanto com variações nas concentrações celulares quanto de substrato inicial.
- Investigar o efeito de variações nas estratégias de seleção dos microrganismos como uma adaptação prévia da biomassa às condições de trabalho antes do início do processo de lavagem propriamente dito.
- Voltar a trabalhar com células mais adaptadas, ou seja, com culturas mais puras de BOA, a fim de ver se altas velocidades poderiam permitir maiores eliminações de nitrogênio.
- Determinar a composição dos gases de saída do processo, a fim de verificar a presença de gases N₂O e NO nos gases efluentes – isto poderia estar ocorrendo, ou seja, esses gases estarem indo para a atmosfera diretamente, ou seja, seriam os responsáveis pela eliminação.

REFERÊNCIAS

AHN, Y. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochem.*, v. 41, p. 1709-1721, 2006.

AMANN, R. I. In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Kluwer ACADEMIC PUBLISHERS (eds.). *Molec Microb Ecol Manual*, 3.3.6. Netherlands. 1995. p. 1-15.

ANTHONISEN, A. C.; LOEHR, R. C.; PRAKASAN, T. B. S.; SRINATH, E. G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF*, Vol. 48, No. 5, p. 835-852, 1976.

APHA, AWWA, WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995.

ARP, D.J.; SAYAVEDRA-SOTO, L.A.; HOMMES, N.G. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol.* v. 178, p. 250-255, 2002.

BEAUMONT H. J. E., VAN SCHOOTEN B., LENS S. I., WESTERHOFF H. V. E VAN SPANING R. J. M. *Nitrosomonas europaea* expresses a nitric oxide reductase during nitrification. *Journal of Bacteriology*. V. 186, N. 13, p. 4417–4421, 2004.

BITTON, G.; *Wastewater microbiology*, 3th ed. New Jersey: Ed. John Wiley & Sons, inc., 2005. 765p.

BLACKBURNE, R.; YUAN, Z.; KELLER, J. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. *Biodegradation*. V. 19, N. 2, p. 303-312, 2008.

BODELIER P. L. E., LIBOCHANT J. A., BLOM C. W. P. M. E LAANBROEK H. J. Dynamics of Nitrification and Denitrification in Root-Oxygenated Sediments and Adaptation of Ammonia-Oxidizing Bacteria to Low-Oxygen or Anoxic Habitats. *Applied and environmental microbiology*. V. 62, N. 11, p. 4100–4107, 1996.

BOUVIER, T.; GIORGIO, P. A. del. Factors Influencing the Detection of Bacterial Cells Using Fluorescence in Situ Hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *Microbiology Ecology*. v. 44, p. 3-15, 2003.

CAMPOS, J. L.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. *Bioresourse Technology*, v. 68, p. 141-145, 1999.

CAMPOS, J.L; GARRIDO, J.M.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, M. Stability of a nitrifying activated sludge reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 87-92, 2007.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comum Soil Sci Plant Anal*, V. 6, p. 71-80, 1975.

EPA-Environmental Protection Agency - USA. *Nitrogen Control*. EPA/625/R-93/010, setembro, 1993.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo (SP): Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 2, p. 223-246.

FARIAS, O. L. V. “*Processos biológicos de tratamento de efluentes: Remoção de Nutrientes*”. Apostila. Laboratório de Controle de Poluição, Rio Grande do Sul, 2000.

FERNANDES H. *A dinâmica da biota em um sistema de lagoas de estabilização para tratamento de lixiviado de aterro sanitário*. 2009. 183f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FERREIRA, E. D. S. *Aplicação da respirometria na caracterização do esgoto doméstico afluente a uma ETE por processo de lodos ativadas*. 2002. 143f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Universidade de Brasília, 2002.

FERRETTI, E. C. *Estudo da influência da relação S0/X0 na determinação da atividade específica de bactérias nitrificantes*. 2005. 111f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química e

Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

FERRETTI, E. C. *Remoção de nitrogênio via nitrito de efluentes com elevadas concentrações de nitrogênio e baixas relações DQO/N em reator operado na forma de bateladas seqüenciais (SBR)*. 2009. 122f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

GRADY Jr, C.P.L.; LINN, H. C. *Biological wastewater treatment: theory and application*. New York: Marcel. 1980. (Série pollution engineering and technology).

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

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

HENZE. M.; HARREMOES, P.; JANSEN, J. C.; ARVIN, E. *Wastewater treatment: biological and chemical process*. 2. ed. Alemanha: Springer Verlag, 1997.

HOWARTH, R. W. Human acceleration of the nitrogen cycle: drivers, consequences, and steps toward solutions. *Water Science and Technology*, Londres, v. 49, n. 5-6, p.7-13, 2004.

JETTEN, M. S. M.; STROUS, M.; VAN DE GRAAF, A. A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; KUENEN, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, p. 421-437, 1999.

JETTEN, M. S. M.; VAN DONGEN, L. G. J. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. *The Combined SHARON/ANAMMOX Process*. Stowa: Foundation for Applied Water Research. London: IWA Publishing, 2001.

JIANLONG, W.; NING, Y. Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1223-1229, 2004.

KESTER, R.A.; DEBOER, W.; LAANBROEK, H.J. Production of NO and N₂O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 3872-3877, 1997.

KIELING, D.D. *Estudo da remoção Biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas*. 2004. 119f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

KIM, S.W.; MIYAHARA, M.; FUSHINOBU, S.; WAKAGI, T.; SHOUN, H. Nitrous oxide emission from nitrifying activated sludge dependent on denitrification by ammonia-oxidizing bacteria. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3958-3963, 2010.

LAANBROEK, H.J.; GERARDS, S. Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradsky* grown in mixed continuous cultures. *Arch Microbiol.* v. 159, p. 453-459, 1993.

LEITÃO, R. P.; SANTANA, F.; HASEGAWA, F.; SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M. Seleção e Enriquecimento de Bactérias Oxidadoras de Amônio para Nitrificação e Desnitrificação Simultâneas sob Condições Aeróbias em Reator SBR. In: *Anais do VI Simpósio Nacional de Bioprocessos: Sinaferm, Curitiba 2007*.

LEITÃO, R. P.; SANTANA, F.; PELLIZZARO, A.; ANTONIO, R.V.; SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M. Nitrificação e desnitrificação simultâneas por bactérias oxidadoras de amônio sob condições aeróbias. In: *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Santos, 2006*.

LIAO, P.H.; CHEN, A.; LO, K.V. Removal of nitrogen from swine manure wastewaters by ammonia stripping. *Bioresource Technology*, v. 54, p. 17-20, 1995.

MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Brock biology of microorganism*. 8. ed. N.Y: Prentice Hall, Inc, 1997.

METCALF; EDDY; *Wastewater Engineering: Treatment and reuse*. 4th ed. New York: McGraw Hill (USA), 2003, 1819p.

MULDER, J. W.; van KEMPEN, R. N-removal by SHARON. *Water Quality Intern.*, v. 2, p. 30-31, 1997.

OLSSON, L.; NILSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivation. *Tibtech*, v. 15, p.517-522, 1997.

ORHON, D.; ARTAN, N. *Modelling of Activated Sludge Systems*. Lancaster (Pensylvania USA): Technomic Publishing Company, 1994. p.187.

PAREDES, D.; KUSCHK, P.; MWETTE, T.S.A.; STANGE, F.; MÜLLER, R.A.; KÖSER, H. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformation in the Context of Wastewater Treatment: A Review. *Eng. Life Sci.*, v. 7, n. 1, p. 13-25, 2007.

PENG, Y.; ZHU, G. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 73, p. 15-26, 2006.

PHILIPS, A. M. L. *Utilização de reator de biodiscos para tratamento de efluentes com altas concentrações de nitrogênio*. 2007. 158f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PHILIPS, S.; LAANBROEK, H.J.; VERSTRAETE, W. Origin, cause and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. (Reviews). *Environmental Science and Biotechnology*, n.01, p.115-141, 2002.

PHILIPS, S.; VERSTRAETE, W. Effect of repeated addition of nitrite to semicontinuous activated sludge reactors. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 73-82. 2001.

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

RESENDE, A. V. Agricultura e qualidade da água: contaminação da água por nitrato. *Revista do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento*, 2002.

ROESSINK, R.; EIKELBLOOM, D.H. Characterization of suspended solids in/out airlift biofilm reactors. *Water Science and Technology*. v.36, p. 237-245, 1997.

SCHIMDT, I., SLIEKERS, O., SCHMID, M., BOCK, E., FUERST, J., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. M., STROUS, M., New Concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, p. 481-492, 2003.

SCHIMDT, I.; van SPANNING, R. J.M.; JETTEN, M.S.M. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB- deficient mutants. *Microbiology*, v. 150, p. 4107-4114, 2004.

SCHMIDELL, W.; REGINATTO, V. S. Remoção de Nitrogênio. In: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Florianópolis, SC. 2005.

SCHMIDELL, W.; Transferência de oxigênio em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; BORZANI, W; LIMA, U. A; AQUARONE, E. *Biotechnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541p. v. 2.

SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; CIRPUS, I.; STROUS, M.; BOCK, E.; KUENEN, G.; JETTEN, M. S. M. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria: competitors or natural partners? *FEMS Microbiology Ecology*, v. 39. p. 175-181, 2001.

SHRESTHA, N. K.; HADANO, S.; KAMACHI, T.; OKURA, I. Conversion of Ammonium to Dinitrogen in Wastewater by *Nitrosomonas europaea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 90, p. 221-231, 2001.

STROUS, M.; HEIJNEN, J. J.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v. 50, p. 589-596, 1998.

TAPPE, W.; LAVERMAN, A.; BOHLAND, M.; BRASTER, M.; RITTERHAUS, S.; GROENEWEG, J.; Van VERSEVELD, H. W. Maintenance Energy Demand and Starvation Recovery Dynamics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* Cultivated in a Retentostat with Complete Biomass Retention. *Applied and*

Environmental Microbiology, v. 65, n. 6, p. 2471-2477, 2003.

UEMOTO, H.; SAIKI, H. Nitrogen removal reactor using packed gel envelopes containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. *Biotechnol. And Bioeng*, v. 67(1), p. 80-86, 2000.

VAN DE GRAAF, A. A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M.; KUENEN, J. G. Autotrophic Growth of Anaerobic Ammonium-oxidizing Micro-organisms in a Fluidized Bed Reactor. *Microbiology*, v.142, p. 2187-2196, 1996.

VAN DONGEN, L. G. J. M.; JETTEN, M. S. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. *The Combined Sharon/Anammox process: a sustainable method for N-removal from sludge water*. UK: IWA Publishing, 2001.

VAN HAANDEL, A.; MARAIS, G. *O comportamento do sistema de lodo ativado: teoria e aplicações para projeto e operação*. Universidade Federal da Paraíba, 1999.

VERSTRAETE, W.; PHILIPS, S. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution*, v. 102, p. 717-722, 1998.

VOGEL, A. I. *Análise inorgânica quantitativa*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981.

VON SPERLING, M. *Princípio do tratamento biológico de águas residuárias: lodos ativados*. 2. ed. Belo Horizonte(Minas Gerais): Ed. da FCO-UFMG. 1997. v. 4.

VON SPERLING, M. *Princípios básicos do tratamento de esgotos*. 2. ed. Belo Horizonte(Minas Gerais): Ed. da FCO-UFMG. 1996. v. 2.

WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. Orris E. Albertson (Chairman). Nutrient Control. *Manual of practice N°. FD-7*. Prepared by task force on nutrient control. 1991.

WIESMANN, U. Biological nitrogen removal from wastewater. In: FLETCHER, A. (Ed.). *Advances in Biochemical Engineering*. Verlag (Berlin): Springer, 1994. v. 51 , p. 113-154.

WYFFELS, S., BOECKS P., PYNAERT K., VERSTRAET W., CLEEMPUT O. Sustained nitrite accumulation in a membrane-assisted bioreactor (MBR) for the treatment of ammonium-rich wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 78, p. 412-419, 2003.

Xue, y.; Yang, F.; Liu, S.; Fu, Z. The influence of controlling factors on the start-up and operation for partial nitrification in membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, v.100, n. 3, p. 1055-1060, 2009.

YE, R. W.; THOMAS, S. M. Microbiol nitrogen cycles: physiology, genomics and application. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, p. 307-312, 2001.

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

ZART, D.; BOCK, E. High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO₂ or NO. *Arch Microbiol*, v. 169, p. 282-286, 1998.

ZDRADEK, C. P. *Seleção de linhagens oxidadoras de amônio e remoção de nitrogênio via nitrito em reator descontínuo alimentado (SBR), sob condições de limitação de oxigênio*. 2005. 217f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. A kinetic model for substrate and energy consumption of microbial growth under substrate-sufficient conditions. *Biotechnol. Prog.*, v. 11, p. 71-79. 1995.

ZHU, G.; PENG, Y.; LI, B.; GUO, J.; YANG, Q.; WANG, S. Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol* v.192, p. 159-195, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - ENSAIO ABRIL/2009

Tabela 1 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes a etapa de lavagem do lodo.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0	49,71	18,45	0,02	7,8	12,52	25,7	1,7E+09	1,65
2	80,22	21,42	0,15	7,1	11,78	34,8	8,9E+08	1,11
6	108,98	19,94	0,15	7,3	9,9	33,8	9,6E+08	2,13
10	138,32	21,42	0,42	7,6	8,21	34,2	9,3E+08	5,69
18	265,12	-	1,10	7,7	6,01	34	9,4E+08	13,38
29	349,82	-	1,37	7,9	4,36	34,5	9,1E+08	28,03
33	359,62	26,62	-	7,2	3,58	34,8	8,9E+08	6,27
44	455,57	35,42	0,56	7,8	2,24	33,1	1,0E+09	26,99
47	465,83	35,42	1,77	7,6	2,17	34,3	9,2E+08	21,01
53	483,10	33,93	1,64	7,8	1,58	35,5	8,5E+08	34,74
58	515,21	36,90	2,17	7,6	1,36	34,5	9,1E+08	21,55
63	519,29	36,90	1,91	7,5	0,74	34,9	8,9E+08	17,86

Tabela 2 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	522,79	38,39	1,91	7,7	0,90	34,0	9,4E+08	26,39
12,0	547,87	41,36	2,71	6,9	0,90	33,6	9,7E+08	4,46
18,0	530,23	39,87	1,10	7,0	-	34,3	9,2E+08	6,08
25,0	526,03	57,69	1,28	7,1	1,21	34,3	9,2E+08	7,74
35,0	508,30	63,63	1,91	7,3	1,48	34,9	8,9E+08	11,17
39,0	-	74,02	1,23	7,0	1,42	34,4	9,2E+08	5,77
45,0	483,57	148,05	1,50	7,4	-	34,0	9,4E+08	11,21
49,0	448,57	-	1,77	-	2,06	35,0	8,8E+08	11,11
53,0	408,43	-	-	7,3	2,06	35,0	8,8E+08	8,64
57,0	372,03	249,02	2,98	7,0	1,47	35,2	8,7E+08	4,53
61,0	281,03	315,83	3,19	7,4	1,38	35,5	8,5E+08	8,41
66,0	161,09	415,32	4,06	-	1,24	34,0	9,4E+08	4,37
69,0	92,68	463,47	-	-	1,28	34,0	9,4E+08	2,52
72,0	37,38	522,86	10,40	7,4	-	33,4	9,8E+08	0,85
74,0	22,54	500,59	-	7,1	2,02	33,6	9,7E+08	0,27
75,5	4,29	-	14,17	7,43	1,36	34,5	9,1E+08	0,12

Tabela 3 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	479,62	41,84	0,96	7,8	1,31	28,0	1,4E+09	20,36
3,0	433,54	75,99	1,50	7,1	1,27	34,6	9,1E+08	5,94
6,5	380,43	150,02	1,91	7,3	-	34,1	9,4E+08	8,49
10,5	294,09	246,53	5,54	7,1	0,96	35,2	8,7E+08	3,74
14,5	189,09	322,26	8,38	7,3	1,37	34,5	9,1E+08	4,05
18,0	89,65	428,32	9,59	7,0	1,17	33,3	9,9E+08	0,92
21,0	36,68	452,45	12,29	7,4	-	34,1	9,4E+08	0,90
22,5	7,37	469,15	10,53	7,4	1,61	33,4	9,8E+08	0,18

Tabela 4 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	513,45	34,02	-	7,4	1,31	28,6	1,4E+09	9,93
4,0	494,20	75,60	2,85	7,3	1,39	34,8	8,9E+08	9,64
8,0	435,50	143,68	5,28	7,3	1,51	33,7	9,6E+08	8,27
12,0	272,63	271,27	-	7,3	2,05	34,7	9,0E+08	6,19
15,5	171,78	349,22	8,10	7,2	2,30	34,1	9,4E+08	3,13
22,5	30,61	475,44	9,72	7,1	2,42	35,4	8,6E+08	0,41
24,0	0,00	-	11,61	7,1	2,44	33,8	9,6E+08	0,20

APÊNDICE B - ENSAIO JULHO/2009.

Tabela 5 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	239,86	329,20	11,44	7,4	1,34	34,0	9,4E+08	5,56
3,0	161,69	415,21	10,82	6,9	1,87	33,6	9,7E+08	1,32
6,0	121,89	361,38	12,01	7,2	1,62	35,0	8,8E+08	2,15
9,0	94,35	353,96	19,83	7,2	-	34,3	9,2E+08	1,49
15,0	64,51	407,79	17,58	7,0	1,73	33,2	1,0E+09	0,57
18,0	30,68	452,33	12,44	7,4	1,30	35,2	8,7E+08	0,86
21,0	24,08	417,07	12,76	7,0	1,02	33,10	1,0E+09	0,33

Tabela 6 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes a etapa de lavagem do lodo.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	25,29	39,87	1,55	6,9	10,27	25,7	1,7E+09	0,12
12,0	89,22	46,55	0,80	7,2	7,24	34,8	8,9E+08	1,55
26,0	113,02	56,20	1,05	7,1	5,17	35,0	8,8E+08	1,63
36,0	144,29	82,19	1,93	7,0	4,69	35,1	8,8E+08	1,67
42,0	190,49	72,54	2,55	7,0	4,84	34,0	9,4E+08	1,95
51,0	192,61	84,42	0,93	7,1	4,36	34,3	9,2E+08	2,77
61,0	211,86	76,99	1,68	7,2	3,65	34,8	8,9E+08	3,69
69,0	-	62,89	2,68	7,1	3,31	32,8	1,0E+09	0,00
76,0	225,28	75,51	3,30	7,8	-	35,3	8,6E+08	15,33
87,0	215,95	76,25	3,30	6,1	-	35,3	8,6E+08	0,34
95,0	260,28	96,30	3,68	6,9	2,29	33,9	9,5E+08	1,93
101,0	311,03	96,30	2,80	6,7	2,06	33,7	9,6E+08	1,69
108,0	286,53	102,98	3,05	7,1	-	33,0	1,0E+09	3,37
113,0	279,53	125,01	3,93	7,1	1,68	33,2	1,0E+09	3,82
120,0	284,20	169,56	4,31	7,2	1,63	35,3	8,6E+08	5,35
132,0	273,70	187,19	5,31	7,1	1,48	33,9	9,5E+08	3,83
137,0	239,86	244,56	7,31	7,2	1,34	34,3	9,2E+08	3,61

Tabela 7 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	516,37	41,84	0,93	8,2	1,43	23,4	2,0E+09	37,56
3,5	515,21	88,87	1,18	7,1	1,19	33,6	9,7E+08	6,17
6,0	430,04	129,70	2,93	7,2	1,56	34,2	9,3E+08	7,89
11,5	340,30	246,05	4,93	7,2	1,26	33,3	9,9E+08	5,37
14,0	273,09	257,92	4,56	7,0	1,20	34,8	8,9E+08	2,95
20,0	151,76	347,02	9,94	7,2	1,11	35,0	8,8E+08	2,68
23,0	85,49	422,63	13,82	7,2	1,26	34,2	9,3E+08	1,31
26,0	53,29	443,05	15,45	7,1	1,26	33,7	9,6E+08	0,75
30,0	42,55	452,33	18,58	6,9	1,16	33,9	9,5E+08	0,36
34,0	22,68	456,04	21,90	7,0	1,18	35,0	8,8E+08	0,23
37,0	17,53	463,47	23,59	7,1	1,44	33,8	9,6E+08	0,22

Tabela 8 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	476,70	41,05	4,06	8,1	1,17	28,0	1,4E+09	41,26
3,0	455,70	103,20	6,43	7,1	1,22	34,7	9,0E+08	6,89
5,0	431,76	123,98	7,62	7,2	0,80	34,3	9,2E+08	7,45
7,0	374,36	160,62	9,38	7,3	0,84	33,2	1,0E+09	6,72
9,0	330,96	190,80	8,44	7,4	1,06	33,9	9,5E+08	7,63
16,0	196,98	266,53	17,95	7,2	1,44	35,0	8,8E+08	3,40
19,5	95,95	282,34	21,96	7,0	1,12	34,4	9,2E+08	1,11
22,0	54,18	305,36	24,34	7,2	-	33,3	9,9E+08	0,89
28,0	24,78	346,71	30,85	7,1	-	35,0	8,8E+08	0,33
30,0	9,24	429,76	30,22	7	0,8	35,9	830377306	0,11

Tabela 9 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quarto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	528,04	48,52	3,93	7,9	1,41	28,2	1,4E+09	25,35
1,5	494,20	96,30	7,06	7,2	1,22	33,7	9,6E+08	8,38
4,5	422,45	145,30	13,70	7,3	1,37	34,2	9,3E+08	8,67
7,5	319,78	300,99	19,64	7,0	1,25	34,6	9,1E+08	3,49
15,5	73,03	404,93	28,97	7,2	1,55	33,6	9,7E+08	1,20
18,0	38,78	402,22	29,91	7,5	1,40	33,3	9,9E+08	1,23
22,0	16,14	418,92	38,24	7,1	1,18	34,3	9,2E+08	0,20
23,0	13,62	303,85	148,41	7,1	1,10	35,0	8,8E+08	0,18

Tabela 10 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quinto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	515,21	53,23	1,80	8,0	1,15	26,2	1,6E+09	28,13
3,0	522,79	61,40	1,68	6,0	1,25	37,0	7,7E+08	0,69
8,0	420,10	153,98	4,18	7,0	-	34,7	9,0E+08	4,41
11,0	341,23	199,91	4,43	7,0	0,94	35,4	8,6E+08	4,11
19,0	255,36	301,99	7,37	7,2	-	35,0	8,8E+08	4,03
24,0	199,85	355,82	7,75	7,1	0,82	35,5	8,5E+08	2,60
30,0	77,09	439,08	11,44	7,1	-	37,1	7,7E+08	1,30
34,0	43,68	496,88	11,82	7,0	0,75	35,0	8,8E+08	0,49
37,0	22,68	496,88	13,07	7,1	0,79	35,3	8,6E+08	0,30
40,0	20,34	474,60	15,95	6,8	0,83	37,0	7,7E+08	0,18

APÊNDICE C - ENSAIO AGOSTO/2009

Tabela 11 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes a etapa de lavagem do lodo.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	78,28	19,23	2,05	7,0	2,71	21,2	2,3E+09	0,34
2,0	78,86	-	-	7,1	2,68	34,0	9,4E+08	1,61
7,0	85,86	39,95	6,94	6,5	2,66	34,7	9,0E+08	0,32
10,0	-	-	9,50	7,0	2,35	35,1	8,8E+08	2,08
15,0	126,11	53,31	13,45	7,4	1,87	34,2	9,3E+08	3,32
19,0	152,22	53,31	16,58	7,6	1,80	35,4	8,6E+08	7,89
27,0	112,09	80,04	18,14	7,5	1,67	33,5	9,8E+08	4,60
32,0	134,96	84,49	19,83	7,3	1,23	33,4	9,8E+08	3,42
41,0	155,49	97,86	25,72	6,9	1,21	34,5	9,1E+08	1,80
44,0	188,53	106,77	24,71	7,0	1,04	35,30	8,6E+08	1,97

Tabela 12 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	213,03	97,35	25,46	7,2	1,06	34,2	9,3E+08	3,19
3,5	176,28	115,68	25,84	7,0	1,01	35,0	8,8E+08	1,98
7,0	165,78	114,89	25,72	7,6	1,13	34,9	8,9E+08	7,12
13,0	134,86	139,43	35,11	6,9	0,98	35,0	8,8E+08	1,29
19,5	97,62	155,77	37,86	6,9	0,91	33,8	9,6E+08	0,79
24,0	85,49	157,59	45,75	7,1	1,22	34,2	9,3E+08	1,04
26,5	78,95	167,65	43,99	7,3	1,05	33,8	9,6E+08	1,65
34,0	58,39	187,28	54,82	7,4	0,84	33,3	9,9E+08	1,55
38,0	43,68	172,44	61,46	7,2	1,02	33,2	1,0E+09	0,73
40,0	31,54	200,28	59,96	7,3	0,89	35,0	8,8E+08	0,65

Tabela 13 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	521,04	30,37	1,05	7,8	0,70	24,0	1,9E+09	16,83
3,0	510,54	36,98	4,99	7,1	0,56	34,3	9,2E+08	6,27
7,0	488,37	63,71	5,37	7,1	0,71	35,3	8,6E+08	7,17
11,0	462,12	96,37	5,75	7,2	0,82	33,7	9,6E+08	7,16
14,0	413,10	87,46	5,50	7,4	1,08	33,9	9,5E+08	9,52
20,0	362,70	155,77	7,94	7,2	0,98	35,2	8,7E+08	6,06
26,0	305,15	186,95	11,19	7,2	0,77	35,2	8,7E+08	5,98
31,0	159,02	281,94	11,76	7,5	0,78	33,0	1,0E+09	4,73
33,5	105,05	359,90	18,20	7,5	0,83	35,3	8,6E+08	3,79
36,5	27,81	359,90	22,96	7,6	0,90	33,6	9,7E+08	1,00

Tabela 14 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	475,54	69,51	2,43	7,7	0,76	29,7	1,3E+09	16,59
4,0	427,12	122,41	3,68	7,1	0,98	35,2	8,7E+08	6,23
8,0	231,70	249,55	9,69	7,5	0,98	34,0	9,4E+08	7,52
12,0	148,22	332,06	17,58	7,5	0,87	35,1	8,8E+08	5,52
16,0	20,18	415,58	19,08	7,3	0,91	33,8	9,6E+08	0,39
19,0	10,54	411,87	28,59	7,2	0,89	33,9	9,5E+08	0,17

Tabela 15 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quarto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	501,79	67,66	2,37	7,7	0,80	29,5	1,3E+09	20,17
3,0	434,12	140,04	6,43	7,3	0,83	34,7	9,0E+08	8,41
4,5	343,10	-	8,50	7,5	0,62	33,6	9,7E+08	10,14
6,5	-	-	9,19	6,5	0,63	33,9	9,5E+08	0,00
10,5	284,76	252,28	14,70	5,9	0,66	34,0	9,4E+08	0,21
13,0	169,49	264,16	21,21	7,4	0,95	33,8	9,6E+08	4,06
15,0	75,22	398,88	21,58	7,7	0,81	34,0	9,4E+08	3,40
18,0	1,21	421,15	27,78	7,4	0,87	34,6	9,1E+08	0,03

Tabela 16 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quinto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	509,37	81,58	5,18	7,7	-	29,1	1,3E+09	18,25
2,0	-	127,89	8,56	7,0	0,63	29,1	1,3E+09	0,00
4,0	424,79	155,77	10,44	7,6	0,70	32,5	1,0E+09	15,96
6,0	304,62	215,16	14,20	7,6	0,91	35,7	8,4E+08	12,32
9,0	125,81	348,76	18,70	7,8	0,76	35,8	8,4E+08	8,64
11,0	38,78	410,01	26,59	7,7	0,64	34,7	9,0E+08	2,23
12,0	8,68	406,30	35,23	7,7	0,80	35,2	8,7E+08	0,42

Tabela 17 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao sexto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	529,79	78,79	4,81	7,5	0,78	25,4	1,7E+09	8,59
2,0	405,54	149,32	9,63	6,3	0,86	35,0	8,8E+08	0,92
4,0	256,78	267,13	12,63	7,7	0,79	35,9	8,3E+08	13,11
6,5	32,29	367,32	21,52	8,1	0,61	34,8	8,9E+08	3,68
8,0	6,15	406,30	40,74	7,7	-	35,0	8,8E+08	0,36
9,0	4,01	428,57	42,18	7,5	0,62	35,0	8,8E+08	0,14

APÊNDICE D - ENSAIO SETEMBRO/2009.

Tabela 18 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes a etapa de lavagem do lodo.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	53,01	22,94	2,60	7,6	2,90	18,8	2,8E+09	0,75
2,0	95,01	30,37	2,78	7,8	2,47	34,6	9,1E+08	5,55
6,0	152,88	48,93	5,87	7,1	2,04	35,0	8,8E+08	1,92
9,0	169,96	43,73	8,23	7,1	1,77	35,1	8,8E+08	2,20
16,0	256,29	63,78	10,68	7,3	1,54	35,3	8,6E+08	6,19
19,0	239,96	75,58	12,77	7,7	1,50	34,2	9,3E+08	12,81
22,0	291,78	84,49	12,86	7,7	1,28	35,3	8,6E+08	15,31
26,0	277,78	83,01	9,41	7,8	1,18	35,5	8,5E+08	17,94
30,0	326,78	59,25	9,95	8,0	0,97	34,5	9,1E+08	30,34

Tabela 19 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	336,12	59,25	9,95	8,0	0,97	34,5	9,1E+08	31,21
2,0	326,78	65,19	9,50	7,8	0,96	35,5	8,5E+08	20,66
4,5	305,20	75,58	9,04	7,5	0,85	34,8	8,9E+08	10,43
11,5	310,00	78,55	12,13	7,5	0,84	35,8	8,4E+08	6,80
14,0	314,53	93,40	11,86	7,6	0,87	34,4	9,2E+08	12,51
18,0	268,45	96,37	11,31	7,5	1,02	32,7	1,0E+09	7,32
24,0	275,45	105,28	17,49	7,5	0,87	34,4	9,2E+08	8,58
28,0	263,78	94,89	19,40	7,5	0,87	35,5	8,5E+08	10,31
32,0	264,36	139,43	21,67	7,4	0,85	35,7	8,4E+08	6,85
34,5	259,70	112,71	20,49	7,3	0,84	35,9	8,3E+08	6,37
39,0	-	130,52	20,12	7,4	0,83	34,6	9,1E+08	0,00
45,0	235,76	132,01	21,76	7,7	0,94	34,8	8,9E+08	11,22
51,0	178,82	139,43	22,21	7,7	0,90	35,0	8,8E+08	9,41
59,0	181,62	166,16	27,66	7,7	0,95	35,0	8,8E+08	9,77
63,0	161,56	183,98	32,11	7,6	0,85	33,7	9,6E+08	6,14
67,0	119,09	207,74	27,30	7,6	0,88	35,4	8,6E+08	5,51
70,0	77,28	241,11	35,65	7,8	0,97	35,9	8,3E+08	5,58
73,0	61,18	280,09	36,56	7,7	0,85	34,7	9,0E+08	3,45
75,5	25,24	222,55	41,55	7,5	0,82	34,3	9,2E+08	0,76

Tabela 20 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	448,70	52,64	3,23	7,9	0,70	22,9	2,0E+09	18,31
4,0	445,20	75,66	5,59	7,2	-	33,4	9,8E+08	7,07
6,0	438,79	130,52	6,14	7,4	0,86	33,6	9,7E+08	10,14
11,0	346,83	185,46	10,04	7,4	0,67	34,2	9,3E+08	8,72
14,0	278,23	240,40	11,95	7,6	0,60	35,4	8,6E+08	11,29
17,0	232,96	311,64	12,95	7,6	0,86	33,7	9,6E+08	9,26
25,0	16,89	391,45	22,30	7,4	0,72	35,3	8,6E+08	0,50
26,0	7,51	428,57	22,85	7,7	0,91	33,7	9,6E+08	0,33

Tabela 21 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	501,20	41,20	2,69	7,8	0,78	25,0	1,8E+09	16,59
2,0	-	88,72	4,05	7,4	0,94	34,6	9,1E+08	0,00
5,0	320,37	182,19	8,32	7,3	-	34,6	9,1E+08	6,91
8,5	207,20	292,07	10,59	7,5	0,82	34,5	9,1E+08	6,21
10,5	95,19	363,31	14,77	7,6	0,90	34,9	8,9E+08	4,46
13,0	28,74	439,41	15,13	7,4	0,86	35,5	8,5E+08	0,79
14,0	2,84	406,00	21,85	7,6	0,97	34,2	9,3E+08	0,12

Tabela 22 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quarto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	461,54	55,31	3,23	7,7	0,56	31,8	1,1E+09	18,50
2,0	402,04	115,44	3,42	7,5	-	33,6	9,7E+08	11,62
5,5	194,69	241,59	10,41	7,5	0,70	35,2	8,7E+08	6,39
7,0	104,62	344,04	11,68	7,4	0,67	34,9	8,9E+08	2,82
9,0	37,38	422,70	16,40	7,7	0,78	35,2	8,7E+08	1,83
10,0	1,44	406,00	18,67	7,5	0,89	33,3	9,9E+08	0,04

Tabela 23 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quinto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	486,62	44,17	2,51	7,7	0,89	23,7	1,9E+09	12,30
2,0	393,28	122,13	4,14	7,5	0,59	34,8	8,9E+08	13,44
5,0	265,16	257,92	10,04	7,4	0,65	36,2	8,1E+08	8,30
7,0	160,62	309,89	13,58	7,5	0,65	33,9	9,5E+08	5,66
9,0	60,24	394,86	16,49	8,1	-	35,8	8,4E+08	7,13
11,0	28,74	409,71	16,76	7,5	-	35,2	8,7E+08	0,96
11,5	5,41	417,13	19,21	7,5	0,80	35,8	8,4E+08	0,18

Tabela 24 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao sexto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	460,37	63,67	4,05	7,9	0,74	31,0	1,2E+09	28,34
2,0	368,20	117,11	3,78	7,1	0,63	35,4	8,6E+08	5,83
4,0	316,96	200,95	10,95	7,5	-	34,9	8,9E+08	10,66
6,0	185,31	297,06	10,86	7,5	0,74	35,7	8,4E+08	7,17
8,5	69,34	412,13	11,77	7,9	0,64	35,6	8,5E+08	5,94
10,0	11,48	452,97	21,12	7,4	0,70	35,0	8,8E+08	0,30

Tabela 25 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao sétimo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	492,45	44,17	2,14	7,6	-	24,5	1,8E+09	9,61
3,0	334,37	195,55	12,04	7,4	0,72	35,6	8,5E+08	10,30
5,5	204,49	321,77	18,22	7,6	0,72	34,7	9,0E+08	8,86
7,0	92,49	309,89	23,30	7,3	0,60	35,2	8,7E+08	2,17
8,0	54,41	402,29	14,31	7,7	0,72	35,0	8,8E+08	2,86
10,0	6,58	454,26	19,12	7,5	0,72	35,8	8,4E+08	0,25

APÊNDICE E - ENSAIO OUTUBRO/2009.

Tabela 26 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes a etapa de lavagem do lodo.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	25,46	12,96	0,42	6,6	7,66	28,0	1,4E+09	0,07
4,0	60,11	30,03	4,14	7,1	6,25	35,6	8,5E+08	0,86
7,0	79,38	47,44	7,87	7,4	5,34	34,7	9,0E+08	2,16
12,0	128,38	60,06	8,23	7,4	4,40	34,2	9,3E+08	3,16
22,0	224,28	72,69	8,23	7,4	3,02	34,2	9,3E+08	5,27
26,0	250,69	94,89	8,77	7,4	2,50	36,0	8,2E+08	7,75
30,0	280,56	88,95	7,77	7,4	2,16	35,1	8,8E+08	7,15
34,5	303,89	90,43	6,50	7,4	-	36,0	8,2E+08	8,59
38,0	333,20	80,04	7,14	7,5	1,57	33,9	9,5E+08	9,82
40,0	362,37	83,01	8,59	7,5	1,49	34,2	9,3E+08	11,91
46,0	405,54	72,61	7,68	7,7	1,15	34,8	8,9E+08	21,54

Tabela 27 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	405,54	72,61	7,68	7,7	1,15	34,8	8,9E+08	21,54
3,0	392,70	82,34	6,50	7,5	-	35,0	8,8E+08	13,60
7,0	389,20	91,99	8,23	7,5	-	34,2	9,3E+08	12,24
11,5	-	-	12,77	7,5	1,14	33,7	9,6E+08	0,00
15,0	343,56	129,04	8,77	7,5	1,14	34,5	9,1E+08	11,01
19,0	342,63	112,71	16,76	7,6	1,11	35,2	8,7E+08	14,99
22,0	314,63	123,10	14,40	7,6	-	34,9	8,9E+08	14,75
26,5	295,49	152,80	17,49	7,6	1,22	36,1	8,2E+08	13,99
31,0	234,83	207,74	13,86	7,5	1,18	35,8	8,4E+08	8,56
34,0	175,09	243,37	19,13	7,7	1,20	35,6	8,5E+08	9,36
37,0	110,69	296,79	20,58	7,3	1,20	35,1	8,8E+08	2,70
39,0	88,01	315,35	25,66	7,4	1,16	36,2	8,1E+08	2,75
42,0	43,21	376,60	22,21	7,9	1,16	34,1	9,4E+08	3,38

Tabela 28 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg/L)
0,0	503,54	27,24	2,33	7,4	0,91	30,8	1,2E+09	10,33
4,5	405,54	102,41	4,60	7,4	0,94	34,8	8,9E+08	12,13
8,5	316,87	189,56	6,05	7,6		34,0	9,4E+08	12,28
11,5	234,61	265,66	12,04	7,4		35,1	8,8E+08	6,54
19,0	34,34	453,12	22,39	7,8	-	33,6	9,7E+08	2,01
21,0	5,88	467,97	17,94	7,4	0,89	34,9	8,9E+08	0,14

Tabela 29 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg/L)
0,0	588,71	28,23	2,60	7,4	1,14	28,3	1,4E+09	9,74
3,0	416,62	117,25	4,96	7,5	1,14	35,1	8,8E+08	13,28
6,0	277,20	204,86	8,23	7,4	1,15	35,4	8,6E+08	7,04
9,0	133,09	323,65	14,04	7,4	0,87	34,8	8,9E+08	3,81
11,5	40,88	-	14,22	7,9	0,96	36,1	8,2E+08	3,61
13,5	4,94	403,42	16,49	7,6	0,94	34,5	9,1E+08	0,20

Tabela 30 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quarto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	519,87	12,64	3,32	7,6	0,77	28,0	1,4E+09	14,79
2,0	441,70	94,98	6,05	7,2	0,79	35,0	8,8E+08	8,35
5,0	294,12	192,98	7,14	7,4	0,84	34,8	8,9E+08	8,60
7,0	174,16	237,53	15,31	7,4	0,88	34,6	9,1E+08	4,60
8,5	81,29	403,42	15,67	7,2	-	35,9	8,3E+08	1,56
11,5	2,38	425,70	19,67	7,5	1,10	34,9	8,9E+08	0,08

Tabela 31 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quinto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	557,21	28,97	2,78	7,7	0,80	31,2	1,1E+09	21,95
3,0	418,95	171,52	7,77	7,5	-	35,0	8,8E+08	14,51
5,0	265,16	252,37	4,60	7,4	0,71	34,9	8,9E+08	6,67
7,5	102,29	390,86	8,23	7,6	-	34,5	9,1E+08	4,28
9,0	34,58	423,12	7,68	7,6	0,79	35,6	8,5E+08	1,52
10,0	12,88	426,83	13,50	7,6	0,83	34,5	9,1E+08	0,52

Tabela 32 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao sexto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	552,77	23,03	5,50	7,5	0,62	33,4	9,8E+08	17,25
2,0	442,87	101,73	4,87	7,5	0,71	35,8	8,4E+08	15,44
4,0	318,36	206,34	4,87	7,4	0,65	35,1	8,8E+08	9,49
6,0	195,62	326,62	6,96	7,4	0,61	34,8	8,9E+08	4,78
7,5	117,88	414,56	15,31	7,4		34,9	8,9E+08	3,32
10,0	4,48	478,80	15,86	7,3	0,78	34,9	8,9E+08	0,10

APÊNDICE F - ENSAIOS JANEIRO/2010 - ENSAIO COM LAVAGEM DO LODO

Tabela 33 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes a etapa de lavagem do lodo.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	32,19	14,67	13,68	7,4	7,68	30,0	1,2E+09	0,64
5,0	33,36	38,80	16,04	7,6	6,38	35,3	8,6E+08	1,37
14,0	131,94	61,07	17,49	7,6	-	34,4	9,2E+08	5,86
20,0	179,78	14,67	38,92	7,4	3,71	35,4	8,6E+08	5,00
25,0	232,28	46,22	41,46	7,4	3,17	34,0	9,4E+08	6,03
35,0	302,28	92,62	10,68	7,8	2,40	35,0	8,8E+08	20,19
42,0	360,03	46,22	24,30	7,6	1,51	34,2	9,3E+08	13,52
48,0	434,12	79,63	2,51	7,3	1,20	34,6	9,1E+08	9,36

Tabela 34 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	490,70	63,71	4,78	7,6	1,02	35,3	8,6E+08	21,61
6,0	493,04	72,61	4,05	7,4	-	35,2	8,7E+08	14,79
11,0	410,30	63,71	6,05	7,2	0,83	34,6	9,1E+08	7,38
18,0	430,83	99,34	5,87	7,4	-	34,0	9,4E+08	11,18
24,0	418,70	71,13	7,4	7,4	-	35,6	8,5E+08	12,33
30,0	379,03	90,43	5,87	7,6	0,98	35,0	8,8E+08	15,33
34,0	378,56	74,10	5,32	7,4	-	35,1	8,8E+08	11,04
42,0	360,83	124,58	6,05	7,4	1,06	35,0	8,8E+08	10,69
48,0	303,43	182,49	8,59	7,4	-	33,6	9,7E+08	7,17
54,0	240,89	230,01	10,23	7,6	0,71	33,3	9,9E+08	9,53
60,0	121,42	350,28	16,22	7,5	-	34,0	9,4E+08	3,52
65,0	5,22	443,83	17,31	7,8	-	34,5	9,1E+08	0,33

Tabela 35 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	538,54	34,49	2,60	7,4	0,69	27,6	1,5E+09	9,72
4,0	463,87	113,19	6,59	7,5	-	34,7	9,0E+08	14,41
6,0	415,45	175,55	6,59	7,6	0,80	34,4	9,2E+08	16,16
10,0	357,12	217,13	7,14	7,6	-	34,3	9,2E+08	14,75
15,0	202,53	340,37	9,14	7,7	-	34,1	9,4E+08	10,98
20,0	0,69	411,65	15,49	7,5	0,85	35,1	8,8E+08	0,02

Tabela 36 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	510,54	25,10	4,96	7,3	0,75	30,6	1,2E+09	7,88
4,0	400,87	99,34	6,96	7,5	-	34,7	9,0E+08	13,61
6,0	343,70	157,25	8,23	7,6	-	34,3	9,2E+08	13,89
12,0	120,86	283,46	11,86	7,6	0,82	34,7	9,0E+08	4,79
16,0	0,00	372,56	17,31	7,3	-	34,8	8,9E+08	0,00

Tabela 37 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quarto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	504,70	25,31	2,33	7,6	0,66	27,0	1,5E+09	12,82
2,0	440,54	38,31	2,42	7,4	-	34,4	9,2E+08	11,73
4,0	371,70	79,14	2,60	7,6	-	34,6	9,1E+08	14,97
7,0	283,83	145,96	9,14	7,3	-	35,5	8,5E+08	6,64
9,0	137,76	281,45	10,23	7,3	-	34,7	9,0E+08	2,99
12,0	22,68	392,82	15,49	7,5	0,63	34,3	9,2E+08	0,73

Tabela 38 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quinto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	557,21	12,81	4,23	7,7	0,71	29,1	1,3E+09	19,96
3,0	418,95	113,04	4,60	7,0	-	29,1	1,3E+09	3,15
5,0	265,16	280,09	8,23	7,6	0,79	32,5	1,0E+09	9,96
8,0	102,29	354,33	9,50	7,6	0,83	35,7	8,4E+08	4,14
10,0	4,48	447,13	11,86	7,8	-	35,8	8,4E+08	0,31

APÊNDICE G - ENSAIO SEM LAVAGEM DO LODO

Tabela 39 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao acompanhamento do enchimento gradual reator.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	60,19	36,94	6,78	7,9	7,12	33,0	1,0E+09	4,39
16,0	257,23	79,63	2,78	7,7	2,71	32,0	1,1E+09	11,41
19,0	322,70	-	-	7,6	2,21	34,6	9,1E+08	13,59
25,0	-	-	-	7,6	-	34,3	9,2E+08	-
33,0	470,87	40,65	1,51	7,5	1,09	35,3	8,6E+08	18,16

Tabela 40 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	470,87	40,65	1,51	7,5	1,09	35,3	8,6E+08	18,16
11,0	446,95	27,66	2,96	7,5	-	35,3	8,6E+08	16,49
16,0	431,20	46,22	1,33	7,5	-	34,8	8,9E+08	14,74
36,0	-	-	2,78	7,4	0,93	34,8	8,9E+08	-
47,0	453,37	53,65	-	7,3	-	35,1	8,8E+08	10,56
72,0	448,12	57,36	-	7,3	0,90	34,8	8,9E+08	8,74
88,0	390,95	131,60	8,95	7,3	-	35,4	8,6E+08	9,50
94,0	289,89	169,13	5,87	7,5	-	34,8	8,9E+08	10,36
99,0	229,23	250,80	10,50	7,4	0,97	34,6	9,1E+08	5,53
106,0	91,55	319,10	12,22	7,2	-	35,2	8,7E+08	1,79
112,0	20,15	458,27	16,40	7,6	0,92	34,8	8,9E+08	0,90

Tabela 41 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	463,50	31,30	4,87	7,6	0,86	30,0	1,2E+09	14,43
6,5	378,56	72,13	7,32	7,3	-	34,6	9,1E+08	8,54
12,0	285,95	164,94	8,59	7,3	-	34,6	9,1E+08	6,59
17,0	124,69	328,27	9,68	7,2	0,87	35,1	8,8E+08	2,37
21,0	49,09	417,36	16,76	7,4	0,94	34,5	9,1E+08	1,23
24,0	16,61	484,18	19,49	7,2	-	35,2	8,7E+08	0,33

Tabela 42 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	476,57	31,52	2,78	7,5	0,60	29,0	1,3E+09	11,09
3,0	446,23	61,22	6,96	7,3	-	35,0	8,8E+08	10,33
5,0	406,56	90,92	4,78	7,4	-	34,9	8,9E+08	11,96
9,0	354,76	138,43	6,59	7,4	-	35,1	8,8E+08	9,89
14,0	263,76	221,59	7,50	7,3	-	35,0	8,8E+08	6,11
20,0	121,89	377,50	-	7,4	0,79	34,6	9,1E+08	3,44
23,0	81,75	429,47	14,31	7,3	0,78	35,2	8,7E+08	1,92
26,0	3,35	474,01	14,40	7,5	-	35,0	8,8E+08	0,10

Tabela 43 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quarto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	484,87	27,81	7,32	7,4	0,84	30,0	1,2E+09	9,64
4,0	438,20	50,09	11,86	7,5	-	34,7	9,0E+08	14,88
6,0	301,70	105,77	16,76	7,3	0,95	34,5	9,1E+08	6,32
10,0	217,70	231,98	20,94	7,5	-	33,9	9,5E+08	6,28
16,0	11,19	495,55	28,21	7,3	-	34,8	8,9E+08	0,22

Tabela 44 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quinto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	478,45	29,33	1,33	7,6	0,90	27,5	1,5E+09	11,24
2,0	453,37	36,75	4,78	7,5	-	34,5	9,1E+08	15,54
6,0	417,20	62,74	7,32	7,4	0,95	34,5	9,1E+08	10,23
8,0	358,96	103,57	8,41	7,4	-	34,3	9,2E+08	9,71
11,0	188,53	274,33	13,59	7,4	1,00	34,7	9,0E+08	4,79
13,0	115,82	341,15	15,58	7,5	-	35,2	8,7E+08	3,80
15,0	29,86	400,54	18,76	7,4	-	35,2	8,7E+08	0,92

APÊNDICE H - ENSAIOS MARÇO/2010

Ensaio A

Tabela 45 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes a etapa de lavagem do lodo.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	29,86	25,11	0,55	7,3	6,36	30,0	1,2E+09	0,47
4,0	33,36	39,96	2,53	7,5	5,55	34,5	9,1E+08	1,09
13,0	162,28	81,54	5,32	7,0	-	33,4	9,8E+08	1,75
18,5	49,69	84,51	6,22	7,4	4,10	33,4	9,8E+08	1,21
23,0	84,69	78,57	8,74	7,3	3,58	34,0	9,4E+08	1,72
28,0	101,03	97,87	5,14	7,5	2,97	33,4	9,8E+08	2,95
38,0	188,53	96,39	5,95	7,3	2,38	34,8	8,9E+08	3,94
43,0	228,78	94,90	4,87	7,4	1,74	35,2	8,7E+08	6,57
48,0	263,20	96,39	4,69	7,5	1,50	35,5	8,5E+08	8,42
51,0	281,87	91,93	4,15	7,6	1,30	35,2	8,7E+08	11,54

Tabela 46 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	281,87	91,93	4,15	7,6	1,30	35,2	8,7E+08	11,54
3,0	277,20	91,93	4,33	7,6	-	33,9	9,5E+08	11,16
10,0	302,28	97,87	6,85	7,5	1,34	35,0	8,8E+08	10,47
16,0	286,53	94,90	8,29	7,3	-	35,1	8,8E+08	6,68
21,5	284,78	108,27	10,80	7,3	1,23	34,1	9,4E+08	6,36
27,0	256,20	102,33	12,60	7,3	-	35,3	8,6E+08	5,40
37,0	242,20	114,21	12,42	7,4	-	35,1	8,8E+08	6,17
42,0	253,86	117,18	20,16	7,6	1,38	34,3	9,2E+08	9,39
47,0	255,03	123,12	19,08	7,3	-	34,2	9,3E+08	5,73
58,0	221,78	130,54	21,06	7,5	-	33,9	9,5E+08	7,64
64,0	225,86	129,06	23,39	7,6	1,40	35,4	8,6E+08	9,79
69,0	193,78	143,90	24,47	7,6	-	34,0	9,4E+08	7,68
74,0	140,69	194,39	22,86	7,5	-	35,3	8,6E+08	5,19
84,0	19,88	259,72	35,63	7,4	-	34,6	9,1E+08	0,49

Tabela 47 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	250,36	19,95	3,97	7,7	1,11	27,9	1,4E+09	8,46
3,0	202,53	71,92	3,79	7,3	-	34,2	9,3E+08	4,35
11,5	99,86	144,31	14,58	7,3	1,07	33,9	9,5E+08	1,92
15,5	44,44	194,43	10,44	7,3	-	34,9	8,9E+08	1,07
19,0	6,52	216,70	14,04	7,4	-	34,0	9,4E+08	0,17

Tabela 48 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	269,03	22,95	1,09	7,6	0,80	28,3	1,4E+09	7,47
3,0	187,36	52,64	2,89	7,4	-	34,2	9,3E+08	4,82
5,0	155,86	102,76	4,33	7,3	-	35,1	8,8E+08	3,47
7,5	75,36	160,30	7,75	7,5	0,80	34,0	9,4E+08	2,19
13,0	0,00	221,55	11,52	7,4	-	34,0	9,4E+08	0,00

Tabela 49 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quarto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	248,03	16,66	2,53	7,4	0,84	26,4	1,6E+09	3,76
3,0	153,53	115,03	3,79	7,3	0,88	25,0	1,8E+09	1,72
5,0	82,94	148,44	7,03	7,2	-	34,9	8,9E+08	1,52
7,0	36,27	218,97	10,08	7,6	-	34,1	9,4E+08	1,48
9,0	8,86	231,96	12,78	7,3	-	35,2	8,7E+08	0,18

Tabela 50 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quinto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	259,11	29,65	1,81	7,6	0,71	35,7	8,4E+08	11,70
2,0	155,86	59,35	2,35	7,3	-	34,2	9,3E+08	3,42
5,0	66,03	126,17	7,57	7,3	0,79	35,4	8,6E+08	1,47
7,0	18,77	174,43	10,98	7,7	-	34,0	9,4E+08	0,87
8,0	0,00	218,97	13,50	7,5	0,85	34,5	9,1E+08	0,00

Ensaio B

Tabela 51 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes a etapa de lavagem do lodo.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	16,61	25,81	1,43	7,3	6,32	28,0	1,4E+09	0,23
4,0		35,09	7,18	7,0	4,84	33,7	9,6E+08	0,00
12,5	34,52	109,33	7,90	7,1	3,31	33,5	9,8E+08	0,39
18,0	180,36	121,58	7,72	7,3	3,00	33,5	9,8E+08	3,70
23,5	224,70	139,03	5,20	7,3	2,27	33,7	9,6E+08	4,56
28,0	213,03	92,62	5,38	7,3	1,95	34,5	9,1E+08	4,08
38,0	290,62	105,62	2,33	7,6	1,49	35,2	8,7E+08	12,72
43,5	360,03	100,05	3,41	7,7	1,12	34,3	9,2E+08	18,52
48,0	379,87	94,48	1,43	7,5	0,94	34,7	9,0E+08	12,90

Tabela 52 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao primeiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	379,87	94,48	1,43	7,5	0,94	34,7	9,0E+08	12,90
6,0	362,37	105,62	1,79	7,6		34,3	9,2E+08	15,64
12,0	389,20	83,34	4,31	7,5	1,05	35,0	8,8E+08	13,48
18,0	383,37	77,78	5,29	7,2		34,3	9,2E+08	7,08
24,0	378,70	92,62	4,75	7,4	1,06	34,5	9,1E+08	9,49
30,0	398,54	90,77	5,38	7,2	-	35,3	8,6E+08	7,51
40,0	362,37	-	9,16	7,3	-	34,4	9,2E+08	6,89
45,0	351,87	-	7,18	7,4	1,07	35,4	8,6E+08	9,15
50,0	332,03	-	8,08	7,5	-	35,1	8,8E+08	10,82
61,0	284,20	192,85	12,76	7,5	-	34,6	9,1E+08	8,58
67,0	187,95	276,38	-	7,4	1,14	34,4	9,2E+08	5,01
72,0	99,86	352,47	12,94	7,5	-	35,0	8,8E+08	3,78
77,0	19,36	380,32	13,84	7,4	-	34,8	8,9E+08	0,53

Tabela 53 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao segundo ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	448,70	33,04	1,88	7,5	1,20	27,3	1,5E+09	9,94
3,0	389,20	55,31	2,69	7,2	-	35,0	8,8E+08	7,35
12,5	181,53	229,78	9,61	7,3	-	34,9	8,9E+08	3,99
15,0	67,78	320,73	15,55	7,4	1,15	34,7	9,0E+08	1,93
18,0	42,69	346,72	15,01	7,6	-	35,3	8,6E+08	2,01
20,0	0,00	441,38	15,46	7,5	-	34,9	8,9E+08	0,00

Tabela 54 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao terceiro ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	486,04	20,47	0,53	7,7	0,92	27,5	1,5E+09	15,98
3,0	378,70	68,72	1,97	7,5	-	34,3	9,2E+08	12,81
5,0	301,70	116,98	5,74	7,4	0,92	35,1	8,8E+08	8,80
7,5	180,36	284,03	8,44	7,3	-	35,3	8,6E+08	4,07
12,0	24,02	428,80	10,69	7,2	-	34,8	8,9E+08	0,44

Tabela 55 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quarto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	495,37	23,76	1,43	7,3	0,95	25,8	1,7E+09	5,24
3,0	340,20	181,53	6,10	7,2	-	34,5	9,1E+08	6,36
5,5	219,45	296,60	11,14	7,3	-	34,4	9,2E+08	4,67
7,5	124,36	383,84	15,46	7,4	-	35,2	8,7E+08	3,73
9,5	33,36	467,36	16,54	7,2	1,12	35,5	8,5E+08	0,65
11,0	4,19	493,35	16,90	7,3	-	34,6	9,1E+08	0,09

Tabela 56 - Concentrações das formas nitrogenadas, pH, temperatura e concentração celular referentes ao quinto ciclo de alimentação do ensaio.

Tempo (h)	N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	pH	SST (g.L ⁻¹)	T (°C)	Ka	N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0,0	500,04	22,32	3,14	7,6	0,81	27,6	1,5E+09	9,73
2,0	367,62	61,30	4,84	7,2	-	34,7	9,0E+08	3,06
5,0	165,29	180,09	7,54	7,4	-	34,4	9,2E+08	1,50
7,0	61,69	261,75	10,78	7,4	-	35,3	8,6E+08	0,09
9,0	3,08	439,94	15,46	7,5	0,92	34,9	8,9E+08	0,00