

Heloísa Fernandes

**ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA E SUA
INFLUÊNCIA NO DESEMPENHO DE REATORES EM
BATELADAS SEQUENCIAIS EM ESCALA REAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Helena Ribeiro da Costa

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos Antonio.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor
Maiores informações em:
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Heloísa Fernandes

**ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA E SUA
INFLUÊNCIA NO DESEMPENHO DE REATORES EM
BATELADAS SEQUENCIAIS EM ESCALA REAL**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Engenharia Ambiental”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Florianópolis, 10 de maio de 2013.

Prof. Willian Gerson Matias, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Rejane H. R. Costa, Dr.^a
Orientadora
UFSC

Prof.^a Regina V. Antonio, Dr.^a
Co-orientadora
UFSC

Prof.^a Cátia R. S. C. Pinto, Dr.^a
UFSC

Prof. Paulo Belli Filho, Dr.
UFSC

Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr.
UFSC

Prof.^a Juliana C. de Araújo, Dr.^a
UFMG

Prof.^a Delmira B. Wolff, Dr.^a
UFSM

Dedico este trabalho à minha mãe
Valquíria Pacheco, meu exemplo
maior de amor, força e fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente em minha vida, me concedendo paz, guiando e iluminando meus caminhos e escolhas.

À minha mãe Valquíria e ao meu pai Antonio Carlos, por sempre acreditarem em mim, me apoiando e despertando com muito amor tudo aquilo que melhor eu posso ser. Agradeço ainda a minha irmã Aíze, por todo carinho e amor que sentimos e por tudo que somos e representamos uma à outra.

À professora Rejane pela orientação e cumplicidade, a quem tenho o mais profundo respeito e consideração pelo conhecimento compartilhado e pelo exemplo profissional. Obrigada pela oportunidade e por me acolher sempre tão bem!

À professora Regina que sem dúvidas me possibilitou iniciar essa jornada, desde lá longe... me introduzindo no aprendizado das técnicas moleculares, sempre com muita paciência, e sem o qual esse trabalho não teria sido possível. Te agradeço de coração!

À empresa Rotária do Brasil pela concessão dos reatores e confiança no trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da UFSC, pela estrutura de ensino profissional que nos proporciona desenvolver com seriedade e qualidade tantas pesquisas e estudos visando à melhoria do meio ambiente.

Ao Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

À Rede Nacional de Remoção de Nutrientes de Esgotos - RENUTRES (FINEP) pelo suporte financeiro a essa pesquisa.

Aos tantos e queridos bolsistas: Tiago, Alexandre, Gustavo, Lucas, Débora, Gabriela, Geovana, Alessandra, Amanda, Emanuele e Maurício pelo auxílio fundamental nas coletas e na rotina de laboratório, sem os quais as coletas e monitoramentos teriam sido extremamente penosos!

Às “garotas” do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM): Maria Luíza, Karina, Raquel e Franciele que muito me auxiliaram e acompanharam na realização dos experimentos de biologia molecular.

Ao Vitor e à D. Eliane que diariamente zelam pelo Laboratório Integrado do Meio Ambiente (LIMA) mantendo-o em ordem, e por estarem sempre prontos para nos auxiliar com as análises laboratoriais.

À Eliana, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), pelo auxílio técnico durante as análises com o microscópio óptico confocal e com a captura de imagens.

À Chirle e ao Demétrio, do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEBs), pela recepção sempre tão cordial e pelo auxílio técnico com o microscópio de epifluorescência e com a captura de imagens.

A todos os colegas do Labeflu, com os quais compartilhei tantos momentos de seriedade, mas nunca esquecendo a descontração e o bom humor. Em especial, agradeço ao Rodrigo pela convivência sempre tão agradável e pelas conversas esclarecedoras, à Claudia pela sua amizade e por se mostrar sempre tão disposta a ajudar e à Viviane pelas dicas sempre tão bem vindas de cálculo e pela delicadeza diária. Enfim, agradeço a toda equipe que faz desse laboratório um excelente local de estudo e amizade.

À Maressa, que a mais de um ano vem me acompanhando nessa trajetória me mostrando diariamente que é possível passar por momentos difíceis mantendo a leveza e um belo sorriso no rosto. Obrigada Marê pelo carinho, amizade, dedicação e paciência que tens demonstrado comigo e por tornar meus dias mais coloridos e felizes.

A todos os colegas do departamento conquistados ao longo do mestrado e doutorado, desde 2007, que sempre reaparecem para compartilhar das novidades e inquietações.

Aos membros da banca pelas contribuições e aprimoramento deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse realizado com êxito. Muito obrigada!

RESUMO

O rápido crescimento populacional resultou no aumento da demanda de alternativas viáveis para sistemas de esgotamento sanitário em localidades desprovidas desse serviço. Neste estudo, objetivou-se verificar o desempenho de reatores em bateladas sequenciais (RBS) e determinar a composição da comunidade microbiana responsável pela remoção de matéria orgânica e nutrientes. Para tanto, dois reatores em bateladas sequenciais (RBS1 e RBS2), integrantes de sistemas descentralizados de tratamento, em escala real, alimentados com esgoto sanitário, foram operados com baixa concentração de oxigênio dissolvido ($0,3-0,7 \text{ mg L}^{-1}$) e diferentes razões C/N. Os reatores apresentaram variações na carga aplicada ao longo do monitoramento (Etapa II $0,5$ e $0,4 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para os RBS 1 e 2, respectivamente; e na Etapa III variou entre $0,2$ e $3,4 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ no RBS2) não interferindo contudo na sua eficiência. As eficiências de remoção foram superiores a 80% para DQOS e DQOT; 60% para N-NH_4^+ , 70% para SST e 80% para SSV. Verificou-se que as remoções de matéria orgânica e nitrogênio ocorriam nas primeiras horas do ciclo, indicando que o sistema funciona eficientemente em ciclos com duração inferior a 4 horas. A microscopia evidenciou um lodo concentrado composto por amebas nuas e tecadas, ciliados e rotíferos. A biomassa era formada por um consórcio microbiano comumente relatado em sistemas de tratamento por lodos ativados. Houve ocorrência de bactérias nitrificantes dos gêneros *Nitrospira* e *Nitrosomonas* e organismos acumuladores de fosfato em ambos os reatores. Os gêneros *Thiobacillus*, *Desulfovibrio* e organismos acumuladores de glicogênio foram detectados no RBS2, assim como observada elevada incidência de organismos acumuladores de fosfato desnitrificantes (média $\geq 70\%$). A temperatura mostrou-se determinante nos processos de nitrificação. Mudanças na composição bacteriana do lodo foram verificadas ao longo do tempo em ambos os reatores, vinculadas aos fatores operacionais e às variações da qualidade do afluente, com diminuição da diversidade e frequência constante dos grupos nos períodos de alta carga. Houve correlação entre alguns grupos encontrados em períodos de alta e baixa carga. Os resultados reforçam a premissa de que RBS podem se adaptar às mudanças de cargas aplicadas (orgânica e de nutrientes), com aclimação gradual da biomassa.

Palavras-chave: reator em bateladas sequenciais, esgoto sanitário, nitrificação/desnitrificação simultâneas, composição bacteriana.

ABSTRACT

The rapid population growth has generated an increased need for viable alternatives in places without sewage treatment services. This study aimed to verify the performance of reactors (SBR) and determine the microbial communities' composition responsible for organic matter and nutrients removal. For that, two full scale sequencing batch reactors (SBR1 and SBR2), within a decentralized treatment system and fed with sewage were operated with low dissolved oxygen concentration ($0.3\text{-}0.7\text{ mg L}^{-1}$) and different C/N ratios. The reactors presented variation on the applied load (Step II 0.5 and $0.4\text{ kg m}^{-3}\text{ d}^{-1}$ for SBR 1 and 2, respectively; and Step III ranged between 0.2 and $3.4\text{ kg m}^{-3}\text{ d}^{-1}$ for SBR2) which did not interfere in the removal efficiency. The removal was higher than 80% to TCOD and SCOD; 60% to N-NH_4^+ , 70% to TSS and 80% to VSS. Also, the removal of organic matter and nitrogen occurred during the early hours of the cycle, indicating that the system works efficiently operate in cycles that last less than 4 hours. The microscopy showed a very concentrated sludge composed of ciliated protozoa, naked and testate amoebae and rotifers. The biomass was formed by microbial consortium, frequently reported in systems by activated sludge process. It was observed the presence of nitrifying microbes including *Nitrospira* and *Nitrosomonas* genus and polyphosphate accumulating organisms in SBR 1 and 2. The genus *Thiobacillus*, *Desulfovibrio* and glycogen accumulating organisms were detected in SBR2, as well as detected high amount of denitrifying polyphosphate accumulating organisms (average $\geq 70\%$). The temperature was decisive to nitrification processes. Variation on the bacterial sludge composition was verified in both reactors linked to operational factors and variation on the influent quality. Low diversity and constant frequency of microbial groups was observed in high load period. Some groups found in low and high load periods showed correlation. These results reinforce the idea that SBRs can adapt to significant changes in nutrient concentration by gradually acclimating its biomass.

Keywords: sequencing batch reactor, sewage, simultaneous nitrification- denitrification, microbial composition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de um tanque RBS. Fonte: adaptado de Artan e Orhon (2005).....	39
Figura 2 – Representação esquemática das fases de operação de um reator RBS. Fonte: adaptado de Von Sperling (2001).....	40
Figura 3 – Esquema representativo das opções metabólicas para a obtenção de energia pelos microrganismos. Todos os processos apresentados, levam à síntese de ATP. Fonte: adaptado de Madingan et al. (2003).	45
Figura 4 – Esquema representativo das transformações bioquímicas que ocorrem durante as etapas anaeróbia e aeróbia, em OAPs. Fonte: adaptado de Seviour et al., 2003.....	61
Figura 5 - Efeito sobre a concentração de oxigênio dissolvido, após a adição de substrato. 1) a-b-c = condições endógenas; 2) reta b-d = incremento na velocidade de absorção do oxigênio; ponto d = retorno às condições endógenas iniciais (Fonte ANDREOTTOLA et al., 2005). .	65
Figura 6 – Fluxograma da Estação de Tratamento 1: (1) Rede Coletora; (2) Tratamento Preliminar; (3) Reator tipo RBS; (4) Tanque de Contato; (5) Corpo Receptor.....	74
Figura 7 – Fluxograma da Estação de Tratamento 2: (1) Rede Coletora; (2) Tratamento Preliminar; (3) Reator tipo RBS; (4) Tanque de Contato; (5) Corpo Receptor.....	74
Figura 8 – Fotos ilustrativas dos reatores RBS1 e RBS2.	76
Figura 9 – Esquema representativo de funcionamento dos ciclos operacionais.....	77
Figura 10 – Representação esquemática do aparato experimental utilizado nos ensaios de respirometria.....	82
Figura 11 – Representação esquemática da sequência metodológica para determinação da atividade de OAP e OAPD.....	85
Figura 12 – Representação esquemática simplificada da técnica de FISH.	89
Figura 13 – Diagrama esquemático dos artigos elaborados.	91

Figura 14 – Carga Orgânica Volumétrica (COV) aplicada e eficiência de remoção de DQOsolúvel no RBS1.....	93
Figura 15 – Concentração de DQO solúvel durante o Estágio II, no RBS1.....	93
Figura 16 – Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) e sua remoção no RBS1.	94
Figura 17 – Concentração das diferentes espécies de nitrogênio encontradas no RBS1.....	95
Figura 18 – Concentração de $P-PO_4^{3-}$ no afluente e efluente do RBS1.	96
Figura 19 – Concentração de sólidos no RBS1 e efluente.....	97
Figura 20 – Remoção e concentração de sólidos suspensos voláteis afluente e efluente no RBS1.....	98
Figura 21 – Relação Alimento/Microrganismos (A/M) no RBS1 ao longo do período monitorado.....	98
Figura 22 – Porcentagem de distribuição bacteriana analisada com a técnica de FISH e sua correlação com a temperatura (°C) e biomassa ativa autotrófica (%) ao longo do tempo no RBS1.	101
Figura 23 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados do 16S rDNA pela técnica de DGGE utilizando DNA genômico extraído do licor misto das amostras do SBR1, ao longo dos dias de monitoramento.	104
Figura 24 – Análise de agrupamento mostrando a similaridade entre diferentes impressões moleculares no RBS1, obtidas por DGGE.....	107
Figura 25 – Carga Orgânica Volumétrica (COV) aplicada e eficiência de remoção de DQOsolúvel no RBS2.....	109
Figura 26 – Concentração de DQO solúvel durante o Estágio II, no RBS2.....	109
Figura 27 – Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) e sua remoção no RBS2.	110
Figura 28 – Concentração das diferentes espécies de nitrogênio encontradas no RBS2.....	110
Figura 29 – Concentração de $P-PO_4^{3-}$ no afluente e efluente do RBS2.	112

Figura 30 – Concentração de sólidos no RBS2 e efluente.	113
Figura 31 – Relação Alimento/Microrganismos (A/M) no reator RBS ao longo do período monitorado.	113
Figura 32 – Microfotografias dos protozoários presentes no RBS2: (A) Ciliados livres entre as partículas de lodo ativado; (B) <i>Arcella vulgaris</i> ; (C) <i>Vorticella convallaria</i> aderida aos flocos de lodo; (D) <i>Euglypha tuberculata</i>	114
Figura 33 – Fotografias obtidas por MEV da comunidade microbiana no RBS2. A e B) Colônias bacterianas; C) Ciliado pedunculado e D) <i>Euglypha</i> sp.	116
Figura 34 – Captação de fósforo durante ensaios de bancada com lodo do SBR2 em condições anaeróbias e aeróbias (SSV=2,5 e 2,8 g L ⁻¹ , respectivamente).	119
Figura 35 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados do 16S rDNA pela técnica de DGGE utilizando DNA genômico extraído do licor misto das amostras do RBS2, ao longo dos dias de monitoramento. Análise de agrupamento apresentada como um dendograma mostrando a similaridade entre diferentes impressões moleculares no reator.	121
Figura 36 – Esquema operacional dos ciclos monitorados.	124
Figura 37 – Concentração de DQOS e P-PO ₄ ³⁻ no RBS2 durante os Ciclos I, II e III. “A” representa o período anóxico e “O” o período óxico.	126
Figura 38 – Concentração de Nitrogênio-N e pH no RBS2 durante os Ciclos I, II e III. “A” representa o período anóxico e “O” o período óxico.	128
Figura 39 – Fotografias obtidas por MEV da comunidade microbiana no RBS2 em um ciclo de 8:50 horas. A e B) Colônias bacterianas constituídas na sua maioria por células em forma de cocos.	131
Figura 40 – Microfotografias de microrganismos aderidos no lodo, presentes no RBS2: (A) <i>Tocophyra</i> sp. e (B) rotífero.	131
Figura 41 – Carga orgânica aplicada e a eficiência de remoção no RBS2, durante os Períodos 1 e 2 monitorados.	136
Figura 42 – Concentração de DQOS afluente e efluente e eficiências de remoção, no RBS2 durante os Períodos 1 e 2 monitorados.	137

Figura 43 – Nitrogênio Total Kjeldahl afluente, efluente e eficiências de remoção.....	138
Figura 44 – Variações nas concentrações das diferentes espécies de nitrogênio, no RBS durante os Períodos 1 e 2 monitorados.....	139
Figura 45 – Concentração de sólidos no reator e no efluente nos Períodos 1 e 2 monitorados no RBS2.	142
Figura 46 – Relação Alimento/Microrganismo (g DQO/g SSV d) nos Períodos 1 e 2 monitorados no RBS2.	142
Figura 47 – Distribuição dos grupos bacterianos analisados pela técnica de FISH no RBS2 e sua correlação com a temperatura (°C) e biomassa autotrófica ativa específica ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ SST h}^{-1}$) ao longo de todo período monitorado.	145
Figura 48 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados do 16S rDNA pela técnica de DGGE utilizando DNA genômico extraído do licor misto das amostras do RBS2, ao longo dos Períodos 1 e 2 monitorados.....	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados adotados no projeto das ETes 1 e 2.....	73
Tabela 2 – Características físicas dos Reatores 1 e 2.	75
Tabela 3 – Variáveis monitoradas e metodologias empregadas nas análises físico-químicas e biológicas.	80
Tabela 4 – Descrição das sondas utilizadas nas análises das amostras dos reatores.....	90
Tabela 5 – Resultados encontrados na pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE do RBS1.	105
Tabela 6 – Detalhes dos resultados positivos obtidos pelo técnica de FISH para as diferentes sondas utilizadas, grupos alvo e média de incidência para todo o período monitorado no RBS 2.	117
Tabela 7 – Comparação entre as diferentes taxas de fósforo liberado e captado durante os ensaios de bancada, por organismos OAP e OAPD.	118
Tabela 8 – Resultados encontrados na pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE do RBS2.	122
Tabela 9 – Cargas aplicadas no RBS2 para cada ciclo monitorado....	125
Tabela 10 – Condições dos ciclos e desempenho do RBS2. Valores apresentados com média \pm SD. ND = não detectado.	127
Tabela 11 – Detalhes dos resultados positivos obtidos pelo técnica de FISH para as diferentes sondas utilizadas, grupos alvo e média de incidência para todo os ciclos monitorados no RBS 2.	132
Tabela 12 – Cargas volumétricas aplicadas para os dois períodos monitorados no RBS2.	135
Tabela 13 – Carga de nutrientes e matéria orgânica aplicada, removida e respectivas eficiências de remoção, nos Períodos 1 e 2 no RBS2.....	141
Tabela 14 – Resultados encontrados na pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE do RBS2 durante o Período 2.	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
APHA	American Public Health Association
ATP	Adenosina-Trifosfato
CH ₃ COOHNa	Acetato de Sódio
C/N	Relação carbono/nitrogênio
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DAPI	4,6 diamidino 2 phenylindol
d	Dia
DGGE	Gel de gradiente desnaturante
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
rDNA	ribossômico
DQOS	Demanda Química de Oxigênio Solúvel
DQOT	Demanda Química de Oxigênio Total
Fe	Fase de Enchimento
F _A	Fase Reação/Aeróbia/Anóxica
F _S	Fase Sedimentação ou Decantação
F _{Re}	Fase de Retirada
F _R	Fase de Repouso
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
LABEFLU	Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos
LBBMM	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos
LIMA	Laboratório Integrado do Meio Ambiente
m	Metro
NDS	Nitrificação e Desnitrificação Simultânea
NTK	Nitrogênio Total Kjeldhal
OD	Oxigênio Dissolvido
ORP	Potencial Redox
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
RBS	Reator em Bateladas Sequenciais
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RNAr	Ácido Ribonucléico Ribossômico
A/M	Relação Alimento/Microrganismo
S	Unidades de <i>Sveldberg</i>
SST	Sólidos Suspensos Totais

SSV
T

Sólidos Suspensos Volátiles
Temperatura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Hipóteses da pesquisa.....	29
1.2 Justificativas	30
1.3 Objetivos	32
1.3.1. <i>Objetivo Geral.....</i>	<i>32</i>
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	<i>32</i>
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 Dados sobre o saneamento básico no Brasil.....	33
2.2 Sistemas descentralizados de tratamento de esgotos.....	35
2.3 Reatores em bateladas sequenciais (RBS).....	36
2.4 Microrganismos presentes em RBS	42
2.5 Exigências nutritivas das bactérias.....	44
2.6 Principais Transformações bioquímicas no tratamento de esgotos.....	46
2.6.1 <i>Processos de Remoção da Matéria Orgânica.....</i>	<i>46</i>
2.6.2 <i>Processos de Remoção do Nitrogênio.....</i>	<i>49</i>
2.6.2.1 <i>Nitrificação.....</i>	<i>49</i>
2.6.2.2 <i>Desnitrificação.....</i>	<i>52</i>
2.6.2.3 <i>Nitrificação e Desnitrificação Simultânea (NDS).....</i>	<i>55</i>
2.7 Processos de remoção biológica do fósforo	58
2.8 Respirimetria de lodos ativados	62
2.8.1 <i>Determinação da Biomassa Ativa</i>	<i>64</i>
2.9 Análise da diversidade microbiana e utilização da biologia molecular como ferramenta de caracterização microbiológica... 65	
2.9.1 <i>Estrutura do RNAr e Aplicação Taxonômica.....</i>	<i>66</i>
2.9.2 <i>A Técnica de Hibridização Fluorescente In Situ - FISH.....</i>	<i>68</i>
2.9.3 <i>A Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....</i>	<i>69</i>
2.9.4 <i>A Técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante - DGGE.....</i>	<i>71</i>
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3.1 Unidades de Tratamento	73
3.1.1 <i>Localização</i>	<i>73</i>
3.1.2 <i>Descrição dos Sistemas de Tratamento.....</i>	<i>73</i>
3.2 Amostragem e monitoramento dos reatores	78
3.3 Variáveis físico-químicas	79

3.4 Identificação microbiológica do lodo.....	80
3.5 Respirimetria – determinação da taxa de consumo de oxigênio (TCO) e análise da biomassa ativa	81
3.6 Determinação da atividade de organismos acumuladores de fósforo	84
3.7 Identificação bacteriana utilizando técnicas moleculares	86
3.7.1 <i>Extração de DNA Genômico.....</i>	86
3.7.2 <i>Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....</i>	86
3.7.3 <i>Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante - DGGE... </i>	87
3.7.4 <i>Hibridização Fluorescente In Situ - FISH</i>	87
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.1 ARTIGO 1: Análise da comunidade microbiana por técnicas moleculares e sua influência na eficiência do RBS1 - ESTÁGIO II	92
4.1.1 <i>Remoção de Matéria Orgânica e Nutrientes.....</i>	92
4.1.2 <i>Caracterização da Biomassa</i>	96
4.1.3 <i>Diversidade Microbiológica e Análise Filogenética Bacteriana.....</i>	98
4.1.4 <i>Conclusões</i>	107
4.2 ARTIGO 2: Desempenho e diversidade da comunidade microbiana no RBS2 - ESTÁGIO II.....	108
4.2.1 <i>Remoção de Matéria Orgânica e Nutrientes.....</i>	108
4.2.2 <i>Caracterização da Biomassa</i>	112
4.2.3 <i>Análise da Comunidade Microbiológica.....</i>	113
4.2.4 <i>Análise de FISH e da Atividade de Organismos OAP/OAPD</i>	116
4.2.5 <i>Identificação das Bandas do DGGE e Análise Filogenética</i>	119
4.2.6 <i>Conclusões</i>	123
4.3 ARTIGO 3: O papel dos microrganismos no RBS2 quando operado sob condições de baixa aeração e diferentes tempos de ciclo - ESTÁGIO III.....	124
4.3.1 <i>Remoção de Matéria Orgânica e Nutrientes.....</i>	124
4.3.2 <i>Caracterização da Biomassa</i>	129
4.3.3 <i>Análise da Diversidade Microbiana</i>	130
4.3.4 <i>Conclusões</i>	134

4.4 ARTIGO 4: Estrutura da comunidade microbiana e sua influência no desempenho do RBS2 quando operado sob condições de baixa e alta carga orgânica - ESTÁGIO II E III..	135
4.4.1 <i>Remoção de Matéria Orgânica e Nutrientes</i>	135
4.4.2 <i>Caracterização da Biomassa</i>	141
4.4.3 <i>Diversidade Microbiana e Análise Filogenética Bacteriana</i>	142
4.4.4 <i>Conclusões</i>	148
5. CONCLUSÕES FINAIS	149
6. RECOMENDAÇÕES.....	153
REFERENCIAS	155
APENDICE 1	175

1. INTRODUÇÃO

No Brasil grande parte dos recursos hídricos encontra-se com sua qualidade comprometida devido, principalmente, ao lançamento de esgotos de diversas origens não tratados ou inadequadamente tratados. Apesar do crescente aumento dos investimentos públicos em saneamento básico, ainda é grande a parcela da população brasileira não servida por rede de esgoto e tão pouco por sistemas de tratamento.

De acordo com dados levantados em um estudo intitulado *Progress on Sanitation and Drinking Water* (OMS/UNICEF, 2010) realizado nas 100 maiores cidades brasileiras (totalizando 77 milhões de habitantes ou 40% da população total), enquanto pouco mais de 90% da população tem acesso a água potável (restando ainda 7 milhões de habitantes sem acesso), 40,3% da população ainda não é atendida por rede de coleta esgoto, e somente 36,28% do volume de esgoto gerado é tratado, ou seja, quase 8 bilhões de litros de esgoto são lançados todos os dias nas águas brasileiras sem nenhum tratamento.

A Região Sul, especialmente o estado de Santa Catarina, embora considerado um dos estados com melhor qualidade de vida do Brasil, vêm se destacando negativamente no que diz respeito ao abastecimento de água (apenas 81,6% da população atendida) e ainda, por apresentar apenas 24,1% da população urbana atendida por rede de coleta e tratamento dos esgotos domésticos, perfazendo um dos piores índices do Brasil (IBGE, 2008).

Dentro dessa perspectiva, tornam-se relevantes estudos aprofundados que possam contribuir com o tratamento dos esgotos, e que apresentem viabilidade econômica, fornecendo subsídios à implantação de sistemas que produzam efluentes de satisfatória qualidade físico-química e sanitária, não comprometendo as características dos corpos d'água receptores e a saúde da população.

Devido à carência notória e a necessidade de intensificar ações de saneamento local, especificamente em relação ao tratamento dos esgotos, novas estratégias para a gestão e conservação dos recursos naturais vêm sendo implantadas com significativa atenção aos sistemas descentralizados de tratamento (DEVI e DAHIYA, 2008).

Sistemas descentralizados de tratamento têm-se apresentado como excelente alternativa para pequenas coletividades, uma vez que, além de priorizar a redução da extensão da rede de esgotos (reduzindo

os custos com o transporte dos esgotos gerados) bem como buscar alternativas que melhor se adaptem a realidade local, apresentam o mesmo grau de eficiência no aspecto sanitário e ecológico (PHILIPPI *et al.*, 2007).

Diversas tecnologias de tratamento vêm sendo utilizadas em sistemas descentralizados tais como filtros biológicos, terras úmidas (do inglês *wetlands*) e reatores em bateladas sequenciais (RBS). Destes sistemas alternativos, o RBS é talvez o sistema descentralizado mais promissor e viável, particularmente em regiões de rápido crescimento, como é o caso do Sul do Brasil (THANS, 2008).

Os sistemas com reatores tipo RBS apresenta uma série de vantagens por ser flexível, ou seja, o reator funciona com ciclos adaptados às necessidades de eficiência de tratamento, à vazão de esgoto e da carga orgânica afluyente; redução do tamanho do sistema de tratamento; menor produção de lodo; e menor consumo de energia. Além disso, quando avaliados os RBS estes se apresentam como a modificação mais viável e promissora do processo de lodos ativados para a remoção, não somente da matéria orgânica, mas também de nutrientes (nitrogênio e fósforo) de águas residuárias (ARTAN e ORHON, 2005).

Os processos de remoção dos nutrientes são fundamentais, uma vez que, quando presente em esgotos domésticos, são responsáveis por causar uma série de problemas ao meio ambiente, dentre os quais o fenômeno da eutrofização, refletindo na diminuição da oferta de oxigênio necessária para as reações vitais dos organismos presentes no ambiente aquático (COELHO *et al.*, 2000).

Nos esgotos domésticos o nitrogênio se apresenta nas formas orgânica e inorgânica (íons amônio), enquanto o fósforo é encontrado na forma de ortofosfatos, polifosfatos e fósforo orgânico, sendo suas concentrações bastante variadas e influenciadas pela presença de despejos industriais e cargas não pontuais.

Os RBS utilizam em seu funcionamento uma sequência de condições anaeróbias/anóxica/aeróbias, que possibilita a remoção de carbono, nitrogênio e fósforo ao longo de um mesmo ciclo (THIRD *et al.*, 2005; DEBIK e MANAV, 2010). A remoção biológica do nitrogênio geralmente é realizada pela combinação dos processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica e, devido à baixa taxa de crescimento dos organismos envolvidos, é geralmente considerada como

o passo limitante da velocidade global do processo de tratamento biológico (METCALF e EDDY, 2003). A remoção do nitrogênio é catalisada por bactérias nitrificantes ETEquimiolitoautotróficas especializadas, que realizam esse processo através de duas etapas já bem elucidadas (SEVIOUR e NIELSEN, 2010; DIONISI *et al.*, 2002).

Este processo é frequentemente combinado com a desnitrificação, onde ocorre a redução de nitrito e nitrato a óxidos de nitrogênio gasosos (como óxido nitroso ou nitrogênio livre). A desnitrificação é um processo realizado por bactérias heterotróficas anaeróbias facultativas e, pouco frequentemente, por algumas bactérias autotróficas. Além disso, enquanto a nitrificação ocorre principalmente sob condições aeróbicas, a desnitrificação exige condições anóxicas com a presença de nitrito ou nitrato e de substratos orgânicos facilmente degradáveis (NIELSEN e HANSEN, 2009).

No entanto, quando um RBS é operado sob concentração reduzida de oxigênio, o controle do consórcio microbiano aeróbio e anaeróbio não é necessário uma vez que a remoção de nutrientes pode ser realizada por um processo de nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia simultânea, também denominado NDS (COSTA *et al.*, 2008; KULKARNI, 2013). Esse processo pode ocorrer devido à formação de microzonas anóxicas/aeróbias dentro dos flocos biológicos ou de macrozonas anóxicas/aeróbias dentro do reator biológico (THIRD *et al.*, 2005, JU *et al.*, 2007). No entanto, também pode ser devido à presença de determinados microrganismos tais como bactérias heterotróficas capazes de realizar NDS aerobicamente, convertendo amônio em nitrogênio gasoso, utilizando substratos orgânicos como fontes de carbono e energia, mesmo sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido (BERKS *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 2003).

Quanto à remoção biológica do fósforo, esta ocorre através da absorção deste nutriente por um grupo de bactérias conhecidas como organismos acumuladoras de polifosfato (OAP). Isso é tipicamente alcançado quando o reator é operado sob condições de alternância entre as fases aeróbicas e anaeróbias ou anóxicas, com carbono orgânico biodegradável (WU *et al.*, 2009).

De acordo com o exposto acima, observa-se que a composição e atividade da comunidade microbiana apresentam relação estreita com a eficiência com que os nutrientes são removidos em um sistema de tratamento. No entanto, a maioria dos estudos focados na investigação

dessas comunidades em RBS, utiliza sistemas em escala laboratorial ou em escala piloto, restando poucos trabalhos realizados em escala real, onde dificuldades operacionais, interferências interespecíficas e de fatores ambientais se apresentam (CABEZAS *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011). Dessa forma, o entendimento da microbiologia e ecologia dos organismos presentes e diretamente envolvidos nos processos biológicos, é fundamental para o controle da eficiência do tratamento. Além disso, o conhecimento da fisiologia dos microrganismos pode evidenciar o papel de cada um nas diferentes etapas desse processo.

Através da introdução de um conjunto de técnicas em biologia molecular, tornou-se possível determinar a composição e dinâmica das comunidades microbianas nesses sistemas, bem como identificar os microrganismos chave envolvidos nos diferentes processos microbiológicos (PURKHOLD, 2000; WU *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2010). Técnicas moleculares como a Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH, do inglês *fluorescent in situ hybridization*), a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), e a Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *denaturing gradient gel electrophoresis*) são amplamente utilizadas para descrever a diversidade genética dos microrganismos nos diferentes ambientes. A combinação desses métodos moleculares com aqueles relacionados com a microbiologia tradicional permite uma análise detalhada da diversidade microbiana no sistema.

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU/ENS/UFSC) o qual vem desenvolvendo trabalhos relacionados com a problemática e tratamento de efluentes domésticos e industriais, utilizando diversos sistemas de tratamento, dentre os quais reatores de leito fluidizado (WOLFF, 1997; BARTHEL, 1998; SALES, 1999; CAMPOS, 2001; MARTINS, 2003), reatores de leito fluidizado em bateladas sequenciais (BARBOSA, 2004; BORTOLOTTO NETO, 2004; CAMPOS, 2006), sistemas híbridos de fluxo contínuo ou em bateladas sequenciais (WOLFF, 2005; SOUTO, 2007; LAMEGO NETO, 2008) e sistemas RBS (COSTA, 2005; THANS, 2008; WAGNER, 2011; JUNGLES, 2011).

Os reatores utilizados neste estudo constituem sistemas de tratamento, em escala real, de dois condomínios residenciais localizados no município de Florianópolis/SC, os quais integram, desde 2010, um dos projetos de pesquisa desenvolvidos pela rede cooperativa de

pesquisa intitulado "Desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias de tratamento terciário de esgotos sanitários", da Rede Nacional de Remoção de Nutrientes de Esgotos - RENUOTRES (FINEP Edital 06/2010). Com o intuito de contribuir na formação do conhecimento científico e servir como base para propostas de apoio à tomada de decisões relacionadas ao gerenciamento de estações de tratamento de esgotos (ETE), a composição da diversidade microbiana presente foi verificada mediante o uso das técnicas moleculares de FISH, PCR-DGGE, bem como a sua influência na remoção da matéria orgânica e de nutrientes.

1.1. HIPÓTESES DA PESQUISA

Essa pesquisa foi conduzida sob as seguintes hipóteses:

Hipótese 1. Reatores em bateladas sequenciais, em escala real, são capazes de funcionar com baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($\leq 1 \text{ mg L}^{-1}$) e realizar a remoção de matéria orgânica e nutrientes, mesmo quando não há um controle rigoroso das espécies precedentes ao tratamento;

Hipótese 2. A ecologia microbiana é função das condições operacionais (tempo dos ciclos, sazonalidade, carga orgânica) do reator, levando a variações na sua ocorrência e diversidade, com diferentes respostas na qualidade do efluente;

A partir destas hipóteses, as seguintes questões norteadoras foram formuladas:

1ª. Quais microrganismos estão envolvidos nos processos biológicos que ocorrem nestes reatores?

2ª. Como a variação no tempo total do ciclo de operação do RBS interfere na comunidade microbiana e na eficiência do tratamento?

3ª. Como a sazonalidade interfere na concentração do esgoto afluyente (carga orgânica) e nos processos biológicos responsáveis pelo tratamento?

1.2 JUSTIFICATIVAS

A adequação de efluentes domésticos e industriais aos padrões de lançamento, determinados por lei, exige a remoção de compostos potencialmente poluidores, tais como compostos nitrogenados e componentes fosforados. Esses, quando removidos indevidamente, podem resultar no acúmulo de nutrientes nas águas superficiais, acarretando a proliferação de algas, o consumo de oxigênio dissolvido e a eutrofização.

A eutrofização representa um dos mais sérios problemas em relação à poluição das águas, uma vez que deteriora a aparência dos corpos hídricos, ocasionando problemas de odores e baixo nível de oxigênio dissolvido, resultando na mortandade de organismos aquáticos. Desta forma, o tratamento de esgotos visa primordialmente à proteção, de maneira econômica e socialmente aceitável, do meio ambiente e consequentemente, da saúde pública.

Em diversos países existem legislações que objetivam padronizar o lançamento dos esgotos nos corpos receptores. No Brasil, as diretrizes nacionais para o saneamento básico e para a política federal de saneamento básico são estabelecidas através da Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007, que estabelece os marcos regulatórios do setor, nos seus quatro componentes: abastecimento de água, esgotamento sanitário, manejo de resíduos sólidos e manejo de águas pluviais. Para o alcance dessas diretrizes, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) apresenta-se como órgão responsável, estabelecendo padrões de qualidade das águas naturais através da Resolução nº 430 de 2011. Em Santa Catarina, o Código Estadual de Meio Ambiente, através da Lei nº 14.675 de 13 de abril de 2009, Artigo 177, fixa condições previstas nas normas federais, para lançamento de efluentes, em corpos de água interiores, lagoas, estuário e na beira-mar.

A cidade de Florianópolis, local de realização deste estudo, segundo relatório do Instituto Trata Brasil, ocupa a 30ª posição do ranking, com apenas 51% do esgoto coletado e 40% tratado. Observa-se

dessa forma, uma necessidade de desenvolver alternativas de tratamento que possam reduzir estes índices e que sejam efetivamente eficientes (Associação FloripAmanhã, 2011).

O tratamento de águas residuárias utilizando RBS tem despertado interesse como tecnologia moderna, eficiente e de baixo custo para o tratamento de esgotos, uma vez que é capaz de aliar a redução da área ocupada pelas unidades de tratamento, com abatimento de custos em relação aos processos contínuos e mínima utilização de mão-de-obra e energia.

Devido à ampla diversidade taxonômica, observações microscópicas fornecem poucas informações sobre as espécies e gêneros bacterianos predominantes nestes ambientes. Métodos da biologia molecular, baseadas na análise de fragmentos específicos de 16S ou de genes cromossomais que os codificam (RNAr 16S) têm importância fundamental para o estudo da diversidade de microrganismos em amostras ambientais. Além disso, a análise dos ácidos nucléicos extraídos da comunidade total do ambiente permite a detecção e identificação filogenética da maioria dos organismos, incluindo aqueles não cultivados.

As técnicas FISH, PCR e DGGE são amplamente utilizadas para descrever a diversidade genética dos microrganismos. A combinação desses métodos moleculares com aqueles relacionados com a microbiologia tradicional permite uma análise detalhada da diversidade microbiana no sistema.

O presente estudo foi realizado em dois sistemas descentralizados de tratamento ambos já instalados e em atividade, visando aprofundar os conhecimentos relativos ao tratamento de esgotos domésticos, contribuindo através de uma abordagem taxonômica dos microrganismos encontrados nas diferentes etapas de tratamento. Partindo dos princípios desta problemática, o presente trabalho justifica-se ao buscar soluções e ou informações que possam aprofundar e minimizar os problemas com manutenção e operação das estações, atuando como uma ferramenta de controle e aprimoramento da qualidade do efluente.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo Geral

Avaliar a composição e diversidade da comunidade microbiana e sua influência no desempenho de dois reatores operados em bateladas sequenciais (RBS), em escala real, no tratamento de esgoto sanitário.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o comportamento de reatores em condições reais de variações de carga orgânica, baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($\leq 1 \text{ mg L}^{-1}$) e tempos de ciclos variados;
- Verificar a atividade e composição da comunidade microbiana presente nos reatores;
- Avaliar a comunidade microbiana presente nos reatores e sua relação na qualidade do efluente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DADOS SOBRE O SANEAMENTO BÁSICO NO BRASIL

As atitudes comportamentais do homem, desde que ele se tornou parte dominante dos sistemas, têm demonstrado uma tendência em sentido contrário à manutenção do equilíbrio ambiental. Não podendo criar as fontes que satisfazem suas necessidades fora do sistema ecológico, o homem impõe uma pressão cada vez maior sobre o meio ambiente (WREGGE, 2000).

Os corpos hídricos são utilizados em todo o mundo com distintas finalidades, dentre as quais o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aqüicultura e a harmonia paisagística. No entanto, nas últimas décadas, esse recurso vem sendo ameaçado pelas ações indevidas do homem resultando em sérios prejuízos ambientais, especialmente em regiões densamente povoadas ou em regiões turísticas, como o litoral brasileiro, cujo lançamento contínuo de cargas orgânicas e tóxicas em suas bacias hidrográficas tem provocado a degradação dos corpos receptores (MORAES e JORDÃO, 2002).

Esta degradação, agravada pelo aumento da densidade populacional, somada à escassez de sistemas de coleta e tratamento dos esgotos produzidos, resulta na busca de fontes de água bruta para abastecimento público em regiões cada vez mais distantes, ocasionando maiores investimentos neste setor de prestação de serviços. Além disso, estima-se que 80% de todas as enfermidades e mais de um terço dos óbitos dos países em desenvolvimento sejam causados pelo consumo de água contaminada, e, em média, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa se perde devido a doenças relacionadas à água (WREGGE, 2000). Os esgotos e excrementos humanos são causas importantes dessa deterioração da qualidade da água uma vez que tais efluentes podem conter misturas tóxicas, como pesticidas, metais pesados, produtos industriais dentre outras substâncias nocivas.

Buscando amenizar este quadro, atualmente, no Brasil, a questão do saneamento básico vem ganhando grandes dimensões com a promulgação da Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007, que estabelece os marcos regulatórios do setor, nos seus quatro componentes:

abastecimento de água, esgotamento sanitário, manejo de resíduos sólidos e manejo de águas pluviais. No entanto, entre os quatro serviços analisados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) na Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB 2008), os de coleta de esgoto sanitário por rede foi o que apresentou menor parcela por residências brasileiras atendidas. Apenas 44% dos 57,7 milhões de domicílios do País (dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios de 2008) tinham acesso à rede geral de esgoto em 2008, ou seja, 25 milhões de domicílios. No ranking entre os estados atendidos, apenas na região Sudeste mais da metade dos domicílios (69,8%) tinha acesso à rede. A segunda região em cobertura do serviço foi a Centro-Oeste (33,7%), com resultado semelhante ao do Sul (30,2%), seguidos pelas regiões Nordeste (22,4%) e Norte (3,8%). Quanto ao tratamento dado ao resíduo coletado, a pesquisa apontou que apenas 28,5% dos municípios brasileiros fazem tratamento de seu esgoto. Mesmo na região Sudeste, onde 95,1% dos municípios possuíam coleta de esgoto, menos da metade desses (48,4%) o trataram. Além do Sudeste, o melhor desempenho nesse sentido foi observado nas regiões Centro-Oeste (25,3%) e Sul (24,1%). A menor proporção de municípios com coleta (13,4%) e tratamento de esgoto (7,6%) foi observada no Norte.

Quando analisado o estado de Santa Catarina, das 293 cidades, apenas 16% apresenta esgoto sanitário captado e tratado (IBGE, 2008), apresentando-se como 11º pior estado neste setor. Essa percentagem aumenta quando a realidade é transportada para a Região Metropolitana de Florianópolis, que apresenta apenas 50% dos esgotos sanitários coletados e tratados nas diversas Estações de Tratamento de Esgoto da cidade (FloripAmanhã, 2011).

Desta forma, observa-se que embora o controle ambiental seja uma grande preocupação governamental, para reverter a tendência à degradação a fim de assegurar que não ocorram prejuízos irreparáveis, bem como garantir a melhoria de qualidade das gerações atuais e futuras, tornam-se necessárias concepções técnicas que valorizem a redução da extensão da rede de esgoto bem como buscar alternativas de tratamento que melhor se adaptem a realidade local. Assim, serviços de esgotamento sanitário que possam ser disponibilizados sem que haja necessidade de captação deste para um único ponto centralizador de tratamento, podem e devem ser priorizados para pequenos conglomerados urbanos, caracterizando uma *descentralização* dos

serviços, reduzindo assim, custos para o transporte dos esgotos gerados (PHILIPPI, 2007, DEVI e DAHIYA, 2008).

2.2 SISTEMAS DESCENTRALIZADOS DE TRATAMENTO DE ESGOTOS

O aumento da necessidade de estudar alternativas para o sistema de esgotamento sanitário das localidades desprovidas destes serviços deve-se, principalmente, ao crescimento acelerado das cidades nestas últimas décadas. Assim, priorizando-se as tendências atuais de descentralização das unidades de tratamento de esgotos, frente aos elevados custos verificados pela área de operação e manutenção de unidades operacionais de esgotos, surge uma nova concepção de disponibilização destes serviços através dos “*sistemas descentralizados de tratamento de esgotos*”.

Sistemas descentralizados de tratamento de esgotos incluem-se, portanto, numa das principais alternativas para pequenas coletividades, inserida no contexto da região e que deve ser gerenciada sob as condições sócio-ambientais locais. Estes sistemas, podem ser empregados em residências ou estabelecimentos comerciais, devendo os esgotos coletados serem conduzidos para uma sequência de unidades de tratamento (simplificadas), onde se promoverá o tratamento e a disposição final do efluente. A disposição, poderá ocorrer dentro do próprio terreno (quando apresentando características apropriadas) ou ser destinada para a rede pluvial (com a devida autorização da municipalidade) (PHILIPPI *et al.*, 2007).

Legislações específicas para sistemas descentralizados de esgotos são inexistentes no Brasil, porém, cabe à cada município a função de legislar sobre as diferentes situações, pois, apesar de não requererem o mesmo grau de complexidade operacional das estações convencionais de tratamento, estes, devem apresentar, segundo a óptica da engenharia sanitária, o mesmo grau de eficiência. Em alguns municípios, a regulação e controle do lançamento dos esgotos é realizado pela Vigilância Sanitária, que instrui através das normativas vigentes, a melhor alternativa para a promoção da eficiência no tratamento (PHILIPPI, 2010).

Quanto aos sistemas de tratamento empregados, o mais antigo e conhecido sistema de pré-tratamento utilizado desde o final do século XIX em sistemas descentralizados tem sido o tanque séptico. Devido à sua simplicidade construtiva e operacional, os tanques sépticos correspondem ao sistema mais utilizado em áreas não servidas por sistemas coletores (IBGE, 2000). Como tratamento complementar ao tanque séptico, várias opções podem ser consideradas. A NBR 13969 (ABNT, 1997) apresenta algumas alternativas técnicas consideradas viáveis para proceder ao tratamento complementar e disposição final de efluentes de tanque sépticos, destacando-se como opções de tratamento os filtros anaeróbios, filtros aeróbios submersos, valas de filtração e filtros de areia, lagoas com plantas aquáticas e os sistemas de lodos ativados por bateladas. A Norma ainda observa que estas são somente opções de tratamento, não impedindo que sejam utilizados outros sistemas alternativos.

Atualmente, podem ser facilmente adquiridos pacotes tecnológicos que, embora requeiram mão de obra especializada, garantem maior viabilidade para a escassez de espaço físico e obtenção de efluentes de qualidade. Dentre esses sistemas, os que utilizam processos biológicos, como os sistemas de lodos ativados, bem como suas variantes, em batelada sequencial, tem sido largamente empregado (GOMES e HARADA, 1997).

Os reatores em bateladas sequenciais (RBS) conquistaram nos últimos anos grande importância em todo o mundo, devido aos progressos na área de automação. Isto ocorre porque, ao automatizar todo um sistema de tratamento, torna-se possível remover os nutrientes com uma operação estável, mesmo em regiões que apresentam grandes variações no número de habitantes (WILDERER, 2001). Além disso, esses sistemas permitem o aprimoramento do controle das características e concentrações do efluente podendo-se determinar o tempo de ciclo e de reação que permitam à estes, alcançar os padrões de lançamento.

2.3 REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS (RBS)

Reatores do tipo RBS apresentam-se como um sistema biológico de tratamento de águas residuárias, cujos ciclos sequenciais intermitentes de aeração e não aeração permite, em uma mesma unidade,

a oxidação da matéria carbonácea, a remoção de nutrientes e a separação sólido/líquido através da sedimentação (SOUSA e FORESTI, 2001).

Historicamente, processos baseados em bateladas de enchimento e retirada não são recentes. Já nas primeiras décadas do século XX, iniciou-se o desenvolvimento do tratamento secundário, com o intuito de aumentar a eficiência do tratamento de águas residuárias. Dessa forma, o uso dos processos biológicos de tratamento objetivando uma remoção mais completa do material orgânico tornou-se frequente. Segundo EPA (1993) e Irvine e Bush (1979), entre 1914 e 1920, muitos desses sistemas em batelada em escala real estavam em operação e foram abandonados por sua aparente complexidade com relação a equipamentos e operação. Em 1923, Arden e Lockett, desenvolveram o processo em batelada atualmente conhecido com os métodos de enchimento, aeração, sedimentação e esvaziamento no mesmo tanque (IRVINE e BUSCH, 1979; GORONSZY, 1979).

No entanto, somente a partir de 1950, o interesse por essa tecnologia foi retomado, com o desenvolvimento de novos equipamentos e tecnologias: melhoria nos sistemas de aeração e controle de automação. Tal fato permitiu que os reatores competissem com sucesso com os sistemas convencionais de lodos ativados.

Foi na década de 80, que essa tecnologia tornou-se difundida e aplicada ao tratamento de efluentes domésticos e industriais, quando Arora *et al.* (1985) estudando estratégias diferentes de operação (duração das fases e/ou reações) com o intuito de atingir diferentes objetivos quanto à qualidade do efluente, mostraram resultados efetivos.

No Brasil, o processo de batelada foi aplicado pela primeira vez pela SABESP para o tratamento de esgoto sanitário da cidade de Paranapuã (1989), obtendo-se excelentes resultados (KAMIYAMA e TSUTIYA, 1992). Atualmente, em Santa Catarina, já se tem registro de alguns trabalhos utilizando estações com RBS em condomínios residenciais (LUZ, 1998; THANS, 2008).

O processo RBS se caracteriza como uma variante dos sistemas de lodos ativados uma vez que dispõe dos mesmos processos de purificação que estes, porém a principal diferença em relação ao sistema contínuo diz respeito ao fluxo do afluente (PICKBRENNER, 2002).

O princípio do processo consiste na incorporação de todas as unidades, processo e operação, normalmente associados ao tratamento convencional de lodos ativados, em um único tanque de mistura

completa. Dessa forma, esses processos e operações passam a ser simplesmente sequenciais no tempo e as etapas do tratamento são determinadas através do estabelecimento de ciclos com durações definidas em uma mesma unidade, sendo que a massa biológica permanece no reator durante todos os ciclos, eliminando dessa forma a necessidade de decantadores separados e das elevatórias de recirculação do lodo (ARTHAN e ORHON, 2005).

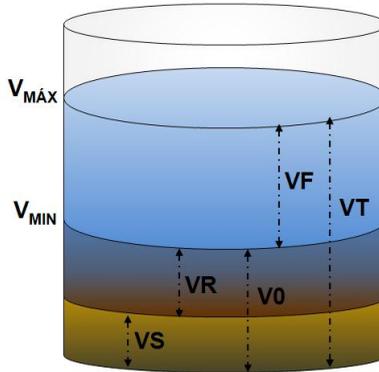
De maneira geral, pode-se descrever este sistema como um processo biológico onde a água residuária afluente e as bactérias fixadas na forma de flocos de lodo ativado são intimamente misturados, agitados e aerados. Essa biomassa em suspensão se utiliza do substrato afluente como fonte de energia para seu crescimento e multiplicação, realizando um fenômeno chamado de biofloculação que proporcionará, posteriormente, a separação entre os flocos biológicos e o meio líquido (esgoto tratado) na fase de decantação. Nesta etapa, variáveis físico-químicas como pH, alcalinidade e compostos tóxicos devem ser rigorosamente monitorados, pois afetam a capacidade de biofloculação e, conseqüentemente, a qualidade do efluente clarificado (JORDÃO e PESSÔA, 2005).

O lodo remanescente permanece no reator biológico (respeitando-se o tempo de residência celular e a concentração da biomassa). Esta maior permanência dos sólidos no reator proporciona uma boa eficiência do processo, pois uma maior concentração de biomassa provoca um aumento da velocidade de oxidação da matéria orgânica presente no esgoto, e permite o crescimento de organismos específicos. Uma parte pequena do lodo gerado deve ainda ser periodicamente retirada para que o sistema permaneça em equilíbrio. Normalmente, calcula-se a mesma quantidade de biomassa que é aumentada por reprodução como a porção que caracteriza o “lodo em excesso”. A carga de lodo retirada por dia em relação ao volume total de lodo no reator biológico determina a “idade do lodo” (VAN HAADEL e MARAIS, 1999; MOHAMMADI *et al.*, 2011).

Este processo RBS utiliza como meio reacional, um tanque de volume variável (Figura 1) onde o volume total (VT) é composto de duas frações independentes. A primeira, chamada de volume estacionário (V0), compreende o volume de lodo sedimentado (VS) diluído no volume de efluente tratado não retirado (remanescente) (VR)

e a segunda fração, compreende o volume que é retirado ou enchido a cada ciclo (VF).

Figura 1 – Representação esquemática de um tanque RBS. Fonte: adaptado de Artan e Orhon (2005).



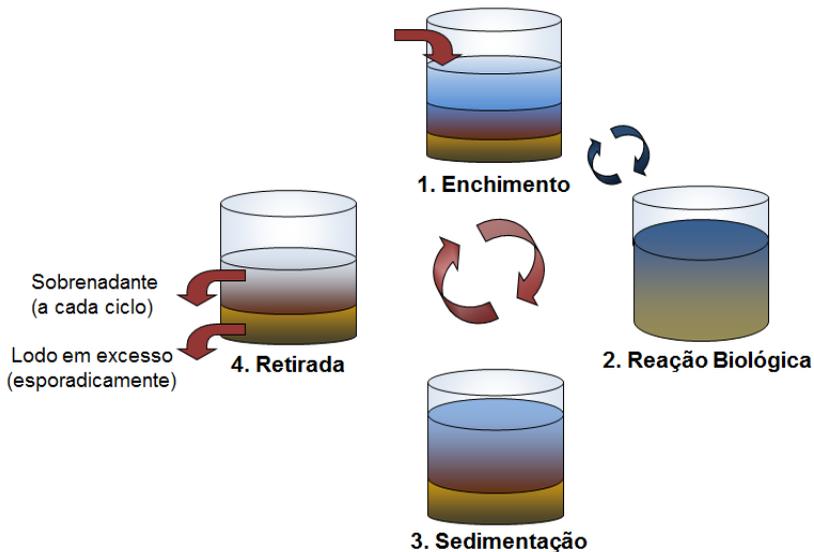
Durante o processo de batelada, ocorre uma operação cíclica, sequencial, com alimentação intermitente, durante períodos seleccionados ou durante toda a duração do ciclo. Um ciclo padrão no RBS possui cinco fases operacionais conforme apresentado na Figura 2. As principais características das etapas do ciclo de operação de um RBS são, resumidamente, descritas a seguir:

Fase de Enchimento (Fe): Ocorre a entrada do esgoto bruto ou decantado no reator para a atividade microbiana. Esta fase pode ser controlada por válvulas de bóias até um volume pré-determinado ou por temporizadores para sistemas com mais de um reator. Os aeradores podem permanecer desligados ou podem estar ligados em determinado período de tempo. Vários esquemas de enchimento têm sido registrados na literatura (estático, com mistura ou aeração), mas, de maneira geral, é recomendado o enchimento estático, ou seja, sem mistura entre o lodo e o afluente em estações que objetivam a remoção de nutriente. Isto significa que, para a maior parte do enchimento, nem aeração e nem mistura mecânica devem ser fornecidas. No enchimento estático acompanhado de enchimento com mistura,

- 1) os microrganismos ficam expostos a grandes quantidades de substrato, promovendo, ao mesmo tempo, condições tanto anóxicas quanto anaeróbias. A mistura pode ser iniciada quando o reator estiver com 80% de seu volume, de forma a produzir uma alta taxa de reação biológica que permite às bactérias flocculantes superar as espécies filamentosas, prevenindo o “intumescimento” (*bulking*) do lodo (JORDÃO e PESSÔA, 2005). O sistema permite a adoção de diferentes tipos de enchimento ao longo do ciclo operacional.

Figura 2 – Representação esquemática das fases de operação de um reator RBS.

Fonte: adaptado de Von Sperling (2001).



- 2) **Fase de Reação (F_A):** O objetivo da fase de reação é completar as reações iniciadas durante o enchimento. Inicia-se com o acionamento dos aeradores, que permanecem ligados e ocorre a mistura da massa líquida contida no reator. As bactérias degradam a matéria orgânica efetuando a remoção carbonácea e a nitrificação. Mantém-se uma concentração de sólidos suspensos totais (SST) típica do processo, da ordem de 2000 a

4000 mg L⁻¹ (JORDÃO e PESSÔA, 2005). O objetivo principal nesta etapa do tratamento é a nitrificação seguida da desnitrificação, quando a aeração deve ser interrompida durante a reação, para que prevaleçam condições anóxicas durante um período de tempo (cerca de uma hora). Em seguida se recomenda um pequeno período de aeração, para que se consiga eliminar as bolhas de gás nitrogênio e, com isso, ajudar a sedimentação.

- 3) **Fase de Decantação ou Sedimentação (F_s):** Nesta fase ocorre separação sólido-líquido através do desligamento dos aeradores. Os sólidos em suspensão sedimentam no interior do tanque, até uma determinada altura da manta de lodo; a concentração de sólidos totais (ST) neste lodo do fundo pode alcançar cerca de 6000 a 8000 mg L⁻¹; o nível superior do esgoto permanece estável (JORDÃO e PESSÔA, 2005).
- 4) **Fase de Retirada (F_{Re}):** Durante essa fase, o efluente tratado é drenado do sistema.
- 5) **Fase de Repouso (F_R):** Geralmente é utilizada apenas em aplicações com vários tanques. Pode também ser usada para aumentar a duração de uma ou mais fases de um ciclo (ARTAN e ORHON, 2005). O excesso de lodo poderá ser retirado nesta fase ou na fase de aeração. O lodo remanescente permanecerá em repouso no reator até o início do próximo ciclo de operação.

A duração usual de cada ciclo pode ser alterada em função das variações da vazão afluente, das necessidades particulares do tratamento, e das características do esgoto e da biomassa no sistema. Um tempo de ciclo típico é de 6 a 8 horas, sendo que esta duração varia em função da carga afluente, dos objetivos operacionais, do tratamento, da composição da água residuária e da biomassa presente no sistema (VON SPERLING *et al.*, 2001). De acordo com Metcalf e Eddy (2003), a porcentagem do tempo de cada período, em relação à duração total do ciclo, pode ser assim distribuída: enchimento = 25%, reação = 35%, sedimentação = 20%, decantação = 15% e repouso = 5%.

Quanto às principais vantagens de utilização dos RBS estão: 1) economia de energia (pois permitem o controle sobre os períodos dos ciclos e da aeração, em função da entrada de cargas orgânicas); 2) forma simplificada de construção; 3) utilização de equipamentos mais

simplificados (permitindo a instalação de unidades menores, dispensando assim elevatórias e emissários de grande porte); 4) grande versatilidade (permitindo trabalhar em diversas condições de operação); 5) funcionamento relativamente simplificado; 6) não necessitam de sistemas de sedimentação adicionais (já que se utiliza apenas um período de tempo no ciclo em que o reator atua como sedimentador) e 7) estabilidade contra as cargas flutuantes (uma vez que é capaz de controlar a duração do tempo morto ajustando assim o tempo de operação do ciclo) (WILDERER, 2001; TSUNEDA *et al.* 2005).

Como desvantagem apontada aos sistemas RBS, cita-se o descarte do efluente tratado de forma pontual a cada término do ciclo, o que pode gerar choque de carga para o corpo receptor, caso haja algum problema no tratamento (COSTA *et al.*, 2008). Como forma de amenizar estes possíveis danos, Lin e Jing (2001), sugerem a utilização de RBS com enchimento escalonado (do inglês *step-feed*), que proporciona um efluente de melhor qualidade, com maior remoção do nitrogênio total (NT) comparativamente ao processo com um único enchimento, uma vez que o esgoto afluente apresenta compostos orgânicos carbonáceos e alcalinidade, garantindo a ocorrência dos processos de desnitrificação e nitrificação.

Devido à crescente preocupação quanto ao lançamento de nutrientes nos corpos d'água receptores, os reatores de batelada têm sido constantemente adaptados, de forma a garantir, concomitantemente à remoção de matéria orgânica, a ocorrência de nitrificação, desnitrificação e remoção biológica de fósforo (HOFFMANN *et al.*, 2004; DEBICK e MANAV, 2010).

2.4 MICRORGANISMOS PRESENTES EM RBS

Os processos biológicos de tratamento, tais como os RBSs, funcionam de modo a proporcionar um ambiente favorável ao crescimento maximizado das células microbianas, responsáveis pela reciclagem da matéria orgânica e dos nutrientes (HOFFMANN e PLATZER, 2000).

Nos RBS, as células microbianas se apresentam agregadas a outras partículas presentes no esgoto formando flocos biológicos. Embora os microrganismos sejam os agentes da remoção de DBO, o

floco desempenha um papel fundamental no processo de remoção da matéria orgânica apresentando-se como uma estrutura heterogênea, contendo material orgânico adsorvido, material inerte dos esgotos, material microbiano produzido para a matriz, células vivas e mortas (VON SPERLING, 2005).

A estruturação dos flocos biológicos é conseguida, através da adesão físico-química das células com outras partículas e pela formação de colônias pela divisão celular. No entanto, apenas 5 a 20% da matéria orgânica presentes nos flocos são derivadas das células bacterianas. O restante é composto principalmente pelas substâncias poliméricas extracelulares (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*). As EPS mantêm, em uma matriz orgânica, vários microrganismos em conjunto com fibras, partículas orgânicas e inorgânicas, bem como diversos colóides. Desta forma, cria-se um ambiente que possibilita grande proximidade dos microrganismos ao material orgânico que será aprisionado e digerido por enzimas extracelulares (LASPIDOU e RITTMANN, 2002).

A comunidade microbiana que compõe os flocos biológicos nos lodos ativados é bastante diversa, formada por organismos decompositores (principalmente bactérias), que são os responsáveis por metabolizar a matéria orgânica dissolvida no esgoto e também pela estruturação dos flocos, e por organismos consumidores (protozoários e pequenos metazoários), que se alimentam das bactérias e outros organismos. Estes organismos consumidores apresentam ainda importante papel na remoção de *E. coli* e na redução de DBO₅. Além desses organismos, rotíferos, nematódeas, anelídeos e larvas de insetos podem também estar presentes nesta comunidade microbiológica (JURETSCHKO *et al.*, 2002).

Esta composição diversa da microfauna do lodo possibilita uma avaliação do sistema quanto à eficiência na remoção de DBO₅ e sólidos suspensos (SS); nas condições de sedimentação do lodo; nível de aeração empregado; toxicidade; além de indicar a ocorrência de sobrecargas orgânicas e nitrificação (HOFFMANN e PLATZER, 2000).

A concentração da biomassa no reator pode ser estimada pela análise de sólidos suspensos, sendo a qualidade do efluente tratado no sistema de lodos ativados, diretamente relacionada com a etapa de decantação, devido ao equilíbrio entre os organismos filamentosos e os

formadores de floco (que possibilita uma boa decantabilidade e adensabilidade do lodo) (VON SPERLING, 2002).

2.5 EXIGÊNCIAS NUTRITIVAS DAS BACTÉRIAS

As bactérias constituem o grupo de microrganismos mais numeroso e, sem dúvida, o mais importante na estabilização da matéria orgânica. Esta atividade microbiana principia-se no próprio sistema de coleta e interceptação de esgotos e atinge seu máximo na estação de tratamento (ETE), onde o objetivo principal consiste na oxidação ou fermentação da matéria carbonácea. As reações que ocorrem durante o processo são determinadas pelo metabolismo das espécies presentes no sistema, de forma que a compreensão da microbiologia do tratamento é de fundamental importância para a sua perfeita operação e controle (BENTO, 2005).

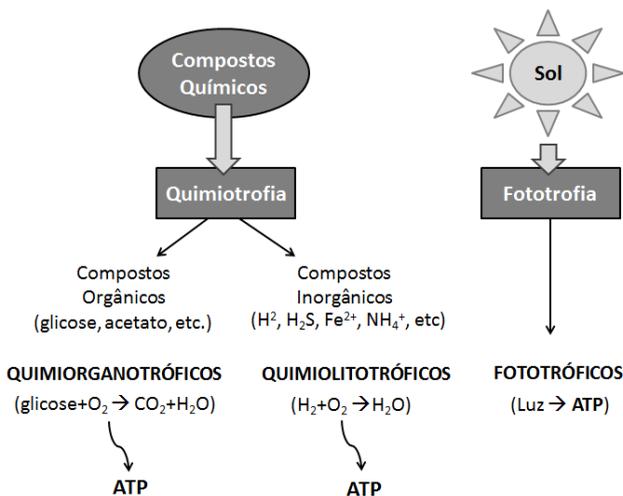
Partindo-se da premissa de que estes organismos requerem uma fonte de energia para o seu crescimento, podemos distinguir três maneiras para sua obtenção: a partir de compostos químicos orgânicos, de compostos químicos inorgânicos ou da energia luminosa (Figura 3). Muitos dos milhares de compostos químicos distintos presentes na Terra, podem ser utilizados por um ou outro microrganismo na obtenção de energia. Todos os compostos orgânicos naturais e a maioria dos sintéticos podem ser degradados por um ou mais microrganismos (MADIGAN *et al.*, 2003).

Em sistemas compostos por RBS, são encontradas principalmente, bactérias que dependem da oxidação de compostos químicos (remoção de elétrons) para a obtenção de energia (na forma de adenosina trifosfato - ATP), chamadas de **quimiotróficas**. Este grupo passa a ser dividido de acordo com o composto químico oxidado em: 1) **quimiorganotróficas** - as que oxidam compostos orgânicos e 2) **quimiolitotróficas** - as que oxidam compostos inorgânicos para obtenção de energia. O espectro de diferentes compostos químicos inorgânicos utilizados é bastante amplo, mas, via de regra, um determinado procaríoto é especializado na utilização de um grupo relacionado de compostos inorgânicos (MADIGAN *et al.*, 2003).

Além da fonte de energia, todos os organismos requerem também uma fonte de carbono para o crescimento. As bactérias que utilizam

apenas o dióxido de carbono como fonte nutritiva são chamadas de **autotróficas**; as bactérias que exigem fonte de carbono orgânico são chamadas de **heterotróficas** (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

Figura 3 – Esquema representativo das opções metabólicas para a obtenção de energia pelos microrganismos. Todos os processos apresentados, levam à síntese de ATP. Fonte: adaptado de Madingan *et al.* (2003).



A biomassa bacteriana necessita ainda de uma série de elementos-traço (ou micronutrientes) além desses nutrientes (ou macronutrientes), porém em quantidades bem menores, para a realização dos processos metabólicos. Dentre os micronutrientes, citam-se: manganês, cobre, zinco, molibdênio, selênio, magnésio, cobalto, cálcio, sódio, potássio e ferro, devendo tanto os macro quanto os micro nutrientes serem obtidos no meio, ou seja, no esgoto afluente ao sistema de tratamento, sendo que a eventual falta de algum deles, pode limitar seu crescimento (ECKENFELDER e MUSTERMAN, 1995).

De maneira geral, os microrganismos são compostos de aproximadamente 80% água e 20% matéria seca. Desta matéria seca, cerca de 90% é orgânica e 10% é inorgânica, sendo que a fração orgânica das células bacterianas pode ser representada pelas seguintes fórmulas (VON SPERLING, 2002):

- $C_5H_7O_2N \rightarrow$ Quando não inclui o fósforo;
- $C_{50}H_{87}O_{23}N_{22}P \rightarrow$ Quando inclui o fósforo

Observa-se desta forma, que em estações de tratamento de esgoto, além da degradação da matéria carbonácea, dependendo das condições ambientais do meio, pode ocorrer a incorporação e/ou remoção de outros substratos, também dependentes da atividade bacteriana. Dentre esses processos, citam-se os fenômenos conjuntos de nitrificação e desnitrificação, para a remoção do nitrogênio, e o processo de remoção biológica de fósforo. Dada sua importância no processo biológico de tratamento de esgotos, a seguir será apresentada uma revisão mais detalhada sobre o metabolismo do carbono, nitrogênio, fósforo e os principais microrganismos representantes.

2.6 PRINCIPAIS TRANSFORMAÇÕES BIOQUÍMICAS NO TRATAMENTO DE ESGOTOS

No tratamento biológico de esgoto há uma interação de diversos mecanismos que ocorrem simultaneamente ou sequencialmente. Em RBS inúmeros processos bioquímicos envolvidos na ciclagem da matéria orgânica e dos nutrientes acontecem, de acordo com a operação do sistema, substratos característicos e requisitos ambientais disponíveis. Tais fatores resultam ainda na predominância de uma ou mais reações bioquímicas, dentre as quais a oxidação da matéria orgânica e, quando em condições favoráveis (pH, idade de lodo, temperatura), ocorre também a oxidação da matéria nitrogenada e fósforo.

2.6.1 Processos de Remoção da Matéria Orgânica

O problema de poluição das águas resulta, principalmente, do consumo do oxigênio dissolvido (OD) pelos microrganismos durante seus processos metabólicos de utilização e degradação da matéria orgânica. Este consumo de OD decorre da respiração dos microrganismos decompositores, representados em sua maioria por bactérias heterotróficas aeróbias e facultativas, as quais, na presença de

oxigênio, convertem a matéria orgânica a compostos simples e estáveis, como a água e o gás carbônico (VON SPERLING, 2005).

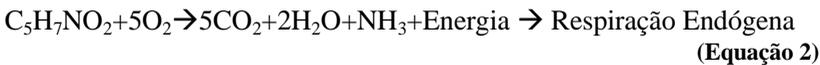
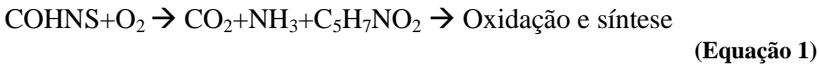
As substâncias orgânicas presentes nas águas residuárias são constituídos principalmente por compostos de proteína (40 a 60%), carboidratos (20 a 50%), gordura e óleos (10%) e, em menor quantidade, uréia, surfactantes, fenóis e pesticidas. Esta matéria orgânica pode ser dividida quanto a sua degradabilidade em duas componentes principais: uma fração não biodegradável ou inerte, e outra biodegradável. A fração inerte, solúvel (dissolvida) e/ou suspensa (particulada), pode estar presente no afluente ou ser produzida através do metabolismo dos microrganismos do próprio sistema. A fração biodegradável pode ser de rápida ou de lenta degradação, estando presente na forma solúvel e na forma suspensa.

A DQO de rápida degradação biológica inclui compostos orgânicos constituídos por moléculas orgânicas pequenas e simples, rapidamente absorvidas e metabolizadas no interior das células, como monossacarídeos, ácidos graxos de baixo peso molecular, aminoácidos e alcoóis. A fração lentamente biodegradável inclui, além das moléculas orgânicas complexas (carboidratos, proteínas e lipídios), moléculas em solução e sob a forma coloidal, que têm em comum o fato de não serem absorvidas pelas células sem antes sofrerem hidrólise extracelular. Este mecanismo constitui o passo limitante da utilização da matéria orgânica lentamente biodegradável pelas células (VON SPERLING, 2002). No caso de existir uma mistura de substratos rapidamente e lentamente biodegradáveis, a biomassa do sistema se desenvolve de acordo com o fornecimento e a concentração de substâncias rapidamente biodegradáveis (LOPES, 2000).

O processo de remoção da matéria carbonácea em sistemas de tratamento de esgotos ocorre, de maneira geral, quando, na entrada do afluente (substrato) a matéria orgânica presente é fornecida aos microrganismos, que iniciam sua metabolização, isto é, incorporam parte do material biodegradável, enquanto o restante é oxidado a compostos mais simples. Esta metabolização da matéria orgânica coloidal e solúvel presente no esgoto depende dos processos (conjuntos ou não) de adsorção, absorção, síntese e respiração, cuja ocorrência está relacionada com a facilidade de degradação da partícula orgânica. Assim, nos primeiros estágios do tratamento, as impurezas orgânicas são adsorvidas na superfície dos flocos biológicos, onde serão

posteriormente hidrolisadas por enzimas extracelulares que transformam-nas em simples moléculas que podem atravessar perfeitamente a parede celular bacteriana. Quanto aos compostos orgânicos complexos, estes, depois de hidrolisados, aderem-se à fração lipídica da membrana citoplasmática, onde são então absorvidas para dentro da célula bacteriana (BITTON, 2005).

Esta conversão da matéria orgânica em compostos mais simples, consiste de um processo exotérmico que libera produtos inertes como o gás carbônico (CO₂) e a água (H₂O). Durante a assimilação inicial, mais da metade da matéria orgânica é oxidada (Equação 1) e o restante fica como reserva a ser utilizada na respiração endógena (Equação 2) (METCALF e EDDY, 2003).



Estas reações biológicas aeróbias ocorrem (desprezando-se os mecanismos intermediários), através de uma sequência simplificada onde predominam duas etapas: 1) *síntese* (onde a matéria orgânica é utilizada para atividades metabólicas de crescimento e obtenção de energia. Ocorre demanda de oxigênio e aumento da população de microrganismos) e 2) *respiração endógena* (ocorre quando a matéria orgânica presente na água residuária encontra-se escassa, e devido à baixa disponibilidade de substrato, a fonte de alimento passa a ser o próprio protoplasma celular) (ANDREOTTOLA *et al.*, 2005).

O oxigênio total consumido em ambas as fases é definido, como a Demanda Última (DBOu), podendo ser expresso também por meio da Demanda Química de Oxigênio (DQO). Como condições ideais para que ocorra a remoção ótima da matéria carbonácea tem-se a faixa de pH entre 6,0 e 9,0 e a concentração de OD em torno de 2,0 mg L⁻¹, sendo que acima de 0,5 mg L⁻¹ já se tem ocorrência de reações de degradação (METCALF e EDDY, 2003).

2.6.2 Processos de Remoção do Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para a composição das proteínas e dos ácidos nucleicos das células microbianas, animais e vegetais, apresentando-se como um nutriente limitante em ambientes aquáticos, uma vez que dependendo de sua concentração, pode limitar ou favorecer o crescimento de alguns organismos.

O N é um dos principais nutrientes que o tratamento de águas residuárias tenta remover, objetivando evitar a poluição das águas superficiais. Este pode estar presente em uma variedade de formas de compostos, dependendo do estado de oxidação assumido. Para o controle ambiental os compostos de maior interesse são: amônia (NH_3), íon amônio (NH_4^+), nitrogênio gasoso (N_2), íon nitrito (NO_2^-) e o íon nitrato (NO_3^-). A forma molecular, não ionizada, coexiste em equilíbrio com o íon amônia-N e a concentração de cada uma depende do pH e temperatura do sistema sendo que em níveis de pH abaixo da neutralidade há apenas uma pequena concentração de amônia-N (NH_3) (VON SPERLING, 2002).

A remoção biológica do N é, tradicionalmente, realizada pela combinação dos processos de nitrificação autotrófica (onde o NH_4^+ é convertido a NO_3^-) e desnitrificação heterotrófica (onde o NO_3^- produzido é reduzido a N_2) (KHIN e ANNACHHATRE, 2004). Outro método estudado é o da nitrificação heterotrófica ou desnitrificação aeróbia simultânea (ou Nitrificação e Desnitrificação Simultâneas - NDS) o qual sugere que bactérias desnitrificantes aeróbias são também heterótrofas nitrificantes, capazes dessa forma de converter amônia-N diretamente em nitrogênio gasoso. E finalmente, um processo recentemente descoberto, denominado processo ANAMMOX (do inglês *Anaerobic Ammonium Oxidation*).

2.6.2.1 Nitrificação

A nitrificação consiste no principal processo aeróbio no ciclo do N, onde ocorre a oxidação biológica da amônia a nitrato, com a formação de nitrito como intermediário principal. Neste processo intervêm dois grupos distintos de bactérias autótrofas: as que realizam a oxidação de amônia a nitrito, e as bactérias que oxidam nitrito a nitrato.

A nitrificação geralmente compreende dois mecanismos: 1) **Nitrificação** onde ocorre a oxidação da amônia para nitrito, realizado pelas bactérias oxidadoras de amônia ou BOA (do inglês *ammonia-oxidizing bacteria* - AOB) em dois passos enzimáticos envolvendo amônia monooxigenase (*amo*) e hidroxilamina oxireductase (*hao*) e 2) **Nitratação** onde ocorre a oxidação de nitrito a nitrato, sendo realizado pelas bactérias oxidadoras de nitrito ou BON (do inglês *nitrite-oxidizing bacteria* - NOB) utilizando nitrito oxireductase (DIONISI *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2008).

Como a maioria do nitrogênio no efluente de uma ETE está presente tanto na forma de uréia (que é hidrolisada a amônia) ou amônio/amônia, as bactérias nitrificantes desempenham um papel central na remoção de nitrogênio em ETE. No entanto, estas, apresentam um crescimento extremamente lento e são pouco tolerantes às tentativas de cultivo. Apresentam alta sensibilidade para distúrbios como mudanças de pH e temperatura, sendo frequente a desagregação do processo de nitrificação em ETE de águas residuárias e, especialmente industriais (WAGNER *et al.*, 2002).

De acordo com diversos estudos, o microrganismo modelo de oxidação da amônia é *Nitrosomonas europaea*. Entretanto, análises utilizando técnicas moleculares como a hibridação *in situ* fluorescente (FISH, do inglês *fluorescent in situ hybridization*) em nitrificantes presentes em lodos ativados e em biofilmes mostraram que outras oxidantes de amônia são também recorrentes e de grande relevância.

Juretschko (1998), estudando um sistema de nitrificação/desnitrificação industrial, encontrou como grupo dominante *Nitrosococcus mobilis*, uma bactéria oxidante de amônia, anteriormente considerada apenas ocorrente em águas salobras. Estudos posteriores detectaram ainda, *N. mobilis* em quantidade significativa em um biofilme de um reator em bateladas sequenciais nitrificante (DAIMS *et al.*, 2001).

Em contraste, Wagner *et al.* (2002) destacam os trabalhos de Schramm (1999), o qual estudando um reator de leiteo fluidizado encontrou o gênero *Nitrospira* dominante *in situ*. Além disso, *Nitrospira* foi também relatada em estudos baseados em PCR como importante gênero oxidante de amônia em ETE. Atualmente, aceita-se que os grupos nitrosomonados (incluindo *Nitrosococcus mobilis*) e não

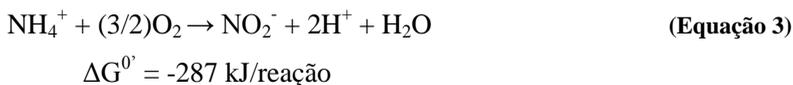
nitrosospiras (abrangendo os gêneros *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*) são importantes para a oxidação da amônia em ETE.

Numericamente, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosococcus mobilis* e *Nitrosomonas marina* são os grupos mais freqüentemente detectados. Observa-se desta forma, que as ETE abrigam uma grande diversidade de Betaproteobacteria oxidadoras de amônio (DAIMS *et al.*, 2001).

Quanto aos microrganismos capazes de oxidar nitrito a nitrato, tradicionalmente, *Nitrobacter* foi considerada como a mais importante oxidante em ETE. No entanto, em alguns trabalhos utilizando sondas 16S rRNA alvo específicas de FISH em várias ETE nitrificantes, este grupo não foi detectado (WAGNER *et al.*, 1996). Ao invés, detectou-se curiosamente a ocorrência de bactérias nitrificantes do gênero *Nitrospira* em diversas ETE nitrificantes (JURETSCHKO *et al.*, 1998; OKABE *et al.*, 1999) tendo sua importância para a oxidação do nitrito em ETE confirmada por estudos de enriquecimento de reator.

Pesquisas combinando FISH com microautoradiografia demonstraram que o gênero *Nitrospira* em lodos ativados além de ser capaz de fixar o CO₂, pode também crescer mixotroficamente utilizando piruvato (DAIMS *et al.*, 2001). Postula-se ainda que a predominância de bactérias *Nitrospira* sobre *Nitrobacter* na maioria das ETE é um reflexo de suas diferentes estratégias de sobrevivência. Enquanto *Nitrospira* são, *K*-estrategistas, ou seja, podem possuir um baixo μ_{max} , estando bem adaptadas às baixas concentrações de nitrito e oxigênio, *Nitrobacter* é postulada como *r*-estrategista com crescimento relativamente rápido, com baixa afinidade a nitrito e oxigênio (SCHRAMM *et al.*, 1999; SEVIOUR, 2010).

Quanto à nitrificação, esta se apresenta como um processo aeróbio e autotrófico, onde os microrganismos, nitrificantes ou nitrificantes, atuam utilizando-se de carbono inorgânico como fonte de carbono celular e do O₂ como aceptor de elétrons. Neste processo, o íon amônio é oxidado a nitrito e este posteriormente a nitrato segundo as Equações 3 e 4, respectivamente (BITTON, 2005).



$$\Delta G^0 = -76 \text{ kJ/reação}$$

A energia liberada nestas reações é usada pelos microrganismos nitrificantes na síntese de compostos orgânicos a partir de fontes de carbono inorgânico (dióxido de carbono, bicarbonato ou carbonatos), de forma que a nitrificação está associada ao crescimento das bactérias nitrificantes.

A cinética da nitrificação é influenciada por diversos fatores ambientais, como relação C/N, temperatura, pH, alcalinidade, concentração de OD. Além disso, a nitrificação é inibida por altas taxas de matéria orgânica que propicia o crescimento de microrganismos heterotróficos que competem com os autotróficos nitrificantes pelo oxigênio e nutrientes. Desta forma, nos sistemas biológicos de remoção de nitrogênio, a nitrificação vai ser o processo de controle, uma vez que os microrganismos nitrificantes representam aproximadamente 2% da massa microbiana, têm exigências estritas de crescimento e são sensíveis às condições ambientais (JEYANAYAGAM *et al.*, 2005).

Segundo Arora *et al.* (1985), diferentes estratégias de operação podem ser determinadas para atingir os mais variados objetivos quanto à qualidade do efluente final desejado em RBS. Assim, a nitrificação pode ser obtida por meio de um aumento no tempo de duração da fase de reação ou da fase de enchimento, mantendo-se um tempo de retenção de sólidos (TRS) suficientemente longo (5 a 10 dias) para assegurar o crescimento de organismos nitrificantes, em reator com concentração de OD em torno de $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.

No que diz respeito a temperatura e pH, observa-se a ocorrência de nitrificação em uma faixa de 5 a 50°C, sendo a temperatura ótima na faixa de 25 a 30°C e pH entre 6,5 e 8,0. O desempenho da nitrificação diminui drasticamente com a queda do pH. Valores altos de pH também inibem o processo, pois alta concentração de amônia livre é tóxica para *Nitrosomonas* (BITTON, 2005).

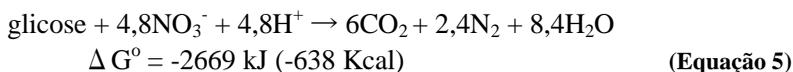
2.6.2.2 Desnitrificação

A desnitrificação ou redução dissimilatória do nitrato é o processo que tem como reação a conversão da forma oxidada de N (ión nitrato, NO_3^-) a óxidos gasosos (óxido nitroso - N_2O e óxido nítrico - NO) os quais podem ser reduzidos para N gasoso (N_2) e este liberado

para a atmosfera. Neste processo, o nitrato atua como acceptor final de elétrons e, o mecanismo enzimático ocorre em condições anaeróbias ou com baixas tensões de oxigênio. Portanto, a desnitrificação requer um ambiente com baixo nível de OD disponível, de tal forma que os microrganismos passem a utilizar o oxigênio do NO_3^- e do NO_2^- para respiração, ao invés do oxigênio do ar (SEVIOUR e NIELSEN, 2010; MADIGAN *et al.*, 2004).

De acordo com USEPA (2010), a desnitrificação pode ser realizada por bactérias heterotróficas (que oxidam os substratos orgânicos), por bactérias nitrificantes heterotróficas, e também por bactérias autotróficas. Entretanto, este processo ocorre principalmente pela atuação de bactérias heterotróficas anaeróbias facultativas, que na falta de oxigênio livre (O_2), modificam o seu sistema enzimático e utilizam o oxigênio presente no nitrato ou no nitrito como acceptor final de elétrons durante a oxidação da matéria orgânica (NIELSEN e HANSEN, 2009).

Neste processo, nitratos são reduzidos a nitritos pela enzima nitrato-redutase, utilizando elétrons do citocromo b. Nitritos são sequencialmente reduzidos aos gases N_2O e N_2 , sendo que a bioquímica destas reações não está bem esclarecida. No entanto, sabe-se que o composto NO apresenta-se como intermediário na reação, sendo formado a partir da atividade da enzima citocromo-oxidase, que transfere elétrons do citocromo c ao nitrito. Quando comparado com a respiração aeróbia, a cadeia transportadora de elétrons apresenta-se mais curta, resultando em uma menor quantidade de energia. Portanto, o crescimento através da respiração anóxica, onde nitratos e nitritos (ou sulfatos, no caso da atividade das bactérias sulfatoredutoras) são os aceptores finais de elétrons, apresenta-se menos eficiente que o crescimento através da respiração aeróbia. Um resumo da reação de desnitrificação é apresentado na Equação 5 (GIANOTTI, 1994).



Ao contrário da nitrificação, uma grande variedade de microrganismos são capazes de realizar a desnitrificação. Os membros dos gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Paracoccus* e *Hyphomicrobium* foram isoladas, como parte da flora

microbiana desnitrificantes de ETE (WAGNER *et al.*, 2002). Somam-se a elas os gêneros: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum*, *Gluconobacter*, *Xanthomonas*, *Azospirillum*, *Chromobacterium*, *Vibrio*, dentre outros (METCALF e EDDY, 2003).

A desnitrificação, quando comparada com a nitrificação, apresenta-se com maior robustez, sendo menos afetado pelas variações ambientais. Tal fato ocorre porque as bactérias desnitrificantes são microrganismos heterótrofos e, portanto mais resistentes que as bactérias autotróficas. Dentre as condições ambientais mais favoráveis para a desnitrificação estão: pH próximo a 8,0, temperatura em torno de 35°C, ausência de oxigênio (o qual inibe completamente o processo), presença de nitratos ou nitritos e fontes de matéria carbonácea de rápida degradação (no mínimo 2,9g de DBO₅ para cada grama de N-NO₃⁻ reduzido (RITTMANN e MC CARTY, 2001). Nessas condições, a velocidade específica de crescimento atinge valores da ordem de 3 a 6 dias. Quando em pH inferiores a 7 são produzidos óxidos de nitrogênio (altamente tóxicos para o processo).

Em RBS, segundo Arora *et al.* (1985), durante a etapa de enchimento, pode ocorrer alguma remoção das formas oxidadas de nitrogênio (principalmente nitrito), remanescentes do ciclo anterior quando o enchimento é feito com aeradores desligados. Este fato faz com que aconteça uma pré-desnitrificação na presença do carbono orgânico do esgoto afluente. Após a etapa de reação aeróbia, segue-se a etapa anóxica, onde ocorre a etapa de desnitrificação normalmente. Além disso, a fase de desnitrificação em RBS pode ser estendida, através do aumento da etapa de sedimentação e descarte, desde que a concentração de OD seja igual a zero.

Durante a desnitrificação há também a produção de alcalinidade. O ácido carbônico (H₂CO₃) é convertido a bicarbonato (HCO₃⁻) como resultado da conversão do nitrato a nitrogênio gasoso. Esta produção de alcalinidade é interessante para a concepção de sistemas que acoplam nitrificação e desnitrificação, possibilitando um equilíbrio natural do pH no processo.

2.6.2.3 Nitrificação e Desnitrificação Simultânea (NDS)

As reações de nitrificação e desnitrificação simultâneas ou NDS (do inglês *Simultaneous Nitrification Denitrification* - SND) vêm sendo estudadas já há algumas décadas. O princípio deste processo consiste na manutenção de baixas concentrações de OD no meio líquido, possibilitando a existência simultânea de regiões aeróbias e anóxicas no floco do lodo ativado para que ambos os processos (nitrificação e desnitrificação) ocorram no reator, sob as mesmas condições de operação (JU *et al.* 2007).

Pelo fato da oxidação de nitrogênio amoniacal compreender uma etapa consideravelmente lenta, o processo NDS requer um substrato lentamente degradável possibilitando que o potencial redutor esteja disponível para desnitrificação através do processo de oxidação de nitrogênio amoniacal, ao invés de ser rapidamente oxidado a CO₂, durante os períodos anteriores de aeração (CASTRO *et al.*, 2003).

Dentre as condições necessárias para a ocorrência de reações simultâneas de nitrificação e desnitrificação, citam-se segundo Ju *et al.* (2007): 1) **presença de zonas anóxicas/aeróbias microscópicas no interior do floco**, possibilitando durante a difusão de OD no floco, um consumo gradual pelos organismos, criando um gradiente de concentração de OD, onde no interior do floco acontecem reações anóxicas de desnitrificação e na camada externa ocorrem reações de nitrificação devido à maior presença de oxigênio; 2) **presença de zonas anóxicas/aeróbias macroscópicas no interior dos reatores**, comumente são formadas zonas com diferentes concentrações de oxigênio devido à falhas na homogeneização do licor misto; 3) **natureza biológica** com presença de bactérias desnitrificantes aeróbias e nitrificantes heterotróficas e 4) **maior versatilidade fisiológicas de desnitrificantes** estudos relatam a descoberta de bactérias como *Thiosfera Pantotroph*a que nitrifica e desnitrifica, simultaneamente, sob condições aeróbias.

Dentre os principais fatores que interferem no desenvolvimento de NDS, cita-se: concentração de OD, suprimento de carbono e tamanho do floco. Quanto à concentração de OD no líquido, não representa a real concentração de OD no interior dos agregados microbianos (flocos, grânulos ou biofilmes) devido à limitação da difusão de oxigênio. Segundo USEPA (2010), isto ocorre pois quando a concentração de OD

no líquido é suficientemente baixa, o OD difundido é removido antes de penetrar toda a profundidade do floco.

A adição de fonte de matéria orgânica prontamente biodegradável resulta em aumento da velocidade de desnitrificação. Quando a concentração de OD mantém-se entre $0,5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, a velocidade de nitrificação se iguala à velocidade de desnitrificação. Pelo fato da NDS resultar de uma limitação da difusão de oxigênio nos flocos (gerando assim, condições anóxicas no centro dos flocos), a NDS é influenciada também com o tamanho do floco (POCHANA e KELLER, 1999).

Como consequências desse processo Hoffmann *et al.* (2007) observaram uma tendência no reator em apresentar pH neutro durante o processo NDS, não necessitando de adição de fonte externa de ácido/base. Holman e Wareham (2005) em estudos sobre a concentração ideal de OD demonstrou que concentrações maiores que $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ inibem a desnitrificação aeróbia, estando o valor ideal em $0,5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Com a cultura de bactérias NDS estabelecida no reator, as desnitrificantes aeróbias podem continuar a reduzir nitrogênio aerobiamente por tempo limitado, desde que as concentrações de OD não excedam $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Considerando-se que pode ocorrer desnitrificação aeróbia, alguns autores realizaram experimentos com NDS, que podem ser executadas em reator aeróbio em batelada sequencial.

Por fim, este processo apresenta também como benefícios a economia do espaço empregado nos sistemas de lodos ativados dimensionados para remoção de nutrientes bem como economia de energia. Segundo Bertanza (1997), a mesma eficiência de remoção de DQO e N pode ser obtida através de processos de NDS com redução de 20% do volume de reatores convencionais com pré desnitrificação e 50% de economia de energia.

Nas últimas décadas, um processo inovador de desnitrificação curta, descoberto acidentalmente em um biorreator para tratamento de esgoto na Holanda, batizado de ANAMMOX (do inglês, *anaerobic ammonium oxidation*) tem sido muito explorado na remoção de nitrogênio de efluentes (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998). Neste processo, ocorre, em uma primeira etapa, a redução do nitrito (NO_2^-) a hidroxilamina (NH_2OH). A hidroxilamina e o amônio (NH_4^+) são condensados a hidrazina (N_2H_4) e água, sendo a hidrazina posteriormente oxidada a duas moléculas de gás nitrogênio (N_2). Os

elétrons são usados para reduzir a próxima molécula de nitrito (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996).

Assim, a presença simultânea de nitrogênio nas formas amoniacal e de nitrito possibilita uma rota alternativa de desnitrificação, impedindo-se a completa nitrificação com a interrupção do processo na etapa de nitrificação. Em ambiente anaeróbico, a amônia-N serve de doador de elétrons. Este meio pode proporcionar redução de volume em reatores contínuos ou de tempo de ciclo em reatores em batelada (CASTRO, 2003).

Atualmente, sabe-se que este processo é realizado por bactérias autotróficas do Filo Planctomycetes (Ordem Planctomicetales) do Domínio Bactéria (STROUS *et al.*, 1999) sendo até o momento descritos cinco gêneros Candidatus e nove espécies de ANAMMOX, sendo elas: Candidatus *Brocadia anammoxidans* (STROUS *et al.*, 1999), Candidatus *Brocadia fulgida* (KARTAL *et al.*, 2004), Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis* (PENTON *et al.*, 2006) Candidatus *Anammoxoglobus propionicus* (KARTAL *et al.*, 2007), Candidatus *Scalindua brodae*, Candidatus *Scalindua wagneri*, Candidatus *Scalindua sorokinii* (SCHMID *et al.*, 2003), Candidatus *Jettenia asiatica* (QUAN *et al.*, 2008) e Candidatus *Scalindua arabica* (WOEBKEN *et al.*, 2008).

Dentre as vantagens do processo ANAMMOX sobre a tradicional combinação de nitrificação e desnitrificação para tratamento de efluentes tem-se a menor demanda de oxigênio e nenhum requerimento de fonte externa de carbono orgânico, uma vez que o processo é autotrófico. Desta forma, o processo é indicado para efluentes com elevadas concentrações de amônio e com capacidade para substituir completamente o estágio de desnitrificação, economizando metade dos custos de aeração na etapa de nitrificação (FUJII *et al.*, 2002). Além disso, de acordo com Jetten *et al.* (2005), o sistema ANAMMOX pode reduzir em até 90% o custo operacional quando comparado à sistemas de nitrificação/desnitrificação convencionais.

Como desvantagens a este processo tem-se a baixa velocidade de crescimento das bactérias ANAMMOX, o que prolongaria o início do processo (EGLI *et al.*, 2001). Por outro lado, esta mesma característica seria responsável pela pequena produção de lodo, uma vez que o tempo estimado para a duplicação bacteriana é de 11 dias (JETTEN *et al.*, 2001).

2.7 PROCESSOS DE REMOÇÃO BIOLÓGICA DO FÓSFORO

O fósforo (P) assim como o N, é indispensável para todas as células, por ser um importante componente de estruturas celulares como ácidos nucleicos, ATP, e fosfolipídeos constituintes das membranas celulares (MADIGAN *et al.*, 2004). No entanto quando lançados continuamente nos corpos hídricos oligotróficos, estes nutrientes, atingem concentrações que excedem os níveis crescimento-limitante para os microrganismos fotossintéticos, acarretando processos de eutrofização.

A eutrofização é um problema global que desencadeia o excessivo crescimento de algas cianobactérias e eucarióticas, como consequência da quebra da homeostase no ambiente aquático, devido ao lançamento de esgotos com elevada concentração de nutrientes, principalmente P.

O P é encontrado no ambiente sob as formas orgânicas e minerais, ocorrendo nas águas naturais e residuárias quase unicamente na forma de fosfato. Estes fosfatos subdividem em: ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- e H_3PO_4), poli-fosfatos ou frações de fosfato orgânico (VON SPERLING, 2005).

Em sistemas de tratamento de esgoto, sua origem provém de material fecal, de fontes comerciais e industrial, detergentes sintéticos e outros produtos de limpeza (SEVIOUR *et al.*, 2003). Segundo Metcalf & Eddy (2003), a concentração de P em águas residuárias domésticas está entre 4 e 16 mg L⁻¹. Dessa forma, nos últimos 30 anos, têm-se observado um crescente interesse no desenvolvimento de metodologias que possam realizar de maneira mais eficiente, a remoção deste nutriente nas ETE (ARVIN, 1985; MEGANCK e FAUP, 1988).

Dentre os processos de remoção de P, há os realizados via processo físico-químico (precipitação e adsorção) ou via processo biológico (assimilação de fósforo por microrganismos presentes nos esgotos e acumulação de polifosfatos por microrganismos (McMAHON *et al.*, 2010).

A remoção via processos biológicos (também chamada biodesfosfatação), foco desse estudo, depende da captação de P por um grupo de bactérias denominado “organismos acumuladores de fosfato” ou OAP (do inglês *polyphosphate-accumulating organisms* – PAO). Estes armazenam o fosfato na forma de polifosfato intracelular,

absorvendo o fosfato dissolvido no meio líquido. Assim, na etapa posterior de descarte do lodo, P é removido juntamente com os organismos da unidade de tratamento (OEHMEN *et al.*, 2007).

OAP em sistemas de tratamento em escala real são principalmente representados pelas Betaproteobacterias da família *Rhodocyclaceae*, Candidatus *Accumulibacter phosphatis* (ou apenas *Accumulibacter*) bem como espécies relatadas que consistem de membros com ou sem habilidade para desnitrificação (NIELSEN *et al.*, 2009).

Para que a remoção biológica de P ocorra de forma satisfatória é necessário que sejam criadas condições ambientais que favoreçam o crescimento dos OAPs. Seviour *et al.* (2003) sugerem que as seguintes condições operacionais devem ser seguidas visando sucesso na remoção de P em sistemas de tratamento:

1. Efluente inicial contendo carbono facilmente degradável e fontes de energia;
2. Concentração de nitrato limitada, uma vez que bactérias desnitrificantes são capazes de respirar anaerobicamente, diminuindo o suprimento de substratos orgânicos e com isso, sua disponibilidade aos OAP;
3. Presença de uma fase estritamente anaeróbia;
4. Alternância de condições anaeróbias, seguidas de aeróbias na linha de tratamento.

Quanto ao processo biológico, este pode ser descrito da seguinte forma: sob condições anaeróbias, o carbono orgânico é removido do esgoto e armazenado intracelularmente. Simultaneamente, o glicogênio e o polifosfato intracelular são consumidos (hidrolisados), levando à liberação do fosfato para o meio líquido. Em condições aeróbias ou anóxicas, o fosfato é absorvido e re-armazenado sob a forma de polifosfato intracelular, enquanto que as reservas de glicogênio intracelulares são restauradas e a reserva de carbono orgânico é oxidado. Dessa forma, duas etapas podem ser claramente definidas no processo de remoção biológica de P:

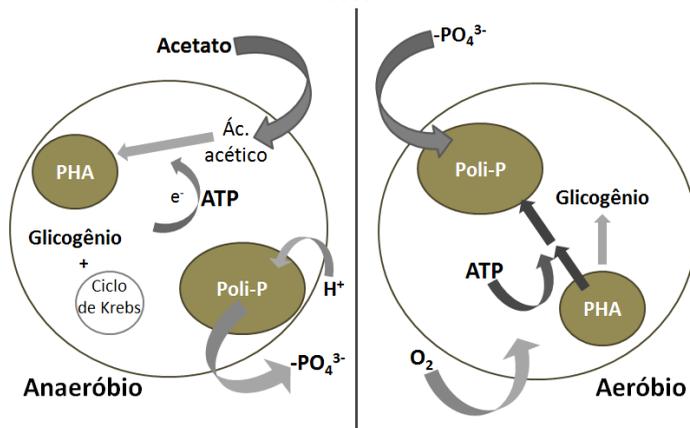
1^a - *Etapa anaeróbia*: sob condições anaeróbias, os OAP iniciam a acumulação de ácidos graxos voláteis (AGV), previamente disponibilizados no meio líquido pelo metabolismo de bactérias quimiorganotróficas fermentativas. Uma vez assimilado e armazenado

dentro da célula, estes ácidos graxos são rapidamente transformados em produtos metabólicos orgânicos, os quais podem apresentar diferentes constituições, de acordo com a composição química da fonte de carbono. Assim, quando cadeias curtas de ácidos graxos são assimiladas ocorre a estocagem de poli- β -hidroxialcanoato (PHA); quando assimilado o acetato ocorre a estocagem de poli- β -hidroxibutirato (PHB) ou quando assimilado propionato ocorre a estocagem de poli- β -hidroxivalerato (PHV) e poli- β -hidroxi-2-metilvalerato (PH2MV). Estes metabólitos armazenados são oxidados na etapa aeróbia posterior (McMAHON *et al.*, 2010).

Concomitantemente, os OAP passam a liberar em solução grandes quantidades de fosfato, através da quebra da molécula de ATP (adenosina trifosfato) produzindo energia para a célula, que poderá então ser utilizada durante a execução dos processos metabólicos anteriormente descritos. Desta forma, tem-se resumidamente ao longo da etapa anaeróbia o consumo de matéria orgânica facilmente biodegradável, por meio da assimilação dos AGV e a liberação de fosfato para o meio líquido, através da quebra da molécula de ATP (SEVIOUR *et al.*, 2003, VON SPERLING, 2005; ARTAN e ORHON, 2005).

2ª - *Etapa aeróbia*: sob condições aeróbias, os OAP passam a metabolizar o PHA e assim disponibilizar energia para que o processo de acúmulo do fosfato no interior de suas células seja executado. Dessa maneira, a molécula de ATP é reconstruída e a remoção do P dos esgotos é executada. Ao final do processo, a quantidade de fosfato liberado durante a fase anaeróbia é menor do que a quantidade absorvida durante a fase aeróbia. Em tal condição, uma quantidade em excesso de fósforo é absorvida pelos OAP, mecanismo esse conhecido na literatura como *Luxury uptake*. Naturalmente, essa quantidade em excesso refere-se ao P proveniente do esgoto afluente à unidade de tratamento. Dessa maneira, o P presente no esgoto é removido. A Figura 4 ilustra as transformações bioquímicas que ocorrem durante a etapa anaeróbia e aeróbia.

Figura 4 – Esquema representativo das transformações bioquímicas que ocorrem durante as etapas anaeróbia e aeróbia, em OAP. Fonte: adaptado de Seviour *et al.*, 2003.



Para a etapa anaeróbia em unidades de tratamento voltadas a remoção de P, o tempo adotado tem sido de 1 a 2 horas. O tempo de retenção deve ainda ser adequado, de forma a permitir que organismos fermentadores possam produzir AGV em quantidade suficiente a ser utilizada pelos OAP durante a etapa aeróbia. Para a etapa aeróbia, a taxa de absorção de P na zona aeróbia aumenta na medida em que aumenta o nível de produtos orgânicos. O tempo de retenção de 1 a 2 horas, também é adotado como suficiente para uma eficiente absorção de fosfato (COMEAU *et al.*, 1986; McMAHON *et al.*, 2010).

Atualmente, os microrganismos OAP são também distinguidos pela sua capacidade de realizar desnitrificação quando em meio anóxico. Desta forma, organismos capazes de utilizar o nitrito e/ou nitrato como aceptor de elétrons, são denominados OAP-desnitrificantes, ou OAPD. Em uma pesquisa recente, Carvalho *et al.* (2007) revelaram que dois diferentes tipos de organismos OAPDs podem ser encontrados, de acordo com sua afinidade por nitrato: OAPDs capazes de utilizar nitrato e nitrito como aceptor de elétrons (OPAD-nitrato) e OAPDs apenas capazes de utilizar o nitrito (OAPD-nitrito). Muitas pesquisas buscando melhor compreender o metabolismo dos organismos OAPD têm sido conduzidas, uma vez que a utilização de OPADs tem-se mostrado bastante interessante em termos de remoção biológica de

nutrientes, possibilitando a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo, com baixos custos com aeração no reator, além de estes organismos apresentarem menor taxa de crescimento quando comparada aos OAP, resultando em uma menor produção de lodo (MURNLEITNER *et al.*, 1997; GUIASOLA *et al.*, 2009; BASSIN *et al.*, 2010a).

Frequentemente, em escala real, observa-se a proliferação de uma população de bactérias, capazes de competir com os OAP, denominado “organismos acumuladores de glicogênio” ou OAG (do inglês *glycogen-accumulating organism* – GAO). A proliferação de OAG leva a uma diminuição na eficiência de remoção de fósforo, uma vez que esses microrganismos competem com OAP por substratos orgânicos durante a etapa anaeróbia (NIELSEN *et al.*, 2009).

O metabolismo de bactérias OAG pode ser descrito da seguinte forma: sob condições anaeróbias, ocorre a degradação do glicogênio estocado via glicólise para suprir a energia requerida para absorção de AGV de cadeia curta, e conseqüente síntese de PHAs. Sob condições aeróbias, OAG oxidam o PHA sintetizado anaerobicamente pra promover energia para o crescimento celular e reabastecimento de glicogênio. Assim, AOGs podem sobreviver e crescer em sistemas de tratamento sem, no entanto, contribuir com a remoção de fósforo (OEHMEN *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2009).

A mais abundante OAG identificada em sistemas de tratamento em escala real pertence ao gênero *Competibacter*, dentro das gamaproteobacterias, as quais são também conhecidas como grupo-GB. A mais comum dessas bactérias corresponde a *Candidatus Competibacter phosphatis* (ou apenas *Compatibacter*) (NIELSEN *et al.*, 2009).

Organismos AOG são frequentes e abundantes em sistemas de tratamento em escala real, no entanto, limitadas informações foram documentadas sobre sua distribuição e ecologia, bem como a interação e competição entre esses microrganismos e os OAP (LIU *et al.*, 1994; NIELSEN *et al.*, 2009).

2.8 RESPIROMETRIA DE LODOS ATIVADOS

Nos sistemas aeróbios de tratamento de águas residuárias, faz-se cada vez mais uso de métodos respirométricos que possibilitam a

determinação da biodegradabilidade dos afluentes e da atividade biológica do sistema (ANDREOTOLLA *et al.*, 2005). A respirometria, de acordo com Spanjers *et al.* (1998), caracteriza-se como uma importante técnica de medida e interpretação do consumo biológico de oxigênio, sob condições experimentais controladas.

O metabolismo ou utilização do material orgânico pelas bactérias nos sistemas de lodos ativados tem duas vertentes: (1) anabolismo, que é a conversão de matéria orgânica em massa bacteriana e (2) catabolismo, que é o consumo de oxigênio para oxidação de matéria orgânica e geração de energia, necessária ao anabolismo (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999). Os resultados do metabolismo são o crescimento do lodo ativo (microrganismos) e o consumo de OD.

Desta forma, o oxigênio apresenta-se como um elemento fundamental para manter a população bacteriana viva e com boa capacidade para metabolizar a matéria orgânica e oxidar compostos como a amônia. Desde o início do uso dos processos de lodos ativados (início do século XX), sabe-se que a determinação da velocidade na qual o lodo consome OD ou a Taxa de Consumo de Oxigênio (TCO) é um importante indicador das condições do processo, sobrevivência do lodo ativo e/ou sobre a atividade deste, logo após a interrupção da aeração (COSTA *et al.*, 2007).

A utilização de testes respirométricos em sistemas de tratamento de esgoto, caracteriza-se por sua considerável simplicidade, além de curta duração. O princípio do método baseia-se na determinação da TCO, o qual considera as variações na taxa de respiração do lodo em consequência do tipo de substrato e da velocidade de degradação de parte da biomassa, após a interrupção da aeração. Neste processo, a concentração de OD tenderá a diminuir devido ao consumo de oxigênio pelos microrganismos presentes na amostra. A representação gráfica da taxa de consumo de OD, ou taxa de respiração em função do tempo de medição ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), é denominada respirograma, e seu comportamento permite indicar como a biomassa responde à presença de alimento (FERREIRA *et al.*, 2002). Esta representação normalmente se aproxima de uma reta, sendo que a declividade da mesma dá a taxa de variação de OD.

De acordo com van Haandel e Catunda (1982), para determinar a velocidade de consumo de oxigênio é suficiente uma redução de 1 a 2

mg L⁻¹ da concentração de OD no efluente. Essa redução normalmente é obtida dentro de poucos minutos após a interrupção da aeração.

A respirometria vem sendo bastante empregada, seja para estimar o estado da atividade dos microrganismos (determinação da DQO afluente, determinação da biomassa ativa autotrófica e heterotrófica, monitoramento da atividade bacteriana, monitoramento da nitrificação, presença de substâncias tóxicas ou inibidoras), caracterização da matéria orgânica carbonácea, obtenção de dados para cálculos de balanço de massa ou ainda para a calibração de modelos cinéticos (MARSILI-LIBELLI e TABANI, 2002). Além disso, as medidas respirométricas, complementadas por análises físico-químicas padrão, podem identificar componentes dos esgotos, tais como a concentração de matéria orgânica rapidamente biodegradável, a concentração de matéria orgânica lentamente biodegradável, a concentração de nitrogênio amoniacal solúvel, dentre outros (FERREIRA *et al.*, 2002).

2.8.1 Determinação da Biomassa Ativa

No caso da determinação da biomassa ativa, a TCO é determinada considerando-se as variações na taxa de respiração do lodo em consequência do tipo de substrato adicionado. Segundo Andreottola *et al.* (2005), a absorção do OD se desenvolve em duas fases principais:

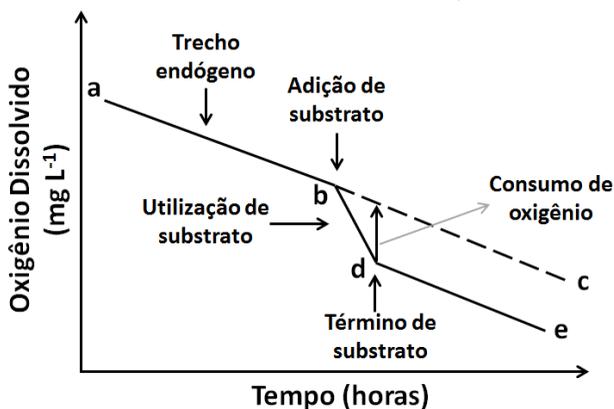
1) **respiração endógena do lodo:** representa o oxigênio necessário para a respiração do lodo, ou seja, a energia requerida para manter as funções das células. Neste caso, se realiza a fase endógena da taxa de absorção de oxigênio;

2) **degradação do substrato:** representa o consumo de oxigênio por parte dos microrganismos para a degradação dos substratos presentes no líquido. Neste caso, se realiza a fase exógena da taxa de absorção de oxigênio.

A atividade exógena é caracterizada pelas reações autotróficas, como a nitrificação, e pelos processos de eliminação da matéria orgânica realizados pelas bactérias heterotróficas. Em condições endógenas, a respiração do lodo utiliza o oxigênio de forma contínua, ocorrendo a uma velocidade aproximadamente constante. Na Figura 5 observa-se o efeito sobre a concentração de OD, após a adição ao lodo ativado de uma limitada quantidade de substrato (ANDREOTTOLA *et al.* 2005).

A proporção entre a $TCO_{máxima}$ (com substrato abundante) e a $TCO_{mínima}$ (sem substrato – respiração endógena) dá a informação sobre a capacidade metabólica, ou seja, a atividade do lodo (COSTA et al., 2007).

Figura 5 - Efeito sobre a concentração de oxigênio dissolvido, após a adição de substrato. 1) a-b-c = condições endógenas; 2) reta b-d = incremento na velocidade de absorção do oxigênio; ponto d = retorno às condições endógenas iniciais (Fonte ANDREOTTOLA et al., 2005).



2.9 ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA E UTILIZAÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A introdução de técnicas de biologia molecular aplicadas à ecologia microbiana alterou primordialmente a compreensão da diversidade microbiana, sem necessidade de cultivo, levando a descoberta de microrganismos únicos e previamente desconhecidos, em solo e água contaminada, mostrando uma grande e complexa oportunidade para estratégias de biorremediação (MALIK et al., 2008). Através destas técnicas, que se baseiam na especificidade das sequências dos ácidos nucleicos (DNA ou RNA), sua extração e posterior ampliação pela PCR, muitos filotipos e divisões filogenéticas têm sido reformuladas e descritas, mostrando-se como extremamente útil para avaliar as mudanças na estrutura da comunidade microbiana

(HUGENHOLTZ *et al.* 1998; LERAT *et al.*, 2005). A seguir, serão abordados alguns conceitos e as principais técnicas a serem utilizadas nesta pesquisa.

2.9.1 Estrutura do RNAr e Aplicação Taxonômica

Os ácidos nucléicos apresentam-se como moléculas de grande importância biológica, estando presentes em todos os seres vivos sob dois tipos: 1) ácido desoxirribonucléico ou DNA e 2) ácido ribonucléico ou RNA. Durante a síntese protéica, que ocorre no interior das células, a informação genética encontra-se armazenada em sequências nucleotídicas componentes das moléculas do DNA genômico.

O DNA constitui o depósito da informação genética que é copiada ou transcrita em moléculas de RNA mensageiro (RNAm), cujas sequências de nucleotídeos contém o código (sequência dos aminoácidos) posteriormente traduzido em proteínas. É por isso que a síntese protéica também é conhecida como tradução do RNA (ROBERTIS e HIB, 2006).

As estruturas no interior da célula onde se processa a tradução e síntese protéica, encontram-se combinadas com proteínas e outras moléculas de RNA (denominada RNA ribossomal ou RNAr) as quais constituem partículas densas, chamadas ribossomos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

Existe nas células dois tipos de ribossomos que se distinguem pelos seus coeficientes de sedimentação (determinados na ultracentrifugação) e expressos em unidades *Svedberg* (S). Ribossomos de células procariontes apresentam coeficiente de sedimentação de 70S e são menores que os ribossomos de células eucariontes, cujo coeficiente é de 80S. Ambos são formados por duas subunidades, com características funcionais e estruturais diferentes, assim como diferentes tamanhos (uma maior e outra menor), prendendo-se de modo irreversível no início da síntese da molécula protéica, separando-se quando a proteína está terminada. A subunidade maior das células procariontes possui dois tipos de RNA: um de 23S e outro de 5S, enquanto a subunidade menor apresenta apenas um tipo de RNA: 16S (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

Segundo Abreu (2004), devido à importância da tradução do RNAm em proteínas ou ribossomos, é provável que a forma com que esse mecanismo aconteça tenha surgido uma única vez na evolução, sem ter sofrido mais alterações. Atualmente o RNAr e os seus genes correspondentes (DNAr) são muito utilizados como marcadores evolutivos. Assim, grande parte das sequências de bases das unidades RNAr 5S, 16S e 23S podem ser consideradas conservadas, bem como os genes que as codificam.

De acordo com Junqueira e Carneiro (2005), devido ao seu tamanho conveniente, o RNAr 16S é o mais utilizado em estudos filogenético, uma vez que apresenta cerca de 1.500 bases de nucleotídeos, número este intermediário quando comparado com o 5S, que possui apenas 125 nucleotídeos (o que limita muito suas informações) e com o RNAr 23S, com 2.900 nucleotídeos (que é muito grande, tornando o estudo laborioso e mais difícil). O RNAr 16S é ainda um importante marcador filogenético por sua distribuição universal, sua conservação estrutural e funcional, a presença tanto nas regiões conservadas como nas regiões variáveis e hipervariáveis em diferentes porções da molécula, e por seu tamanho que fornece informação sobre a sequência de bases, suficiente para inferências filogenéticas (MUYZER, 1993).

Portanto, a sequência de gene RNAr 16S tem sido, atualmente, estudado e sequenciado em milhares de bactérias e arqueas, sendo utilizada no reconhecimento de células bacterianas, fornecendo a impressão ou “*imprinting*” molecular de um determinado organismo. Além disso, torna-se possível fazer uma análise dos genes RNAr 16S de bactérias conhecidas, e através delas, analisar comparativamente amostras de espécies desconhecidas, a fim de determinar sua posição taxonômica, bem como atribuir um nome biológico próprio e válido.

Através do estudo das sequências de nucleotídeos no RNAr 16S das células procariontes, novas árvores evolutivas foram construídas, dividindo os organismos em grupos diferentes das que aparecem nas classificações anteriores, baseados nos conceitos de que os organismos que se diversificaram mais cedo tiveram mais tempo para acumular modificações no seu RNAr e vice-versa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

Desta forma, a partir do conhecimento das sequências do RNAr 16S, os organismos, inicialmente divididos em Procariontes

(anucleados) e Eucariontes (nucleados), passaram a apresentar subdivisões, tais como os Procariontes, que foram divididos em dois grupos distintos denominados: Archaeobacteria e Eubacteria. Na medida em que novas observações e constatações foram sendo adquiridas, houve a reclassificação dos grupos em Eucarya (para os eucariontes) e Archea e Eubacteria (para os procariontes) (ROBERTIS e HIB, 2006).

Desta forma, metodologias baseadas na análise de fragmentos específicos de 16S ou de genes cromossomais que os codificam (RNAr 16S) têm importância fundamental para o estudo da diversidade de microrganismos em amostras ambientais (DIEZ *et al.*, 2001; RITTMANN, 2002).

2.9.2 A Técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* - FISH

A aplicação da biologia molecular, através da técnica de hibridização com fluorescência *in situ* (do inglês *fluorescent in situ hybridization* - FISH) tem sido atualmente, considerada umas das mais importantes, simples e rápidas, aplicadas na caracterização da comunidade microbiológica em amostras ambientais de águas e solos, sendo utilizada também para sistemas de tratamento biológico (PERNTHALER e PERNTHALER, 2007). Esta técnica, permite a visualização dos microrganismos no seu habitat natural sem a dependência de cultivo, ou de extração de DNA ou a amplificação de fragmentos de nucleotídeos, como a PCR (ZWIRGLMAIER, 2005).

Baseia-se na observação de que existem sequências conhecidas e tão específicas do RNAr de um organismo, que permite que se desenhe uma sequência complementar (sonda) à primeira (AMANN, 1995). Estas sondas de oligonucleotídeos são sequências sintetizadas *in vitro*, e normalmente possuem de 15 a 20 nucleotídeos, apresentando complementariedade com as regiões RNAr 16S do alvo, ou seja, das bactérias que se deseja detectar.

Ao penetrar nas células bacterianas fixadas, as sondas são capazes de formar ligações estáveis (híbridos) via pontes de hidrogênio entre nucleotídeos complementares, com a região RNAr 16S nos ribossomos. Quando não há complementariedade entre a sequência da sonda e a região RNAr 16S do ribossomo, não ocorre a hibridização e os oligonucleotídeos são lavados das células (AMANN *et al.*, 1992).

Com o intuito de detectar a ocorrência da hibridização, são acopladas à sonda, moléculas marcadoras fluorescentes na extremidade 5'. Os marcadores, também chamados fluorocromos, comumente empregados são: fluoresceína (FLUOS), cianinas (Cy3, Cy5 e Cy7), tetrametilrodamina (AMANN,1995). Destes, devido à sua considerável estabilidade, o Cy3 tornou-se o marcador mais utilizado, melhorando a detecção da hibridização em amostras ambientais (GLOCKNER *et al.*, 1996 apud BENTO, 2005). A visualização das células hibridizadas pode ser realizada através de microscopia de epifluorescência ou em microscopia confocal.

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 presentes, através da utilização de marcadores como o DAPI (4,6 diamidino – 2 – fenilindol) que se une ao DNA (possibilitando que sejam coradas todas as células), ou através da porcentagem do número de bactérias do domínio Bacteria, por exemplo, 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 e MENES, 2005).

Desta forma, a grande vantagem oferecida por esta técnica é que não há necessidade de purificação prévia ou mesmo de produção de cultura da amostra do lodo a ser investigada. Adicionalmente, a técnica de FISH é bastante efetiva na detecção de espécies bacterianas e análise de comunidades microbianas complexas, possibilitando ainda, que sejam microscopicamente visualizadas, as relações físicas entre as diferentes células (JETTEN *et al.*, 2005, RITTMANN, 2002).

2.9.3 A Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A técnica de PCR tem permitido grandes avanços em estudos de biologia molecular, particularmente para estudos de comunidades microbianas, por ser uma metodologia sensível, específica e de rápida execução (LEHNINGER *et al.*, 2002). Nos estudos de ecologia microbiana, os fragmentos amplificados por PCR geram dados para o

estudo da distribuição natural dos microrganismos no ambiente (LANTZ *et al.*, 1996; DIEZ *et al.*, 2001).

Esta técnica baseia-se na replicação *in vitro* do DNA a partir de um DNA molde, sendo formados milhões de cópias de um determinado gene, ou de parte dele, em poucas horas. Desta forma, evita-se o uso de endonucleases de restrição, não necessita recorrer a uma genoteca nem mesmo da construção de moléculas de DNA recombinante (ALBERTS, 2006).

A PCR ocorre primeiramente com a extração do material genético da célula sem danificá-lo. Normalmente utilizado o DNA, este, é desnaturado (por aquecimento), sendo agregados ao meio dois tipos de oligonucleotídeos (primers), complementares às sequências das extremidades do segmento de DNA que se deseja amplificar. Os primers (ou iniciadores) são sequências curtas de DNA (aproximadamente 20 nucleotídeos) que se unem (hibridizam-se) ao DNA molde e permitem a união de uma enzima DNA polimerase especial (Taq polimerase), resistente à elevadas temperaturas, para iniciar a polimerização. Juntamente com a enzima são agregados ao meio quantidades suficientes dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfato componentes do DNA (dNTPs) (ROBERTIS e HIB, 2006). Assim, selecionando-se apropriadamente os primers, amplifica-se um determinado gene.

Após formado o meio reacional, contendo DNA e a mistura pré-mix (dNTPs, primers, enzima Taq polimerase e solução tampão), a mistura é colocada no termociclador, aparelho este, que faz ciclos de temperaturas pré-estabelecidas em tempos exatos. Normalmente são realizados de 25 a 30 ciclos para cada reação sendo o total de células replicadas exponencial - $2^{n^{\circ} \text{ de ciclos}}$ (SAIKI *et al.*, 1988).

A análise dos produtos de PCR normalmente é feita por eletroforese em gel, baseada na mobilidade de fragmentos de DNA parcialmente desnaturados, com igual longitude, porém sequências diferentes, permitindo assim a obtenção de um padrão de bandas reflexo da presença ou não do organismo alvo na comunidade microbiana (ETCHEBEHERE e MENES, 2005). Para a visualização dos produtos formados (radiação UV) utiliza-se, comumente, revelação em brometo de etídeo.

2.9.4 A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *denaturing gradient gel electrophoresis*) apresenta-se como uma metodologia de análise direta de amostras ambientais, baseada no gene 16S rDNA para avaliação de populações microbianas complexas (MALIK *et al.*, 2008).

O DGGE identifica diferenças baseadas no comportamento desnaturante (mobilidade eletroforética) dos fragmentos da dupla fita de DNA de mesmo tamanho, parcialmente desnaturados porém, de diferentes sequências de pares de base (previamente amplificados por PCR) de uma mesma amostra ambiental (HEUER *et al.*, 1997). Estas diferenças na mobilidade eletroforética, são verificadas em um gel de poliacrilamida, o qual apresenta gradiente linear desnaturante crescente, composto por uréia e formamida, combinado com uma temperatura de corrida uniforme de 60°C (MUYZER *et al.*, 1993).

Segundo Dorigo *et al.* (2005) quando sequências contendo os mesmos pares de bases atingem a temperatura de desnaturação, a migração destes no gel é interrompida, ocupando-se assim mesma posição no gel. Desta forma, sequências de pares de bases diferentes irão cessar sua migração em posições diferentes do gel, devido à variação de gradiente de desnaturação, podendo assim ser separados e facilmente identificados. Esta desnaturação da dupla fita de DNA ocorre em temperaturas específicas, devido às variações das ligações do tipo pontes de hidrogênio existentes entre elas.

Para a realização da técnica, é necessário utilizar uma sequência de oligonucleotídeos rica em guanidina e citosina (grampo de GC) contendo de 30 a 40 bases, anexada ao final 5' do oligonucleotídeo iniciador (*forward*). Esse grampo GC, modifica o comportamento de desnaturação, fazendo com que praticamente 100% das sequências sejam detectadas (DORIGO *et al.*, 2005).

O perfil das bandas de DNA, formados no gel podem ser visualizado corando-se o gel com brometo de etídio, *Sybrgreen* (produzindo menos *background*, porém pode deixar de corar bandas de DNA menos dominantes) e nitrato de prata (mais sensível que os demais, permitindo a coloração das bandas menos intensas e também cora fita simples de DNA) (GRIFFITHS *et al.*, 2000).

O DGGE apresenta-se como uma técnica rápida, pouco onerosa e que possibilita a análise simultânea de amostras múltiplas, permitindo o estudo das mudanças da comunidade no tempo e/ou por mudanças ambientais. Permite também a identificação dos membros da comunidade a partir da recuperação e sequenciamento dos produtos amplificados (YU e MORRISON, 2004). O DGGE vem sendo, desta forma, utilizado como uma técnica de *fingerprinting* genético para analisar o perfil da diversidade de uma comunidade microbiana não só quantitativa, mas também qualitativamente.

Atualmente, o DGGE vem recebendo especial atenção por ter sido utilizado com sucesso na detecção de variações na comunidade microbiana, em diferentes habitats naturais, mesmo quando na presença de inibidores químicos e/ou variações fisiológicas, mostrando até mesmo bactérias cultiváveis e não cultiváveis presentes no ambiente (KOIZUMI *et al.*, 2002).

Onuki *et al.* (2000) em estudos com amostras de lodos ativados, observaram o método de PCR-DGGE como sendo capaz de caracterizar a estrutura da comunidade microbiana no nível de gênero e espécie bem como de monitorar as mudanças da comunidade ao longo do tempo, em águas residuárias.

No entanto, o DGGE apresenta algumas limitações como o fato de que somente fragmentos de até 500pb podem ser separados no gel de acrilamida, limitando a inferência filogenética no posterior sequenciamento (CHANG *et al.*, 2000). Além disso, o DGGE apresenta limites de detecção, isto é, apenas espécies predominantes presentes na comunidade podem ser detectadas e muitas bandas não podem ser discriminadas umas das outras ou ainda, pode ocorrer a formação de bandas inespecíficas só definidas após a clonagem destas (NIKOLAUSZ *et al.*, 2005). Desta forma, é importante observar que a técnica deve ser utilizada, porém trará resultados com maior confiabilidade, quando em conjunto com outros métodos moleculares, como FISH (WILDERER, 2001).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 UNIDADES DE TRATAMENTO

Os reatores utilizados nesta pesquisa são componentes de duas ETE, descentralizadas e em escala real, desenvolvidas pela empresa Rotária do Brasil, de forma a atender aos padrões de qualidade exigidos para o lançamento de efluentes em corpos d'água (Resolução CONAMA n° 430/2011 e o Decreto Municipal n° 077/96 de Florianópolis/SC).

3.1.1 Localização

As ETE utilizadas neste trabalho foram denominadas ETE1 e ETE2 e seus respectivos reatores denominados RBS1 e RBS2. A ETE1 localizava-se no bairro Itacorubi (27°35'5.79''S-48°29'51.31''O) e a ETE2 no bairro João Paulo (27°33'58''S-48°30'58''O), ambos (RBS1 e RBS2) no município de Florianópolis, Santa Catarina, região Sul do Brasil.

3.1.2 Descrição dos Sistemas de Tratamento

As estações de tratamento foram projetadas para atender diferentes demandas populacionais conforme apresentado na Tabela 1:

Tabela 1 – Dados adotados no projeto das ETE 1 e 2.

Descrição	RBS 1	RBS 2
Tipo Ocupação	Residencial (83%) Comercial (17%)	Residencial
População Total	440 hab	840 hab
Contribuição Per Capita	119 L hab ⁻¹ d ⁻¹ (Residencial=130 L hab ⁻¹ d ⁻¹ Comercial=50 L hab ⁻¹ d ⁻¹)	200 L hab ⁻¹ d ⁻¹
Vazão Média Diária de Esgoto	54,98 m ³ d ⁻¹	141,12 m ³ d ⁻¹

Estes sistemas compreendem tratamento preliminar e tratamento secundário. Nas Figuras 6 e 7, são apresentados os fluxogramas para as ETE 1 e 2, respectivamente.

Figura 6 – Fluxograma da Estação de Tratamento 1: (1) Rede Coletora; (2) Tratamento Preliminar; (3) Reator tipo RBS; (4) Tanque de Contato; (5) Corpo Receptor.

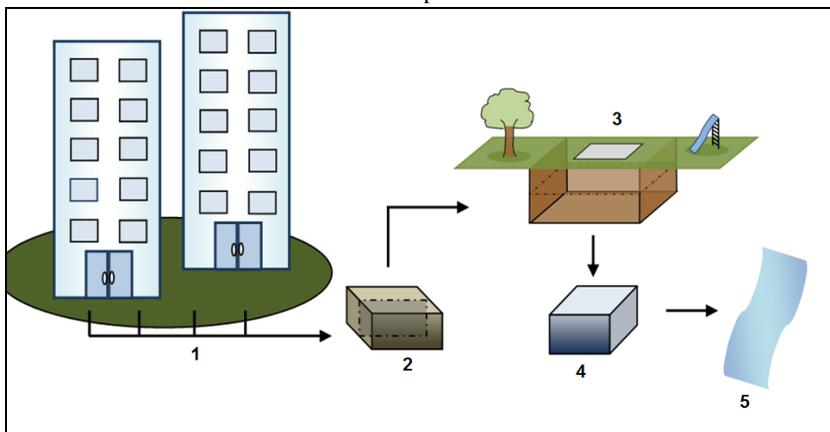
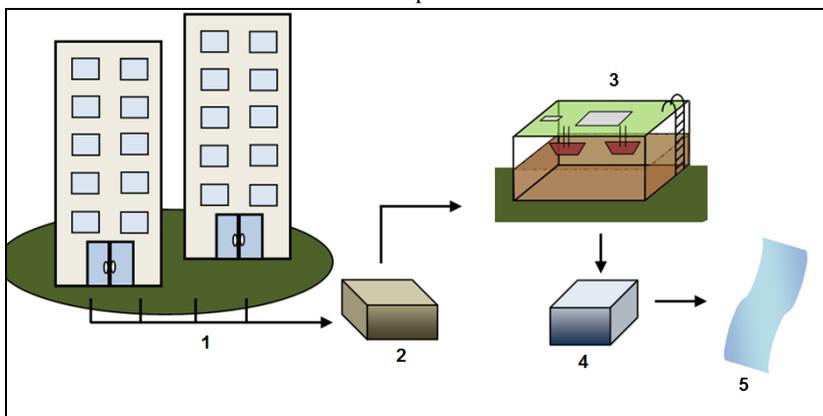


Figura 7 – Fluxograma da Estação de Tratamento 2: (1) Rede Coletora; (2) Tratamento Preliminar; (3) Reator tipo RBS; (4) Tanque de Contato; (5) Corpo Receptor.



As unidades de tratamento preliminar dos esgotos em ambas as estações são convencionais e constituídas de etapas de decantação e equalização em câmaras, denominado reator *Baffled* ou compartimentado. Para a ETE1, foi definido um total de 3 câmaras (sendo as duas primeiras para decantação e a terceira câmara para equalização) reunidas em um único tanque. Nas câmaras 1 e 2 ($12,6 \text{ m}^3$ e $5,5 \text{ m}^3$, respectivamente) ocorre a remoção de sólidos grosseiros, desarenação e retenção de gorduras do esgoto bruto. Na câmara 3 ($11,7 \text{ m}^3$) ocorre a equalização do afluente. O tempo de retenção do afluente nas três câmaras é de 10 horas, sendo 3 horas na câmara 1; 2,5 horas na câmara 2; e 4,5 horas na câmara 3.

Para a ETE2, foi definido um total de 4 câmaras (sendo as três primeiras para decantação e a quarta câmara para equalização) reunidas em um único tanque. Nas câmaras 1, 2 e 3 (25 m^3 , 10 m^3 e 10 m^3 , respectivamente) a remoção de sólidos grosseiros, desarenação e retenção de gorduras do esgoto bruto eram realizadas. Na câmara 4 ($26,7 \text{ m}^3$) ocorria a equalização do afluente. O tempo de retenção do afluente nas quatro câmaras foi de 6,5 horas, sendo 2 horas na câmara 1; 1 hora nas câmaras 2 e 3; e 2,5 horas na câmara 4.

O tratamento biológico, por sua vez, foi realizado por meio de reatores do tipo RBS. Na Tabela 2 são apresentadas as dimensões de cada reator e na Figura 8 são apresentados os reatores 1 e 2 componentes de cada sistema.

Tabela 2 – Características físicas dos Reatores 1 e 2.

Características	RBS1	RBS2
Altura (m)	3,8	4,2
Largura (m)	3,0	4,5
Comprimento (m)	7,0	11,15
Volume total (m^3)	76,7	210,7
Volume útil (m^3)	62	155

Figura 8 – Fotos ilustrativas dos reatores RBS1 e RBS2.



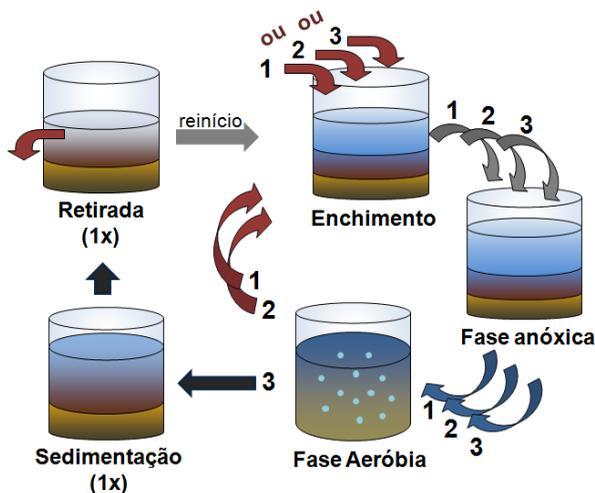
Os reatores foram operados em temperatura ambiente. Os esgotos sanitários provenientes dos respectivos condomínios residenciais entravam nos reatores, após serem bombeados da Câmara de Equalização (última das câmaras componentes do tratamento preliminar), de forma descontínua (enchimento escalonado) e durante as etapas sem aeração.

Conforme já esperado em sistemas que operam em escala real, uma grande variação nas características e no volume do afluente armazenado no tanque de equalização foi observada. Essas variações resultavam de diversas situações ao longo do dia ou de um período, tais como horários de pico e/ou sazonalidade que alteram o fluxo de afluente no tanque de equalização. Devido a essa variação na vazão de esgoto de entrada, os tempos dos ciclos dos reatores, também apresentaram grandes variações, de forma que quanto menor a vazão, maior o tempo total do ciclo (pois requeria mais tempo para o enchimento do reator). Assim, ciclos com diferentes tempos de duração (entre 3 e 14 horas) foram monitorados, semanalmente, durante o período estudado.

Nos reatores RBS, o ciclo iniciava na fase de enchimento (alimentação com esgoto bruto), de forma escalonada e com ausência de aeração. Após o enchimento ocorria um período sem aeração, que compreendia a primeira etapa anóxica. Esta fase apresentou duração mínima de 25 minutos e máxima da 1 hora. Após essa etapa, iniciava-se uma fase com aeração artificial, definindo a primeira etapa óxica. Essa fase apresentou duração mínima de 55 minutos. Após essa fase, ocorria uma interrupção na aeração, dando início a uma nova fase anóxica com

duração mínima de 45 minutos. Esses processos (anóxico/óxico) repetiam-se, alternadamente, ocorrendo 1, 2 ou 3 vezes, de acordo com o volume de esgoto armazenado no tanque de equalização, até que se tivesse atingido o volume de enchimento do reator (29 m^3 e $26,7 \text{ m}^3$ para RBS1 e RBS2, respectivamente). Após atingido o volume de enchimento, seguia-se com uma última etapa óxica. Terminada essa etapa, dava-se início à fase de sedimentação. Essa fase apresentou duração mínima de 30 minutos e visava a sedimentação do lodo, ficando uma fração de esgoto tratado e clarificado na parte superior do reator, o qual era posteriormente retirado. A retirada também apresentou duração mínima de 30 minutos. Após a retirada, ocorria um breve período de repouso sendo então acionado um novo enchimento, dando início a um novo ciclo. Um esquema representativo do funcionamento das diferentes etapas do ciclo é apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema representativo de funcionamento dos ciclos operacionais.



Todas as etapas componentes do ciclo no RBS, em ambas as estações de tratamento, eram totalmente automatizadas, sendo este processo regido por tempo e parâmetros de nível através de sensores internos acionados por boias. Este sistema dispensava a presença contínua de um operador na ETE.

A aeração no RBS1 foi realizada através de um turbo aerador submerso, enquanto que no RBS2 foi realizada por dois aeradores mecânicos de superfície. Para ambos os sistemas, aeradores da marca Weatherford com potência de 5 CV foram utilizados. Além disso, os aeradores possuíam diâmetro de influência superficial de 12 m e a transferência de oxigênio era de 1,40 Kg O₂/KWh, de acordo com protocolo do fabricante.

Quanto à disposição do lodo produzido durante o processo de tratamento nos reatores, a descarga do lodo em excesso (quando ultrapassava 5 g SST L⁻¹) era realizado por bombeamento e encaminhado para o tanque de estoque de lodo. Do volume total armazenado no tanque, o sobrenadante retornava ao pré-tratamento. No entanto, quando os tanques atingiam seu limite de armazenamento (30m³ para a ETE1 e 39m³ para a ETE2), era contratada uma empresa especializada no tratamento de lodos de esgotos sanitários, devidamente licenciada pela FATMA, Vigilância Sanitária do Município, para que fosse feito o esgotamento através de caminhão limpa-fossa.

O sistema de desinfecção do efluente era realizado através da cloração com hipoclorito a 12%, conforme os preceitos do Decreto Municipal de Florianópolis nº 077/96 que regulamenta a emissão de efluentes na rede pluvial do município. Assim, após a adição do agente químico o efluente era encaminhado para um tanque de contato onde permanecia por 34 e 40 minutos (nas ETE 1 e 2, respectivamente) visando atingir o requisito máximo de 500 NMP/100mL de *E. Coli* para então ser finalmente lançado na rede pluvial.

3.2 AMOSTRAGEM E MONITORAMENTO DOS REATORES

A amostragem e monitoramento das ETE 1 e 2, ocorreram em três períodos (Estágios) independentes, entre maio de 2010 e abril de 2012, conforme apresentado a seguir:

- Estágio I – Este período foi compreendido como uma fase de sondagem dos reatores e teve como objetivo verificar o funcionamento desses quanto ao tempo total de ciclo, assim como determinar o tempo médio para cada fase do tratamento. As avaliações foram realizadas semanalmente e estendeu-se de maio

a novembro de 2010, com amostragens realizadas no tanque de equalização (afluente bruto); no reator (licor misto) e efluente tratado. A partir dos dados obtidos neste estágio, elaborou-se um plano de ação e delineamento experimental para as etapas subsequentes.

- Estágio II – Este período visou acompanhar todas as variáveis a que se propõe esta pesquisa (estabilidade operacional, desempenho ao longo dos ciclos, composição microbiológica e eficiência das ETE). Ocorreu durante os meses de fevereiro a setembro de 2011 (para a ETE1) e de janeiro a junho de 2011 (para a ETE2), com amostragens realizadas semanalmente, em três pontos distintos do sistema: primeiro no tanque de equalização, onde o esgoto bruto era coletado 5 minutos antes do início de um novo ciclo; no interior do reator (licor misto); e ainda no reator, após quase completo o período de sedimentação (5 minutos antecedentes à fase de retirada), uma alíquota era retirada do decantado, para amostragem do efluente tratado. Quando realizado o acompanhamento do ciclo, o esgoto bruto era coletado 5 minutos antes de cada alimentação (1, 2 ou 3 vezes de acordo com o tempo do ciclo); no interior do reator, as amostras eram coletadas em cada início de fase do ciclo e na sequência a cada 30 minutos; e para amostragem do efluente tratado coletava-se uma alíquota do decantado 5 minutos antes da retirada do esgoto tratado (final do ciclo).
- Estágio III – Este período refere-se às amostragens realizadas apenas no RBS2, cujo sistema demonstrou melhor estabilidade operacional. Teve duração entre os meses de janeiro a abril de 2012 e foram mantidas as metodologias de amostragens descritas no Estágio II.

3.3 VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas foram realizadas em todos os pontos amostrados, segundo as metodologias recomendadas pelo *Standard Methods* (APHA, 2005). As variáveis analisadas e as metodologias empregadas estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis monitoradas e metodologias empregadas nas análises físico-químicas e biológicas.

Variáveis	Métodos
Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH	Sonda multi-parâmetros (YSI 6620)
Nitrito (N-NO_2^-), nitrato (N-NO_3^-), fosfato (P-PO_4^-) acetato; cloreto; sulfato	Cromatografia líquida de troca iônica (DIONEX DX 120) *SM-4110C
Nitrogênio Amoniacal (N-NH_4^+)	Método colorimétrico de Nessler
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	Digestão e destilação VELD *SM - 4500-N org B
Demanda Química de Oxigênio ($\text{DQO}_{\text{solúvel}}$ e $\text{DQO}_{\text{total}}$)	Método colorimétrico em refluxo fechado *SM-5220D
Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Sólidos Suspensos Fixos (SSF)	Método gravimétrico *SM-2540
Alcalinidade	Titulação potenciométrica com solução de H_2SO_4 0,02N *SM-2320B
Índice Volumétrico do Lodo (IVL)	Método gravimétrico *SM-2710D

*SM: Standard Methods (APHA, 2005).

3.4 IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LODO

A comunidade microbiológica presente nos flocos de lodo foi identificada, conforme descrito por Canler *et al.* (1999). As análises foram realizadas quinzenalmente, com as amostras frescas ou preservadas em refrigerador, procedendo-se até o nível mínimo de gênero, a fim de acompanhar as variações e composição da biomassa. A observação foi realizada utilizando-se um microscópio óptico (Olympus - BX41) e microscópio invertido (Bioval - XDS-1). Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada de acordo com Kunkel (2008). As lâminas foram examinadas com um microscópio Philips XL30 e recobertas com ouro utilizando-se Sputter Coater Bal-Tec SCD 005. As amostras foram analisadas e fotografadas a fim de identificar estruturas peculiares a cada organismo.

3.5 RESPIROMETRIA – DETERMINAÇÃO DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (TCO) E ANÁLISE DA BIOMASSA ATIVA

Análise da taxa de consumo de oxigênio (TCO) foi realizada de acordo com Ochoa *et al.* (2002) e utilizando a metodologia adaptada por Wolff *et al.* (2003), a fim de caracterizar a atividade da biomassa presente no reator e determinar a velocidade específica de respiração celular.

Amostras da biomassa em suspensão (licor listo) foram coletadas quinzenalmente de cada reator. Essas foram previamente aeradas (utilizando-se uma bomba de aquário para difusão do ar), por um período de 24 horas, garantindo a remoção completa de substrato que pudesse estar adsorvido ou absorvido ao lodo. Concomitantemente ao início do experimento foi determinada a concentração de sólidos suspensos voláteis e o pH medido, devendo ser ajustado entre 7 e 7,5.

O ensaio foi realizado utilizando-se um respirômetro, onde o consumo de oxigênio foi medido em três condições a fim de obter:

- 1) *respiração endógena* (TCO_{end});
- 2) consumo de oxigênio durante a *nitrificação* (TCO_A), sem fonte de carbono, após a adição de substrato específico para as bactérias autotróficas; e
- 3) *respiração exógena* (TCO_H) com adição de fonte de carbono (substrato para as bactérias heterotróficas), após a inibição da nitrificação com *Allylthiourea* (ATU) - que é um inibidor seletivo do grupo das *Nitrosomonas*.

O respirômetro era composto por uma unidade respirométrica fechada (erlenmeyer) com capacidade de 1 litro. A amostra foi mantida com aeração e agitação constantes, por meio de uma bomba de aquário e de um agitador magnético. A concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi controlada através de um oxímetro, sendo a cada 5 segundos gravados os valores de OD da amostra, para posterior cálculo da velocidade de consumo de oxigênio.

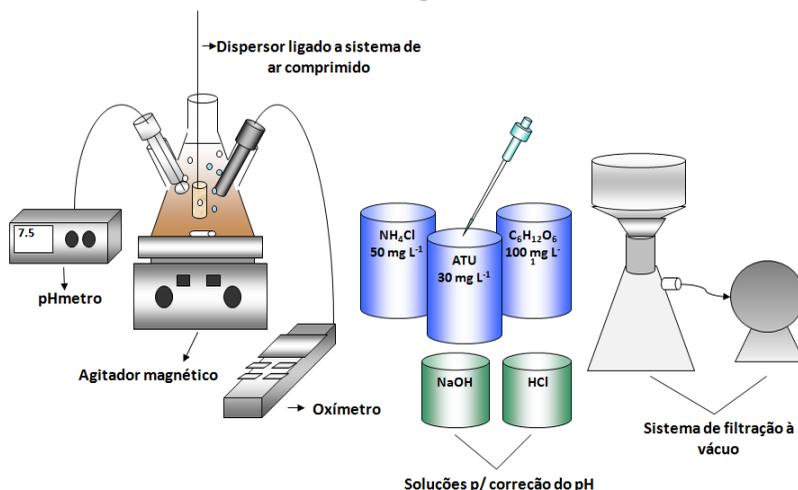
A aeração era mantida até o alcance da saturação, ou seja, até o momento em que variação significativa na concentração de OD tornava-se imperceptível. A aeração era então desligada, mantendo-se apenas uma leve agitação a fim de impedir a sedimentação da biomassa. Nesta etapa havia consumo de OD diminuindo sua concentração em aproximadamente 1 mg L^{-1} , momento em que a aeração era retomada.

Nessa etapa era obtida a velocidade de consumo de oxigênio no tempo durante a respiração endógena da biomassa.

A aeração era reiniciada até atingir a saturação. Quando saturada, um pulso de NH_4Cl (50 mg L^{-1}) era adicionado, desligada a aeração e mantida a agitação. Os valores de OD eram medidos até um decréscimo de sua concentração de 1 mg L^{-1} , sendo posteriormente retomada a aeração. Durante esta etapa a velocidade de consumo de oxigênio no tempo representa a nitrificação acrescida da respiração endógena.

Na última etapa, depois de alcançada a saturação, foram adicionados os pulsos de ATU (30 mg L^{-1}) e de glicose (100 mg L^{-1}), com posterior desligamento da aeração e mantida a agitação. Os valores de OD eram novamente medidos até que a concentração de oxigênio baixasse cerca de 1 mg L^{-1} , sendo então retomada a aeração. Durante esta etapa a velocidade de consumo de oxigênio no tempo medida representa a respiração exógena acrescida da respiração endógena. Na Figura 10 é apresentado um esquema do aparato experimental utilizado nos ensaios de respirometria.

Figura 10 – Representação esquemática do aparato experimental utilizado nos ensaios de respirometria.



A velocidade de consumo de oxigênio (TCO) foi então obtida através da inclinação da reta de melhor ajuste (regressão linear), formada pelos valores de OD (mg L^{-1}) plotados em função do tempo (h).

A velocidade específica de respiração celular (TCO_e) foi obtida a partir da Equação 6 (SCHMIDELL, 2001).

$$TCO_e = \frac{1}{X} \frac{dO_2}{dt} \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde:

TCO_e é a velocidade específica de respiração ($\text{g O}_2/\text{g cel.h}$);

X é a concentração celular (g cel/m^3) e

(dO_2/dt) é a velocidade de consumo de O_2 ($\text{g O}_2/\text{m}^3 \text{ h}$)

A biomassa ativa heterotrófica (X_H) e a biomassa ativa autotrófica (X_A) foram calculadas de acordo com o ASM1 – Activated Sludge Model n. 1 (HENZE *et al.*, 1987), através das Equações 7 e 8:

$$X_H = \frac{1}{\mu_{H \max}} \frac{Y_H}{1 - Y_H} (TCO)_{H \max} \quad \text{(Equação 7)}$$

$$X_A = \frac{1}{\mu_{A \max}} \frac{Y_A}{4,57 - Y_A} (TCO)_{A \max} \quad \text{(Equação 8)}$$

Onde:

X_H : concentração de biomassa heterotrófica (mg DQO L^{-1});

X_A : concentração de biomassa autotrófica (mg DQO L^{-1});

$\mu_{H \max}$: taxa de crescimento heterotrófico (d^{-1});

$\mu_{A \max}$: taxa de crescimento autotrófico (d^{-1});

Y_H : taxa de conversão heterotrófica ($\text{g DQO/g DQO}_{\text{oxidado}}$);

Y_A : taxa de conversão autotrófica ($\text{g DQO/g N}_{\text{oxidado}}$);

$(TCO)_{H \max}$: velocidade de consumo de oxigênio da biomassa heterotrófica ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$);

$(TCO)_{A \max}$: velocidade de consumo de oxigênio da biomassa autotrófica ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Os valores de TCO_{max} foram obtidos através do gráfico, sobre a curva de consumo de oxigênio (respirograma). Os parâmetros estequiométricos Y_{AH} e cinéticos μ_{max} utilizados para o cálculo são obtidos na literatura (HENZE *et al.*, 1987), sendo:

$$Y_{\text{H}}: 0,63 \text{ g DQO/g DQO}_{\text{oxidado}};$$

$$Y_{\text{A}}: 0,24 \text{ g DQO/g N}_{\text{oxidado}};$$

$$\mu_{\text{H}}: 6 \text{ d}^{-1};$$

$$\mu_{\text{A}}: 0,75 \text{ d}^{-1}.$$

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ORGANISMOS ACUMULADORES DE FÓSFORO

Amostras de lodo obtidas do RBS1 foram analisadas em testes de bancada, a fim de determinar as taxas de acumulação de fósforo por organismos acumuladores de fosfato (OAP) e organismos acumuladores de fosfato desnitrificantes (OAPD) presentes, através da exposição da biomassa a condições anaeróbias, anóxicas e aeróbias, separadamente, conforme descrito por Wachtmeister *et al.* (1997).

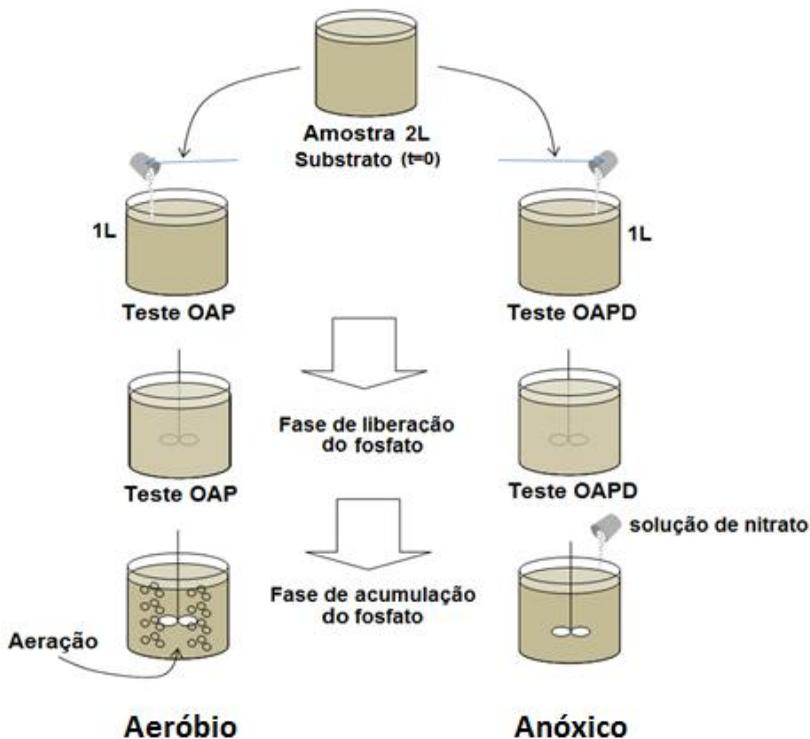
Para a realização do ensaio, 2L do licor misto contendo biomassa ativa provinda dos reatores foi coletado. Após coletado procedeu-se a lavagem do lodo (3x) com água, para eliminar a presença de compostos indesejáveis.

A amostra foi posteriormente dividida em dois erlenmeyers de 1 litro cada, onde uma solução de efluente sintético ($0,2 \text{ g L}^{-1}$ de CH_3COONa , $0,02 \text{ g L}^{-1}$ de NH_4Cl , 5 mL de tampão fosfato e 0,3 mL de solução e micronutrientes) foi acrescentada e então, incubado anaerobicamente por 3,5 horas. Durante esse período, foram coletadas amostras para a determinação de fosfato (P-PO_4^{3-}), nitrato (N-NO_3^-) e acetato (CH_3COO^-) solúveis. Terminada a etapa anaeróbia, iniciaram-se as etapas aeróbica e anóxica, onde um dos erlenmeyers foi exposto a condições aeróbicas (ligando-se a aeração) e o outro, foi exposto a condições anóxicas através da adição de uma solução de nitrato de sódio ($0,06 \text{ g L}^{-1}$). Os dois recipientes permaneceram sob as condições mencionadas durante 2,5 horas, coletando-se periodicamente amostras para a determinação da concentração de fosfato, nitrato e acetato. A

representação esquemática da metodologia utilizada é apresentada na Figura 11.

A taxa de captação de fósforo (PUR – do inglês *phosphorous uptake rate*) foi estimada através do coeficiente angular da linha que descreve o decaimento da concentração de fósforo pelo tempo. Desta forma, as taxas de absorção aeróbias e anóxicas de fósforo são obtidas e comparadas sob idênticas condições experimentais. Assumindo-se que os organismos OAPDs têm uma absorção de fósforo semelhante em condições anóxicas e aeróbias, utilizou-se então a relação absorção de P via O_2 /absorção de P via NO_3^- como um índice da fração para estimar a proporção de OAPD no total de OAP presentes no reator.

Figura 11 – Representação esquemática da sequência metodológica para determinação da atividade de OAP e OAPD.



3.7 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA UTILIZANDO TÉCNICAS MOLECULARES

As análises de biologia molecular foram realizadas com a colaboração do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM) do Departamento de Bioquímica, da UFSC. O período de monitoramento seguiu os previstos nos Estágios II e III em amostras coletadas dos RBS 1 e 2. Para sua realização, foram cumpridas as seguintes etapas: extração do DNA genômico, reação em cadeia da polimerase (PCR), separação dos segmentos amplificados no PCR usando eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), purificação do produto de PCR e posterior sequenciamento do produto de PCR. Concomitantemente, foram realizadas as análises de FISH, quinzenalmente, para estes mesmos estágios.

3.7.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído, utilizando-se o Kit de extração QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Para avaliar o produto resultante da extração do ácido nucléico foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e estocado a -20 °C para uso posterior.

3.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A execução da técnica de PCR foi realizada após a extração do material genômico, utilizando-se cerca de 10 ng do DNA extraído. Para a amplificação, foram utilizados iniciadores (*primers*) para domínio bacteriano a fim de obter fragmentos do 16S rRNA e específicos para DGGE (contendo 51-pb de grampo GC) sendo estes: 358F - 5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG 3' e 517R - 5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3'. A reação de amplificação seguiu a metodologia descrita por Viancelli *et al.* (2011), utilizando-se termociclador (Mastercycler Eppendorf).

3.7.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante - DGGE

Para a realização do DGGE, foi utilizado o sistema Bio-RadDCode (Bio-Rad, Richmond, USA). Para a eletroforese do 16S rRNA, foi utilizado um gel com aproximadamente 1 mm de espessura contendo 8% poliacrilamida e o gradiente desnaturante variou de 25% a 75%. O gel foi submergido em tampão TAE 1X (40 mM Tris, 40 mM ácido acético e 1 mM EDTA - pH 7.4) e então realizada a eletroforese do produto de PCR para 16S rRNA. A corrida foi realizada em aproximadamente 5 horas, em uma voltagem constante de 130 V a temperatura de 60 °C. Após a eletroforese, o gel foi mantido no escuro por 20 minutos em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio.

A visualização dos géis foi feita utilizando-se um transiluminador e a captura de imagens utilizando-se Kodak Molecular Imaging Software v.5.0.0.90. Bandas 16S rRNA individuais do gel de DGGE foram excisadas utilizando ponteiras estéreis, eluídas em água deionizada estéril e estocadas durante 12 horas a 4°C.

Na re-amplificação do DNA recolhido do gel, 10 µL de DNA, retirados de cada banda formada no DGGE, foi utilizado como molde. O produto obtido por PCR foi purificado utilizando-se isopropanol 75%.

O sequenciamento do DNA após purificação foi realizado pela empresa Ludwig Biotecnologia (ACTGene Análises Moleculares Ltda).

A determinação das sequências foi feita em um sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. Os fragmentos de DNA foram analisados e sobrepostos, utilizando-se o programa BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999). As relações filogenéticas entre as sequencias foram determinada com MEGA 5.0. O coeficiente de similaridade foi calculado baseado em bandas, pelo método de Dice e análise de Cluster foi realizada por UPGMA, sendo o resultado apresentado como um dendograma elaborado utilizando-se o software Gel Compar II Version 6.5.

3.7.4 Hibridização fluorescente *in situ* - FISH

A técnica de FISH foi realizada quinzenalmente, conforme descrito por Amann (1995). Resumidamente, a metodologia empregada pode ser dividida em seis (6) principais etapas:

1) coleta e fixação das amostras: realizado através da adição de 3 volumes de paraformaldeído (PFA) 4% em 200 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,2) para cada 1 volume de suspensão bacteriana. Para a conservação das amostras após a fixação, estas eram armazenadas em congelador (-20°C);

2) preparação das lâminas e desidratação das células: após fixadas, as amostras eram dispostas em lâminas contendo gelatina (0,1%) e KCr (SO₄)₂ (0,01%) desidratadas (através da adição de concentrações crescentes de etanol - 50%, 80% e 100%), para então proceder-se à hibridização.

3) hibridização das células com as sondas fluorescentes: após desidratadas, as células foram expostas à diferentes concentrações de soluções de hibridização (de acordo com o recomendado para cada sonda). Em seguida, em cada orifício da lâmina foi adicionado uma sonda contendo o marcador Cy3. Para sondas com sequências similares (menos de três bases diferentes) foram utilizadas sondas competidoras evitando resultado falso-positivo. A hibridização ocorreu em um recipiente plástico, fechado e protegido da luz, contendo papel embebido em água onde cada lâmina foi disposta e incubada por 1,5 horas a 46°C. Após a incubação, adicionou-se em cada orifício da lâmina, 2µL de 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) em uma concentração de 10µg/mL sendo a lâmina posteriormente exposta por mais 20 minutos a 46°C.

4) lavagem das lâminas para otimização da estringência: após hibridização, as células foram lavadas com solução de lavagem para retirada do excesso da solução de hibridização e de sonda. Para tanto, foram adicionados 20µL da solução de lavagem com concentração específica (de acordo com a porcentagem de formamida utilizado na hibridização) para cada sonda e as lâminas foram incubadas por 20 minutos em banho pré-aquecido de 48°C. O tampão de lavagem foi removido com água destilada a 4°C e as lâminas foram secas em local desprovido de iluminação e em temperatura ambiente.

5) adição de anti “fading” (CitiFluor): algumas gotas da solução de anti “fading” foram adicionadas sobre a amostra recém preparada (a fim de evitar que houvesse perda da fluorescência) e posteriormente, coberta com a lamínula.

6) observação das lâminas em microscópio: a ligação da sonda (com fluorocromo do tipo Cy3) com a sequência complementar no

RNAr foi detectada por microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus modelo BX-41) e microscopia eletrônica de varredura (Leica TCS SP5). Na estimativa de abundância de células hibridizadas com a sequência complementar do RNAr, 10 campos foram escolhidos aleatoriamente e consideradas as células coradas com DAPI como representante de 100% do total de microrganismos.

Na Figura 12 é apresentado um esquema simplificado das etapas da técnica de FISH e na Tabela 4 são apresentadas as sondas utilizadas, sequências, especificidade, porcentagem de formamida (FA %) e referências. Demais detalhes das sondas estão disponíveis no site do probeBase.

Figura 12 – Representação esquemática simplificada da técnica de FISH.

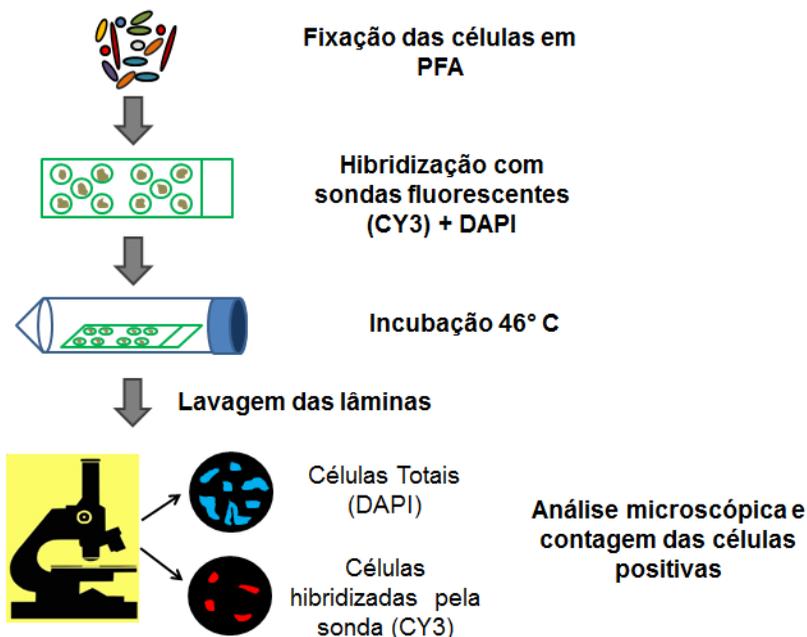


Tabela 4 – Descrição das sondas utilizadas nas análises das amostras dos reatores.

Sondas	Grupo alvo	Sequência (5'-3')	FA (%)	Referência
EUB _{mix} (I+II+III)	Maioria das planctomycetales e verrucomicrobiales	I- ctgectcccgtagca II- cag ccaccctaggtgctg III- ccaccctaggtgt	20	I - Amann <i>et al.</i> (1990) II e III - Daims <i>et al.</i> (1999)
PAO _{mix} (462 ¹ +651 ² +846 ³)	Maioria dos membros Candidatus <i>Accumulibacter</i>	¹ ccgtcatctacwcagggtattaac ² ccctctgccaaactccag ³ gttagctacggcactaaaagg	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
GAO _{mix} (431 ⁴ +989 ⁵)	Maioria dos membros Candidatus " <i>Competibacter phosphatis</i> "	⁴ tccccgcctaaagggtt ⁵ tccccggatgtcaaggc	35	Crocetti <i>et al.</i> (2002)
THIO	Algumas <i>Thiobacillus</i>	gcatgaaaccccgcgtgt	35	Figuerola e Erijman, (2007)
TBD1419	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	acttctgccagattccac	50	Fernandez <i>et al.</i> (2008)
DSV 407	Algumas Desulfovibrionaceae (redutoras de sulfato)	ccgaaggcctttccct	50	Manz <i>et al.</i> (1998)
Ntspa662	Maioria dos membros Nitrospirae	cgcttcgccaccggccttcc	35	Daims <i>et al.</i> (2001)
Ntspn693	<i>Nitrospina gracilis</i>	ttccaatatcaacgcattt	20	Juretschko (2000)
NSO 190	β- oxidantes de amônio Proteobacteria	cgatccccgtctttctcc	55	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
NEU 653 *Competidor	<i>Nitrosomonas</i> sp	ccctctgctgactacteta *cctgtgctccatgctccg	40	Wagner <i>et al.</i> (1995)
NIT 3	<i>Nitrobacter</i> sp	cctgtgctccatgctccg	40	Wagner <i>et al.</i> (1996)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no Estágio I não serão apresentados neste trabalho, uma vez que este período objetivou o treinamento operacional e avaliação preliminar para o delineamento dos estágios seguintes. Os dados obtidos nesse estágio estão apresentados no Apêndice 1 e disponíveis nos Anais do 26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (Fernandes *et al.*, 2011).

Os resultados apresentados a seguir, referem-se aos Estágios II e III, os quais serviram de base para elaboração de quatro artigos e seus resultados serão detalhadamente apresentados neste documento. O primeiro artigo (submetido à revista *Journal of Environmental Management*) trata especificamente do RBS1, monitorado durante o Estágio II ao longo de 192 dias. O segundo artigo (publicado na revista *Bioresource Technology*) trata do RBS2 monitorado durante o Estágio II e ao longo de 141 dias. O terceiro artigo (submetido à revista *Water Environment Research*) apresenta o RBS2 durante o Estágio III e compara sua eficiência ao longo de diferentes tempos de ciclos operacionais ao longo de 91 dias. Por fim, o quarto artigo apresenta o comportamento do RBS2 durante os Estágios II e III ao longo 205 dias (105 para Período 1 e 85 para o Período 2).

Desta forma, optou-se por apresentar os resultados ao longo de 4 subitens independentes: Estágio II – RBS 1 (artigo 1); Estágio II – RBS 2 (artigo 2); Estágio III – RBS 2 (artigo 3) e Estágio II e III – RBS 2 (artigo 4). A Figura 13 apresenta um diagrama dos artigos elaborados e norteadores dos resultados a seguir apresentados.

Figura 13 – Diagrama esquemático dos artigos elaborados.



4.1 ARTIGO 1: ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA POR TÉCNICAS MOLECULARES E SUA INFLUÊNCIA NA EFICIÊNCIA DO RBS1 - ESTÁGIO II

Este artigo teve como objetivo investigar o funcionamento do RBS1: estabilidade operacional, desempenho ao longo dos ciclos e eficiência do reator, em condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido ($\leq 1 \text{ mg L}^{-1}$) e variações de cargas aplicadas (orgânica e de nutrientes); e como se processa a aclimação gradual da população microbiana presente no reator.

Para tal, foram realizadas coletas de amostras e monitoramento do reator, conforme descrito no item 3.2; analisadas as variáveis físico-químicas de remoção da matéria orgânica e nutrientes no esgoto tratado no reator, descritas no item 3.3; a composição da biomassa ativa do reator foi determinada por meio de ensaios respirométricos conduzidos periodicamente, descritos no item 3.5; e a diversidade microbiológica e análise filogenética bacteriana foram observadas utilizando-se microscopia e técnicas de biologia molecular, descritas nos itens 3.4 e 3.7, respectivamente.

4.1.1 Remoção de matéria orgânica e nutrientes

O RBS1 apresentou satisfatória eficiência de remoção para as principais variáveis analisadas ao longo de todo o período monitorado, mesmo operado em baixas concentrações de OD (média de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$).

Em sistemas de tratamento, a matéria orgânica possui influência fundamental na composição da comunidade microbiana do reator sendo a base trófica que sustenta esse ecossistema. O afluente apresentou razão C:N:P de 150: 12:1,7 a qual, de acordo com Metcalf e Eddy (2003) apresenta-se elevada. A $\text{DQO}_{\text{solúvel}}$ (DQOS) do afluente teve variações ao longo dos ciclos monitorados, porém apresentou eficiente remoção com média foi de 76%, conforme apresentado nas Figuras 14 e 15.

A carga orgânica volumétrica aplicada (COV) variou entre 0,2 e 0,8 com média no período de $0,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Figura 14). Baixas concentrações de DQOS foram encontradas nos dias 24 e 99, com os valores afluentes de 119 e 89 valores mg L^{-1} e efluentes de 49 e 16 mg L^{-1} (Figura 15). Alguns estudos utilizando RBS têm reportado alta eficiência de remoção de DQOS (muitas vezes maior que 90%),

demonstrando que estes reatores têm uma maior capacidade para a remoção de carbono orgânico sendo capaz de absorver choques de cargas orgânicas. Tal fator sugere que RBS são hábeis para garantir a estabilidade do processo (ARTAN e ORHON, 2005; DENECKE *et al.*, 2012).

Figura 14 – Carga Orgânica Volumétrica (COV) aplicada e eficiência de remoção de DQOsolúvel no RBS1.

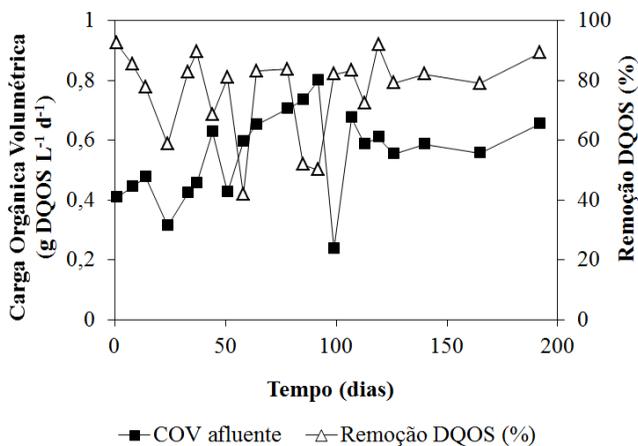
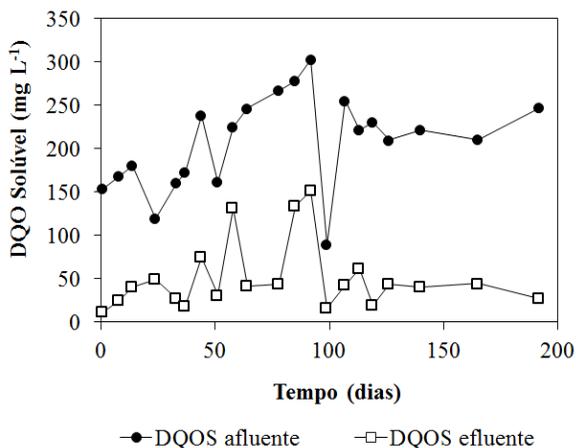
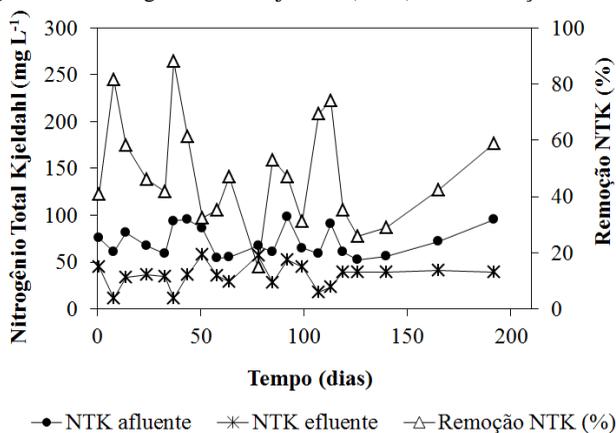


Figura 15 – Concentração de DQO solúvel durante o Estágio II, no RBS1.



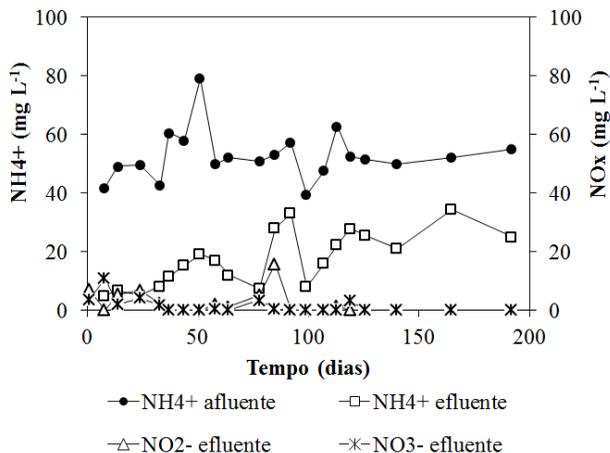
Para o nitrogênio total Kjeldahl (NTK), a eficiência média de remoção foi de 50%, no entanto os níveis de NTK tiveram muitas variações devido a flutuações nas concentrações afluentes. Basicamente, quase todo NTK foi encontrado como NH_4^+ (Figuras 16 e 17). Durante o dia 37 verificou-se elevada concentração de NTK afluente (94 mg L^{-1}) e a eficiência de remoção foi máxima (88%). A média de remoção de nitrogênio amoniacal foi de 70% durante o estudo e as concentrações médias foram de $52,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $16,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o afluente e efluente, respectivamente (Figura 17).

Figura 16 – Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) e sua remoção no RBS1.



A remoção média de nitrogênio total (NTK + $\text{NO}_x\text{-N}$) foi de 43%. Estas eficiências de remoção podem ter sido afetadas pela baixa concentração de oxigênio que resultou na oxidação parcial do amônio sem produção de nitrato. De acordo com Sliekers *et al.* (2005), as baixas concentrações de OD inibem o desenvolvimento de bactérias autotróficas nitrificantes, deixando o papel do oxidante de amônio para os organismos heterotróficos nitrificantes. Além disso, é importante destacar a baixa produção de nitrito (N-NO_2) e nitrato (N-NO_3) ao longo do período monitorado associado com o fato de o reator ter sido operado por alimentação escalonada (que permite o fornecimento de substratos orgânicos para algumas bactérias heterotróficas capazes de realizar NDS, as quais os utilizam como fontes de carbono e de energia para, em condições aeróbias, converter amônio em nitrogênio gasoso) indicando uma possível ocorrência de processos NDS.

Figura 17 – Concentração das diferentes espécies de nitrogênio encontradas no RBS1.



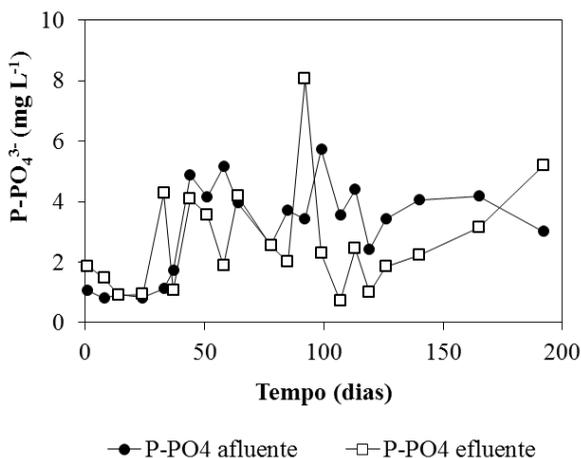
O pH do reator foi em média de 6,7 o qual, de acordo com Van Haandel e Marais (1999), não inibiu o processo de nitrificação. De acordo com esses mesmos autores, a alcalinidade também não foi um fator limitante para a nitrificação já que seu consumo no reator não ultrapassou 7,14 mg CaCO₃/mg N-NH₄⁺ oxidado. Neste estudo, a alcalinidade afluente foi maior do que aquela relatada para águas residuárias brasileiras (média entre 110-170 mg CaCO₃ L⁻¹), com uma média de 245 mg L⁻¹ CaCO₃. O pH foi mantido dentro de um intervalo da neutralidade (média de 6,7), sem a volatilização de amônia de acordo com os mesmos autores.

A relação C/N (g-DQO/g-N) foi de 12. Henze *et al.* (2001) calcularam que uma relação C/N mínima de 3,5-4,5 g-DQO/g-N e propôs que 6-11 g-DQO/g-N resulta em boa remoção de N em sistemas de lodos com predenitrificação. No entanto Ryu e Lee (2009) sugerem que a relação C/N de águas residuais domésticas, é, muitas vezes, inferior a estes valores prescritos, ficando a remoção de N limitada pela falta de uma fonte de carbono orgânico disponível. Assim, Seixo *et al.* (2004) em um estudo utilizando reator em batelada sequencial, observou um aumento na taxa de nitrificação com um aumento de carga orgânica, atingindo 99,6% NH₄⁺ de remoção quando a proporção C/N era de 11.

A concentração de P não apresentou uma clara tendência, provavelmente devido às alterações nas concentrações de entrada (Figura 18). Baixas concentrações foram encontradas no início do

monitoramento (até ao dia 44) sendo subsequentemente observado um aumento significativo na concentração do P afluente. No dia 107, uma redução máxima foi observada (80%), seguido pelo dia 99 quando o afluente foi máximo (5,7 mg P-PO₄³⁻) com remoção de 60%. No entanto, nos dias 1, 8, 24, 33, 64, 92 e 192 as concentrações de efluente foram maiores do que o afluente, indicando que a remoção não ocorreu durante este período.

Figura 18 – Concentração de P-PO₄³⁻ no afluente e efluente do RBS1.



Tal fato provavelmente é resultante das baixas concentrações de OD no reator, o qual acarreta na inibição de captação de fosfato por organismos acumuladores de fosfato (OAP), os quais rapidamente assimilam substratos orgânicos utilizando-os para sintetizar PHA; sendo o ortofosfato liberado para o meio líquido (SEVIOUR *et al.*, 2003). No entanto, para a maioria dos dias monitorados, observou-se que a concentração do efluente foi sempre menor do que o afluente, com uma eficiência média de remoção de 40%.

4.1.2 Caracterização da biomassa

O tempo de retenção do lodo do RBS1 foi de 82 dias. Os valores de SST do licor misto variaram entre 1,0 g L⁻¹ (dias 1 e 92) e 9,8 g L⁻¹ (dia 85), conforme apresentado na Figura 19. A eficiência de remoção de SSV foi de 91% (Figura 20) e a relação SSV/SST durante

todo o período foi de 0,9. O valor máximo (8,5 g SSV L⁻¹) foi obtido quando a carga orgânica aplicada era de 0,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Na Figura 21, é apresentada a relação alimento/microrganismos (A/M) para o período monitorado. Observa-se que houve um aumento de A/M com a diminuição da concentração de SSV, variando entre 0,09 e 0,85 g DQO/g SSV d, com média de 0,3 g DQO/g SSV d, valor este, dentro da faixa padrão (que varia de 0,25 a 0,50 g DQO g d SSV) segundo van Haandel e Marais (1999). No dia 44, foi observada uma elevada relação A/M quando comparado aos demais dias, provavelmente devido a uma descarga de lodo realizada, não havendo, contudo, consideráveis variações na carga de DQO aplicada. Subsequentemente ao dia 99, foi observado um ligeiro aumento na proporção A/M, devido a um novo processo de remoção de lodo ocorrido no dia 90.

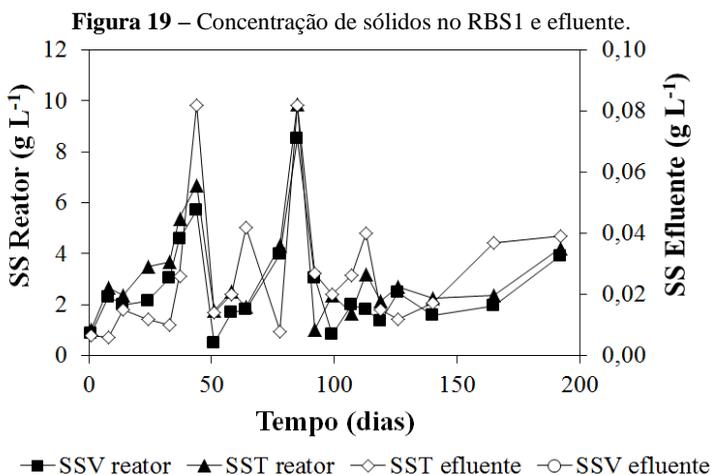


Figura 20 – Remoção e concentração de sólidos suspensos voláteis afluente e efluente no RBS1.

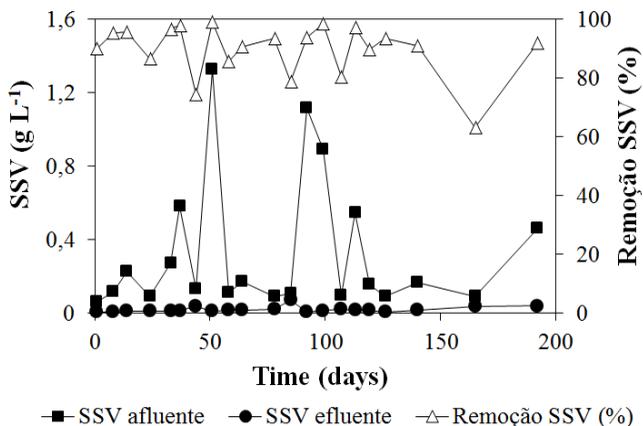
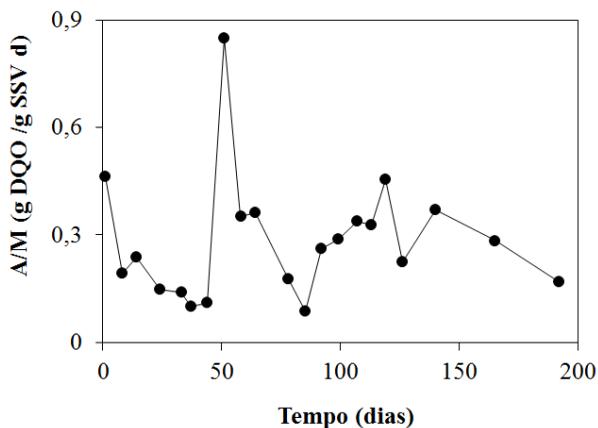


Figura 21 – Relação Alimento/Microrganismos (A/M) no RBS1 ao longo do período monitorado.



4.1.3 Diversidade microbológica e análise filogenética bacteriana

Os sistemas de tratamento biológico de águas residuárias se apresentam como complexos ecossistemas que propiciam o desenvolvimento de diversos microrganismos. A gestão destes

sistemas depende do conhecimento sobre as populações microbianas envolvidas bem como dos fatores que regulam a sua atividade.

Através da utilização da microscopia óptica foi observado um lodo altamente concentrado, formado por flocos compactos em arranjos irregulares, compostos de células em forma de cocos; ricos em matéria orgânica em suspensão ou aderida aos flocos bacterianos; os quais apresentavam poucas bactérias filamentosas (*Beggiatoa* sp.).

No que concerne aos protozoários, estes, apresentaram-se frequentemente compostos por espécies de ciliados livres natantes ou rastejantes, amebas nuas e rotíferos. Os protozoários ciliados recorrente a este período, foram identificados como rastejantes *Hypotriches* (*Aspidisca* sp.) e *Holotriches*. No entanto, uma parcela de ciliados encontrados em menor frequência, compreendiam espécies aderidas aos flocos (*Vorticella convallaria*).

Protozoários flagelados foram também encontrados em algumas amostras e, de acordo com Warren *et al.* (2010), este grupo indica condições operacionais instáveis, lodo mal arejado ou problemas de funcionamento em estações em fase inicial. Rotíferos e amebas nuas foram encontrados em baixa concentração, durante todo o período. Os ciliados, amebas e rotíferos desempenham um papel importante no sistema, uma vez que se alimentam principalmente de bactérias, bem como de substâncias orgânicas e outros pequenos organismos. Através de predação são capazes de rejuvenescer a população bacteriana contribuindo no processo de floculação, sendo responsável por melhorar a qualidade do efluente, tornando-os adequados indicadores de boa qualidade do efluente (ZHOU *et al.*, 2008, SAMARAS *et al.*, 2009).

Ciliados são geralmente dominantes em uma comunidade de protozoários, uma vez que se deslocam mais rapidamente, garantindo-lhes a captura de alimentos com maior facilidade do que os rotíferos, por exemplo, que são o mais lentos desses protozoários.

Quanto aos rotíferos, estes possuem um tamanho suficiente para quebrar e fragmentar os flocos, produzindo assim novas superfícies para absorção no entorno das quais podem se fixar novas partículas, aumentando assim a floculação (CANLER, 1999). Ainda, segundo Fiałkowska and Pajdak-Stós (2008) estes metazoários podem afetar o volume de lodo através do consumo de grande quantidade de filamentos (foi observado pelos referidos autores, que rotíferos podem consumir, diariamente, o equivalente a várias vezes seu peso corporal). Assim, através da quebra ou consumo, essa redução no

número de filamentos reduz as denominadas “pontes” entre flocos, que são responsáveis por problemas na sedimentabilidade do lodo.

Amebas nuas por sua vez, apresentam maiores taxas de crescimento, quando comparado a ciliados e rotíferos. Em geral, estes grupos são importantes por predação de bactérias. A morte de pequenas espécies tais como as bactérias, por espécies maiores, tais como protozoários, pode reduzir a população da menor espécie levando a uma redução da população de microrganismos total e, conseqüentemente, do lodo em excesso (MOHAMMADI, 2011).

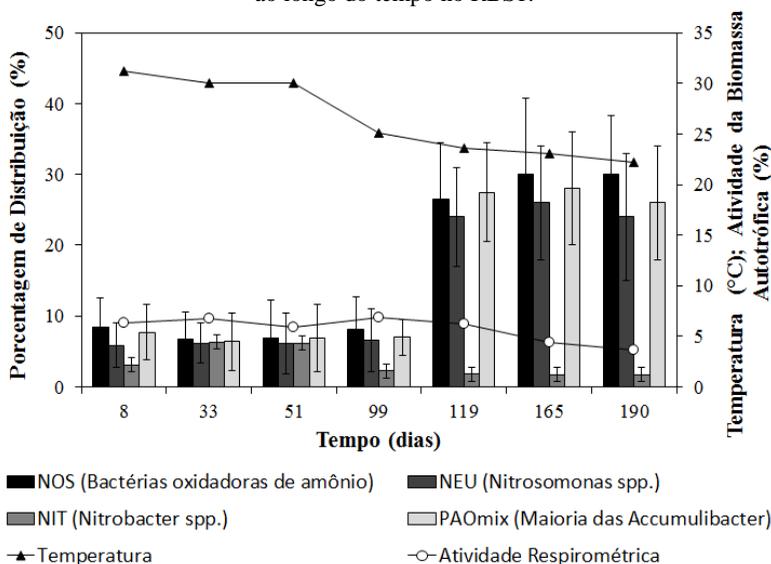
A fim de determinar a composição da biomassa ativa do RBS1, ensaios respirométricos foram conduzidos periodicamente. A captação de OD e a respiração microbiana aeróbia (medida pelo TCO) de um sistema estão intimamente ligados sendo estes valores particularmente sensíveis a mudanças na atividade microbiana. A TCO específica média ($\text{mg O}_2 \text{ g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para biomassa nitrificante e heterotrófica foram de 3,7 e 19,5, respectivamente. A concentração da biomassa ativa heterotrófica ($X_H = \text{mg L}^{-1}$) foi de 123,6 mg DQO L^{-1} (94,9% da biomassa do sistema global) enquanto que a biomassa ativa autotrófica ($X_A = \text{mg L}^{-1}$) foi de 5,1 mg DQO L^{-1} (5,1% da biomassa do sistema global), indicando que o reator era composto majoritariamente de organismos heterotróficos.

A diversidade microbiana em sistemas de tratamento em escala real depende da composição das águas residuárias (que devem ser fornecidas com uma variedade de nutrientes essenciais para o crescimento celular) e operação do sistema. Os fatores de controle que determinam essa diversidade ainda são pouco compreendidos. No entanto, sabe-se que microrganismos nitrificantes crescem muito lentamente devido ao baixo rendimento energético resultante dos processos de oxidação de compostos inorgânicos, tornando-os sensíveis às mínimas alterações nas suas condições de crescimento (SEVIOUR, 2010).

A técnica FISH foi realizada para identificar alguns dos gêneros bacterianos envolvidos no metabolismo do N e do P presentes no reator. Uma grande quantidade de organismos do domínio Bacteria (90% de células coradas com DAPI) foi observada, indicando elevada atividade metabólica no sistema de tratamento. Os sinais obtidos a partir das sondas de oligonucleotídeos foram intensos. A comunidade microbiana mostrou-se morfológicamente formada por bactérias cocais em agregados coloniais, alguns bacilos e poucas bactérias filamentosas.

A Figura 22 apresenta as proporções de distribuição da biomassa bacteriana em diferentes períodos e a sua correlação com a temperatura (°C) e com a biomassa autotrófica ativa (%) presente no reator.

Figura 22 – Porcentagem de distribuição bacteriana analisada com a técnica de FISH e sua correlação com a temperatura (°C) e biomassa ativa autotrófica (%) ao longo do tempo no RBS1.



As proporções de distribuição de Betaproteobactérias oxidadoras de amônio (BOA), bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e organismos acumuladores de polifosfato (OAP) foram exibidos pela distribuição relativa de bactérias totais (células coradas com DAPI). Como mostra a Figura 22, a distribuição inicial (até ao dia 99) de cada grupo bacteriano foi encontrada em baixa porcentagem, representando apenas 5-9% das células coradas com DAPI. No entanto, no período subsequente (após dia 99), houve um aumento considerável na concentração de membros BOAs e OAP, com uma média de 29% para BOAs (sendo 24% para o gênero *Nitrosomonas*) e 27% para os organismos OAP.

Embora a concentração de organismos BOAs tenha apresentado um considerável aumento após 99 dias de monitoramento, a remoção de NH_4^+ no reator não ocorreu na mesma proporção (Figura 16), com

uma média de 53,6%, enquanto que no período anterior, a remoção média atingiu 74,9%. Este aumento de microrganismos BOAs após 99 dias, pode ser justificado pelo processo operacional realizado (retirada de lodo excedente após o dia 85, dado que a concentração de TSS e VSS efluente estava acima de 5 g L^{-1}), o que pode ter estimulado o crescimento microbiano no reator (talvez através da retirada de uma substância inibidora), ou mesmo através do reduzido número de micro-organismos num meio onde muito substrato estava disponível.

Além disso, a temperatura média registrada nesse período foi de $23,9 \text{ }^\circ\text{C}$, indicando uma diminuição de $7 \text{ }^\circ\text{C}$ quando comparado ao período anterior (média de $30 \text{ }^\circ\text{C}$). A temperatura apresenta-se como um fator fundamental na determinação da taxa em que muitos dos processos biológicos ocorrem, desempenhando um papel seletivo da evolução e sucessão nas comunidades microbianas. Assim, a temperatura apresenta influência positiva na atividade das BOAs, melhorando significativamente a oxidação de amônio com o seu aumento (TOURNA *et al.*, 2008). Além disso, de acordo com a Long *et al.* (2012) a abundância, estrutura da comunidade e distribuição de organismos amônio-oxidantes podem ser significativamente afetados por fatores ambientais, incluindo temperatura, níveis de amônio, umidade, salinidade e pH. Através da triagem da atividade respirométrica esse comportamento pôde ser confirmado uma vez que a biomassa autotrófica ativa se manteve estável por todo o período monitorado, ou seja, embora a população nitrificante estivesse presente em alta concentração no reator, esta, estava em baixa atividade, levando a uma baixa eficiência de remoção de amônio.

Ainda na Figura 22, observa-se que o gênero *Nitrobacter* manteve baixa ocorrência ao longo do período monitorado (menos de 5% das células coradas com DAPI) enquanto *Nitrospira* foi detectada em rara ocorrência (porcentagem média inferior a 3%) em apenas alguns períodos (dados não apresentados na Figura 22).

Membros OAP (Candidatus *Accumulibacter*) foram encontrados em baixa concentração (média de 7% das células coradas com DAPI) até o dia 99, aumentando consideravelmente sua concentração (média de 27% das células coradas com DAPI) na fase subsequente. O desenvolvimento de OAP torna-se favorecido em RBS devido às suas vantagens competitivas sobre os organismos que não são capazes de acumular poli-P para sobreviver durante os possíveis períodos de escassez de alimentos. Este aumento considerável de

ocorrência de OAP ao longo do período monitorado, aumentou a remoção de P (dias 99 ao 165) com uma média de 50%.

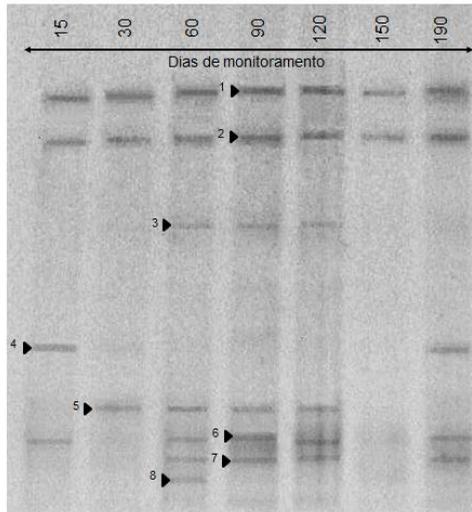
Nos períodos iniciais, a remoção de P não foi observada, com aumento na sua concentração efluente. Este fato pode ter resultado da baixa ocorrência de OAP e também devido às baixas condições de aeração que acarreta a liberação de fosfato no meio líquido. Organismos desnitrificantes do gênero *Thiobacillus* não foram detectados neste estudo, e devido à falta de sondas apropriadas, a abundância de outros organismos desnitrificantes não foi avaliada. No entanto, alguns OAP são também capazes de realizar a desnitrificação (KONG *et al.*, 2004), sugerindo que esse processo pode ter sido resultado da ação deste grupo presente no reator.

Membros da família *Desulfovibrionaceae* também não foram encontrados neste estudo.

Mudanças na composição da comunidade bacteriana do RBS1 foram investigadas através de técnica de PCR-DGGE. A Figura 23 mostra o padrão de bandas típico de um gel de DGGE, com as impressões moleculares referentes ao período monitorado. Cada banda, em princípio, corresponde uma espécie microbiana dominante assim, quanto mais bandas, maior a diversidade e quanto mais intensa, maior a abundância do grupo na amostra. Em geral, a análise de DGGE apresentou mudanças no perfil de bandas ao longo do tempo de tratamento biológico, bem como variações na sua intensidade da banda (por exemplo, amostras do dia 15 a 190, banda 1).

Pela análise do gel de DGGE, observa-se que as bandas 1 e 2 foram detectadas ao longo de todos os dias de monitoramento assim como apresentaram variações na sua intensidade. Este aumento de intensidade pode ser observado entre as bandas dos dias 15 a 120, diminuindo na banda do dia 150 e aumentando conseqüentemente no dia 190.

Figura 23 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados do 16S rDNA pela técnica de DGGE utilizando DNA genômico extraído do licor misto das amostras do SBR1, ao longo dos dias de monitoramento.



As outras bandas que se seguem (3 a 8) aparecem em diferentes amostras, não estando presentes ao longo de todo período monitorado. Tal fato indica mudanças na composição microbológica do reator. As bandas 3, 5, 6 e 7 apareceram entre os dias 60 e 120. A banda 4 e 6 banda apareceram nas corridas dos dias 15 enquanto que a banda 5, apareceu também na corrida do dia 30. As bandas 6 e 7 também foram verificadas no dia 190 e a banda 8 foi verificada apenas no dia 60. Estas diferenças sugerem alguma variação na composição da comunidade microbiana durante o período, as quais podem ter sido ocasionadas pela variação do afluente, uma vez que as amostras foram recolhidas a partir de um mesmo ponto do reator.

Conforme apresentado na Figura 23, um total de 8 diferentes bandas foram observadas no perfil do DGGE sendo estas, posteriormente excisadas do gel. Os DNAs, apresentando mesmo tamanho (porém diferentes sequências) puderam ser separados, re-amplificados e finalmente, sequenciados. Cada sequência foi submetida a uma pesquisa BLAST e os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultdos encontrados na pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE do RBS1.

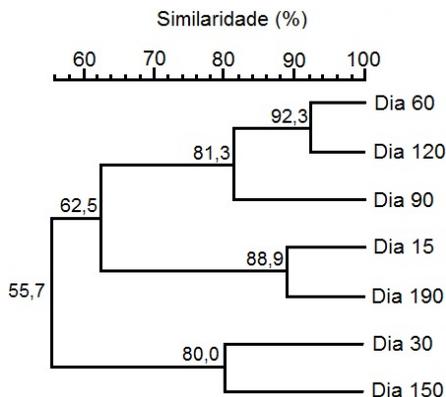
Bandas	Grupos Relacionados (Número de Acesso)	%*	Fonte
1	Bactéria não cultivada clone gene 16S rRNA (DQ673352.1)	99	Grânulos aeróbios nitrificantes produzidos em RBS
2	Bactéria não cultivada isolada de gel DGGE banda X15 gene rRNA (GU395573.1)	98	Bactérias produtoras de PHA em bioreator para tratamento de águas residuárias
3	Bactéria não cultivada clone 0729 gene rRNA (AB286448.1)	97	Tratamento de águas residuárias sob reduzido oxigênio em indústria alimentícia
4	Bactérias <i>Firmicutes</i> não cultivada isolada de gel de DGGE 16S rRNA (JX548548.1)	99	Tratamento de águas residuárias utilizando sistema bioeletroquímico
5	Bactérias <i>Bacteroidetes</i> não cultivada isoladas de gel de DGGE 16S rRNA (FJ750465.1)	98	Processo de lodo ativado utilizando ozônio para redução de lodo
6	Bactéria não cultivada clone C036 gene rRNA (FJ561582.1)	98	Bioaugmentação com <i>Pseudomonas</i> sp. (cepa MHP41) em solos de agricultura
7	Bactéria não cultivada clone Pohang_WWTP gene 16S rRNA (HQ517990.1)	97	Processo de lodo ativado utilizando pirosequenciamento
8	Bactéria não cultivada clone F1Q32TO05BRWN 16S rRNA (GU503329.1)	98	Comunidade bacteriana em escala real utilizando sistema de lodos ativados com biomassa fixa

*(%) – Refere-se à porcentagem de similaridade.

A maioria dos microrganismos foram taxonomicamente classificados como *Bacteroidetes* e a banda 4 foi filiado a *Firmicutes*. Todas as bandas tiveram os microrganismos relacionados àqueles normalmente observados em processo de lodos ativados onde ocorrem com grande diversidade. Além disso, todas as bandas apresentaram similaridade com organismos não cultivados e na sua maioria provenientes de diferentes sistemas de tratamento de águas residuárias, dentre eles, reator em bateladas sequenciais com biomassa fixa, reatores com grânulos aeróbicos ou ainda, sistemas com suprimento reduzido de oxigênio, sugerindo que o RBS estudado apresentou durante o processo de tratamento, a formação de microzonas com diferentes concentrações de OD e pouca variação durante a fase anóxica-óxica permitindo o desenvolvimento e atividade dos diferentes grupos microbianos, incluindo aqueles capazes de realizar o processo NDS utilizando os substratos orgânicos como fontes de carbono e energia para converter amônia em nitrogênio gasoso, aerobicamente.

A análise de agrupamento foi realizada, e um dendograma apresentando as semelhanças entre os diferentes perfis de DGGE (porcentagem) é apresentado na Figura 24. Observa-se por este método de comparação que no período compreendido entre o dia 60 e 120, o consórcio microbiano exibiu semelhança máxima. Similaridade de 92,3% foi observada durante esse período, seguido por 88,9% durante o período entre os dias 15 e 190. Alta variação e diversidade da comunidade microbiana foram observadas entre os dias 60 e 90, enquanto baixa diversidade e alta similaridade (80%) foi observada entre os dias 30 e 150.

Figura 24 – Análise de agrupamento mostrando a similaridade entre diferentes impressões moleculares no RBS1, obtidas por DGGE.



4.1.4 Conclusões

O RBS1 apresentou viabilidade para tratar esgoto sanitário, operando com baixa concentração de OD (média de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$), variação na carga aplicada e alta relação C:N (12g DQO/g N). A eficiência de remoção ficou acima de 70% para matéria orgânica e amônio, sendo verificada a importância da temperatura como fator determinante do processo de nitrificação. As técnicas combinadas de PCR-DGGE verificaram mudanças significativas na comunidade microbiana ao longo do período monitorado, as quais foram também vinculadas aos fatores operacionais bem como às variações da qualidade do afluente. A formação de microzonas no interior do reator, com diferentes concentrações de OD e pouca variação durante a fase anóxica-óxica, permitiu o desenvolvimento e atividade de diferentes grupos microbianos. Adicionalmente, a maioria das sequências bacterianas identificadas pertenciam a grupos bacterianos encontrados em sistemas de lodos ativados. Estes resultados reforçam a premissa de que reatores em bateladas sequenciais podem se adaptar às mudanças de cargas aplicadas (orgânica e de nutrientes), com aclimação gradual da biomassa.

4.2 ARTIGO 2: DESEMPENHO E DIVERSIDADE DA COMUNIDADE MICROBIANA NO RBS2 - ESTÁGIO II

Este artigo teve como objetivo investigar o funcionamento do RBS2: estabilidade operacional e eficiência, e sua relação com a biomassa microbiana presente no lodo, em condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido ($\leq 1 \text{ mg L}^{-1}$) e variação de cargas aplicadas (orgânica e de nutrientes).

Para tal, foram realizadas coletas de amostras e monitoramento do reator, conforme descrito no item 3.2; e analisadas as variáveis físico-químicas de remoção da matéria orgânica e nutrientes no esgoto tratado no reator, descritas no item 3.3. Especial ênfase foi dada à diversidade microbológica e à qualidade do efluente de forma a contribuir com a literatura científica para sistemas em escala real, bem como melhorar as condições de operação do reator, com o uso das técnicas descritas nos itens 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7.

4.2.1 Remoção de matéria orgânica e nutrientes

O RBS2 apresentou satisfatória eficiência de remoção para as principais variáveis físico-químicas analisadas, produzindo um efluente que atende aos padrões de qualidade estabelecidos pelas leis brasileiras.

Ao longo de todo o período de monitoramento, o reator foi operado sob baixas concentrações de OD, com média de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, não afetando contudo o seu desempenho.

A média de remoção de DQOS foi de 83% como mostrado na Figura 25. A eficiência de remoção foi abaixo da média nos dias 22, 63 e 113, com valores de 72%, 65% e 66%, respectivamente. Embora a eficiência para esses dias tenha sido baixa comparada com outros dias, a remoção apresentou-se satisfatória quando observada a carga orgânica volumétrica aplicada (COV) que foi de $0,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para o dia 22 e $0,4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para os dias 63 e 113. Baixas concentrações de DQOS foram encontradas nos dias 32 e 99, com valores afluentes de 125 e 102 e valores efluentes de 6 e 22 mg L^{-1} (Figura 26). Conforme observado por autores como Arthan e Orhon (2005) e Denecke *et al.* (2012), em pesquisas utilizando RBS a eficiência de remoção de DQO apresentou valores acima de 90%, demonstrando que estes sistemas apresentam grande habilidade na

remoção de matéria orgânica bem como resistência contra variação de cargas aplicadas.

Figura 25 – Carga Orgânica Volumétrica (COV) aplicada e eficiência de remoção de DQOsolúvel no RBS2.

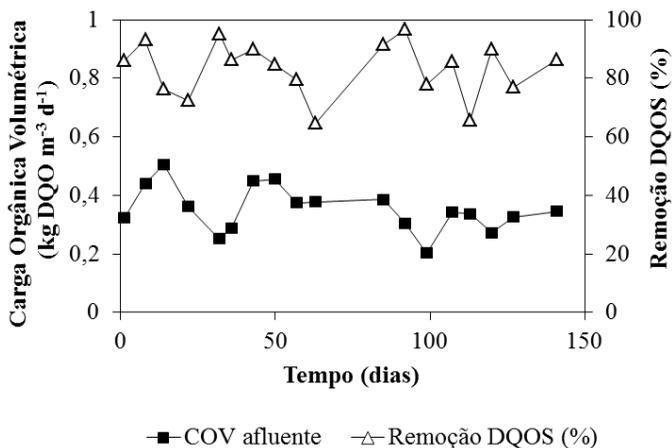
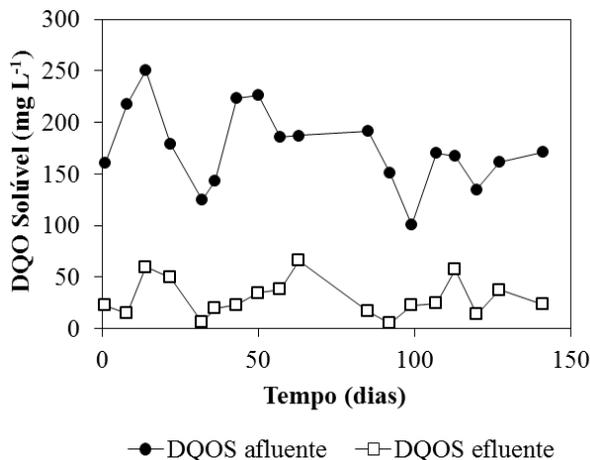


Figura 26 – Concentração de DQO solúvel durante o Estágio II, no RBS2.



Basicamente, todo o NTK foi encontrado na forma de amônio (Figura 27 e 28). A eficiência de remoção para NTK foi em média de 60% porém com muitas variações devido às flutuações nas concentrações afluentes. Durante o dia 43, uma grande concentração

de NTK afluente foi registrado (102 mg L^{-1}) com eficiência de remoção foi de 75%. A média de remoção de nitrogênio amoniacal foi de 61% e concentrações de 45,9 e $17,6 \text{ mg L}^{-1}$ foram encontrados no afluente e efluente, respectivamente (Figura 28).

Figura 27 – Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) e sua remoção no RBS2.

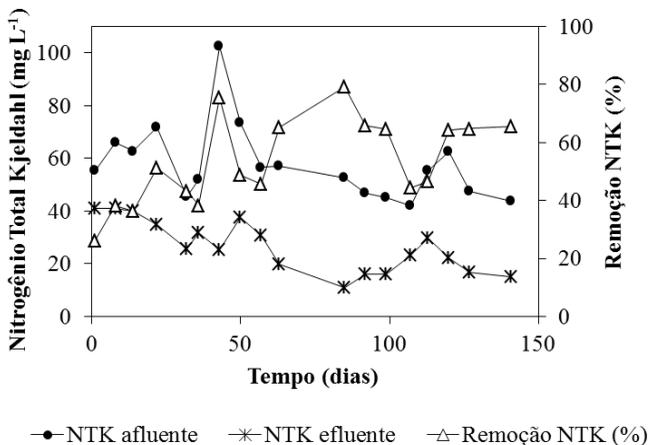
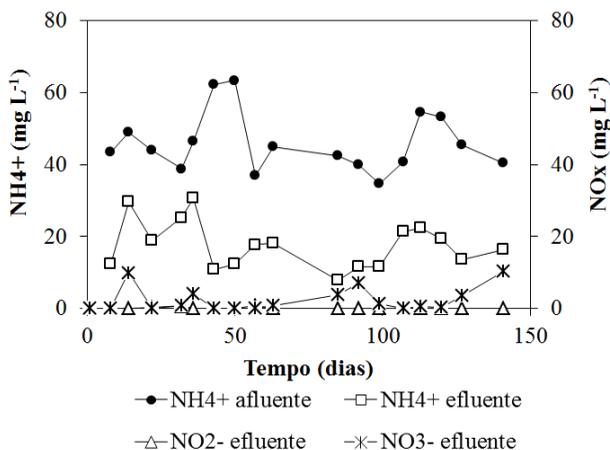


Figura 28 – Concentração das diferentes espécies de nitrogênio encontradas no RBS2.



A média para a remoção de nitrogênio total (NTK+NO_x-N) foi de 50% o qual foi afetado pela baixa concentração de OD. De acordo

com Slikers *et al.* (2005), baixas concentrações de OD inibem o desenvolvimento de bactérias autotróficas nitrificantes, transferindo para as nitrificantes heterotróficas, o papel de oxidar a amônia.

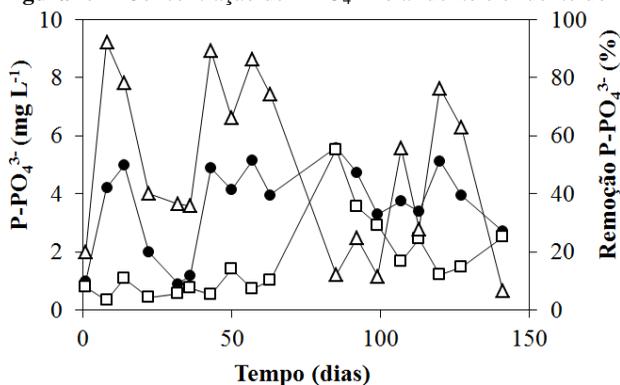
A alcalinidade não foi um fator limitante para a nitrificação, uma vez que o consumo de alcalinidade no reator não excedeu 7,14 mg CaCO₃/mg N-NH₄⁺ oxidado, de acordo com Van Haandel e Marais (1999). O pH manteve-se em uma faixa de neutralidade (média de 6,7) não havendo perda de amônia por volatilização, de acordo com os mesmos autores.

A razão C/N foi de 3 g-DQO/g-N. Bassin *et al.* (2012b) em um estudo com RBS em escala laboratorial, obtiveram eficiência acima de 95% utilizando razões de C/N entre 1,14 e 2,29 g-DQO/g-N.

A razão C/N em esgotos sanitários é, no entanto, frequentemente abaixo desses valores descritos, e a remoção de N é limitada pela falta de fonte de carbono orgânico disponível (RYU e LEE, 2009). Para Sun *et al.* (2010) o atalho da nitrificação seguida pela desnitrificação de NO₂⁻ reduz em aproximadamente 40% os requerimentos de carbono, 25% o suprimento de oxigênio e resulta em 40% menos produção de biomassa, comparado com a oxidação e desnitrificação de NO₃⁻. A redução na exigência de DQO por esta via torna a remoção de N a partir de baixa relação C/N viável em sistemas de tratamento de esgoto sanitário.

A concentração de fosfato não apresentou um comportamento estável provavelmente, devido às mudanças na concentração do fosfato afluente (Figura 29). Baixas concentrações foram encontradas no período em que foi realizada uma retirada de lodo. No dia 85, não houve variação da concentração afluente e efluente, indicando ausência de remoção para este período. Tal fato pode ter resultado da baixa concentração de OD, causando uma inibição da absorção de polifosfato por organismos acumuladores de fosfato (OAP). No entanto, para a maioria dos dias monitorados, foi observado que a concentração efluente estava abaixo da concentração afluente, apresentando eficiência média de remoção de 50%.

Figura 29 – Concentração de $P-PO_4^{3-}$ no afluente e efluente do RBS2.



● P-PO₄³⁻ afluente □ P-PO₄³⁻ efluente △ Remoção P-PO₄³⁻ (%)

4.2.2 Caracterização da biomassa

Os valores de SST para o licor misto do RBS2 variaram entre $1,2 \text{ g L}^{-1}$ (dia 36) e 10 g L^{-1} (dia 57) (Figura 30). A razão SSV/SST durante todo o período operacional foi de 70%. Valores máximos ($8,7 \text{ g SSV L}^{-1}$) foram obtidos quando a carga orgânica aplicada era de $0,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e o tempo médio de retenção de lodo foi de 77 dias, até o final da operação. No dia 22, mesmo após uma retirada de lodo em excesso, a concentração de SST e SSV no efluente foi elevada. A eficiência de remoção para SST e SSV foi de 70% e 80%, respectivamente.

A relação alimento/microrganismo (A/M) aumentou com a diminuição da concentração de SSV, variando entre 0,07 e 0,48 g DQO/g VSS d (Figura 31) com média de $0,2 \text{ g DQO/g SSV d}$, estando este valor abaixo da faixa padrão, que de acordo com van Haandel and Marais (1999), é de 0,25-0,50 g COD/g SSV d.

Figura 30 – Concentração de sólidos no RBS2 e efluente.

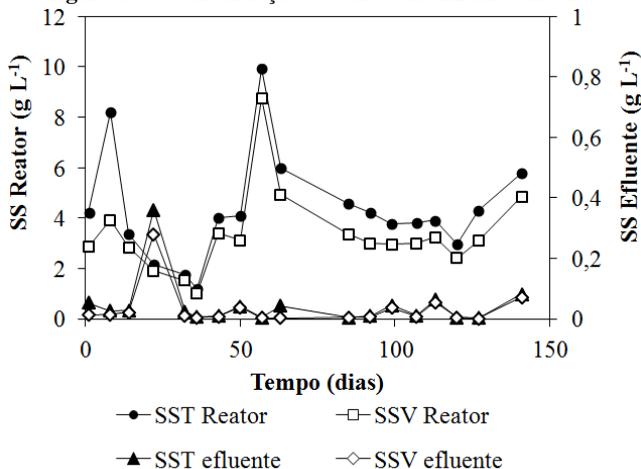
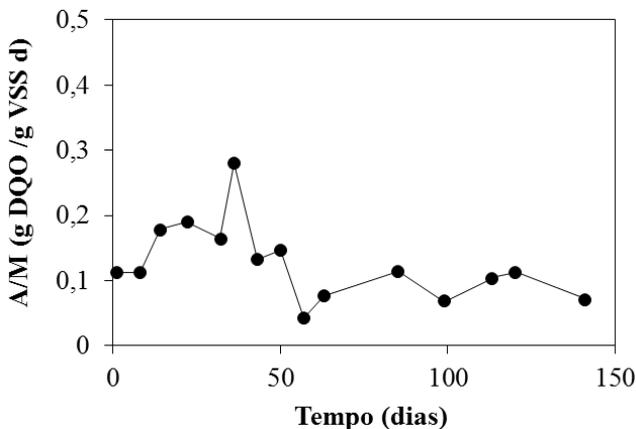


Figura 31 – Relação Alimento/Microorganismos (A/M) no reator RBS ao longo do período monitorado.

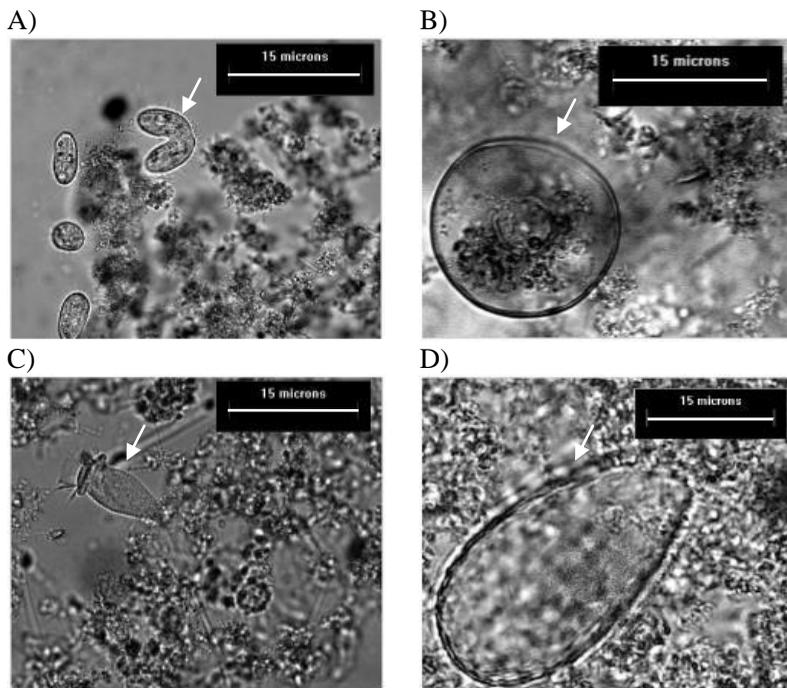


4.2.3 Análise da comunidade microbiológica

Análises de microscopia óptica mostraram um lodo altamente concentrado, formado por flocos compactos, com muita matéria orgânica e poucas bactérias filamentosas, não interferindo na sua capacidade de sedimentação.

O zooplâncton apresentou-se composto de grande quantidade de protozoários ciliados (fixos, rastejantes e livres), rotíferos, e amebas nuas ou tecadas os quais foram observados por um longo período do monitoramento. Dentre os grupos recorrentes, citam-se: *Euglypha* sp., *Arcella* sp., *Vorticella* sp., *Epistylis* sp., *Rotatoria* sp., *Tocophyra* sp. e numerosos ciliados livres (Figure 32). Zooflagelados foram encontrados em poucas amostras, sendo sua ocorrência relacionada com condições instáveis de operação, lodo pobremente aerado ou estações em atividades recentes de operação (WARREN *et al.*, 2010).

Figura 32 – Microfotografias dos protozoários presentes no RBS2: (A) Ciliados livres entre as partículas de lodo ativado; (B) *Arcella vulgaris*; (C) *Vorticella convallaria* aderida aos flocos de lodo; (D) *Euglypha tuberculata*.



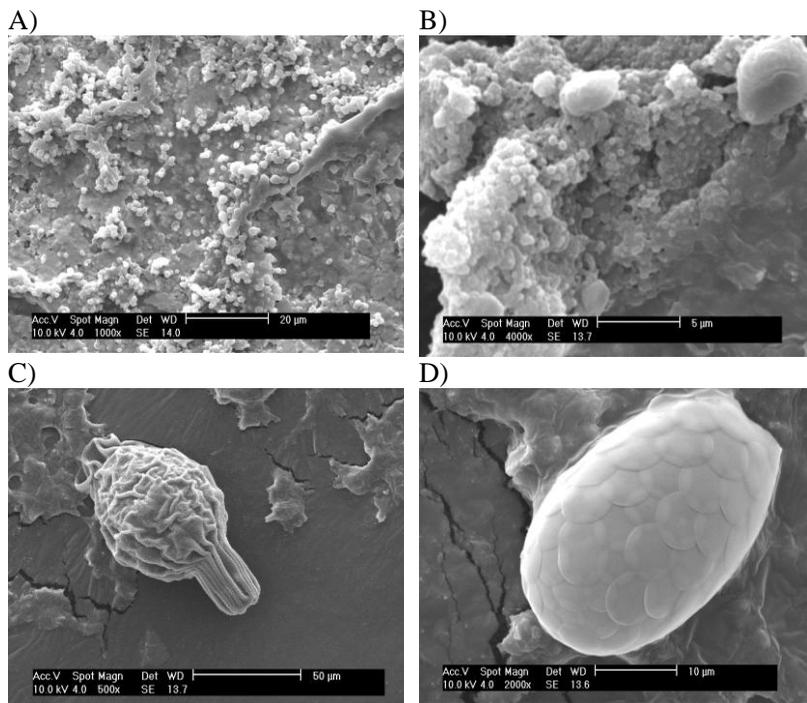
Os protozoários (ciliados e amebas) apresentam-se como um grupo heterogêneo capazes de colonizar uma grande variedade de sistemas de lodos ativados. Ocorrem geralmente em grande número,

constituindo cerca de 5% do peso seco dos sólidos suspensos, apresentando-se como organismos de vida livre, ligados aos flocos ou ainda, dispersos entre as partículas de lodo ativado (WARREN *et al.*, 2010). Estes organismos desempenham um importante papel nestes sistemas uma vez que se alimentam principalmente de bactérias, e também de substâncias orgânicas e outros pequenos organismos. Através de seu comportamento alimentar, provocam uma redução do número de bactérias no meio, mantendo-as em alta taxa reprodutiva, levando a um aumento da renovação celular, rejuvenescendo-as, contribuindo assim nos processos de floculação, acarretando em uma melhoria na qualidade do efluente (MARTIN-CERECEDA *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2008). As amebas nuas apresentam maior taxa de crescimento quando comparadas aos ciliados e rotíferos; ciliados apresentam movimentos rápidos tornando-os hábeis para obter alimentos enquanto os rotíferos se apresentam como os mais lentos. A ocorrência de amebas tecadas, por sua vez, está frequentemente ligada a estabilidade de sistemas de baixa carga (idade do lodo elevada), resultando em uma boa qualidade do efluente (CANLER *et al.*, 1999).

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em amostras providas do lodo a fim de melhorar a visualização e a compreensão da sua composição microbiana (Figura 33). As imagens indicaram presença de flocos bacterianos, com um grande número de células em forma de cocos irregularmente arranjados (Figura 33 A e B). Além disso, foi possível identificar organismos zooplancônicos vinculados ao lodo como ciliado pedunculado (Figura 33 C) e *Euglypha tuberculata* (Figura 33 D). De acordo Canler *et al.* (1999) a presença de *Euglypha tuberculata* indica um sistema de tratamento com ou sem nitrificação, alimentado com baixa carga, com aeração prolongada ou, pelo menos, suficiente. A densidade destes organismos diminui quando a qualidade da água se deteriora. A importância dos ciliados pedunculados no processo de purificação, em tratamento de águas residuárias se deve ao seu nicho ecológico, uma vez que se alimentam de bactérias dispersas, eliminando-os do meio. Assim, sua presença pode ser tomada como indicador de qualidade do efluente (SAMARAS *et al.*, 2009).

Figura 33 – Fotografias obtidas por MEV da comunidade microbiana no RBS2.

A e B) Colônias bacterianas; C) Ciliado pedunculado e D) *Euglypha* sp.



4.2.4 Análise de FISH e da atividade de organismos OAP/OAPD

A técnica FISH foi aplicada para identificação de alguns gêneros bacterianos presentes no interior do reator envolvidos no metabolismo de N e P. Quantidades elevadas (85% de células coradas com DAPI) do domínio Bacteria foram encontradas, indicando grande atividade metabólica das bactérias presentes. A comunidade bacteriana era formada principalmente por cocos arranjados em agregados coloniais e poucas bactérias filamentosas. Na Tabela 6 são apresentadas as sondas utilizadas (as quais tiveram sinal positivo), seus respectivos grupos alvo e a média (em porcentagem) de incidência.

Tabela 6 – Detalhes dos resultados positivos obtidos pelo técnica de FISH para as diferentes sondas utilizadas, grupos alvo e média de incidência para todo o período monitorado no RBS 2.

Sonda	Grupo Alvo	Média (%)
EUB _{mix}	Maioria Bacteria, Planctomicetales e Verrucomicrobiales	85
NSO 190	Betaproteobacteria (BOA)	25
NEU 653	<i>Nitrosomonas</i> sp.	15
Ntspa 662	<i>Nitrospira</i> sp.	20
NIT 3	<i>Nitrobacter</i> sp.	5
DSV	Bactérias sulfato redutoras - Desulfovibrionaceae	<5
OAP _{mix}	Candidatus <i>Accumulibacter</i>	25

Como pode ser verificado na Tabela 6, bactérias nitrificantes foram encontradas em diferentes porcentagens sendo 25% para subclasse de Betaproteobacteria (com *Nitrosomonas* spp. representando 15% do total de células coradas com DAPI), 10% para subclasse de Alfaproteobacteria (com *Nitrobacter* spp. representando 5% das células coradas com DAPI) e 20% para o gênero *Nitrospira* spp. oxidante de nitrito. De acordo com Denecke *et al.* (2012), embora a concentração de nitrito no reator fosse muito baixa, esta, já pode ser suficiente para possibilitar o crescimento de *Nitrospira* spp. Organismos dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira* apresentam-se como nitrificantes dominantes em sistemas de lodos ativados, sendo geralmente, somente uma pequena parcela restante correspondente à *Nitrobacter* spp.

Desulfovibrio foi encontrada em rara quantidade (menos de 5% das células coradas com DAPI). Ainda que em baixa quantidade, a presença destas bactérias redutoras de sulfato pode ser explicada através do estudo de Canfield e DesMarais (1991) onde é apresentada a capacidade de ocorrer a redução dissimilatória do sulfato, mesmo na presença de oxigênio, contradizendo a visão clássica de que a redução do sulfato é um processo estritamente anaeróbio.

Membros OAP (Candidatus *Accumulibacter*) foram encontrados em grande número, com média de 25% das células coradas com DAPI. O desenvolvimento de OAP torna-se favorecido neste sistema devido às suas vantagens competitivas sobre demais microrganismos, incapazes de acumular poli-P, garantindo assim

reserva energética para os períodos de escassez de substrato, tal como ocorre em sistemas com baixa relação A/M.

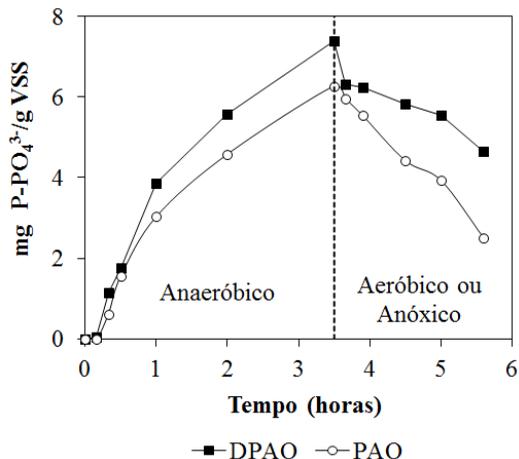
A Figura 34 sumariza a evolução da atividade OAP/OAPD. O ensaio mostrou que quando em condições anaeróbias o fósforo é liberado para o meio (tanto no ensaio para OAP quanto OAPD) e na fase aeróbica (OAP) a captação do fósforo foi maior que na fase anóxica (OAPD). A percentagem da atividade das OAPDs (razão OAPD/OAP) foi de 70%, conforme apresentada na Tabela 7. Monclús *et al.* (2010) encontrou para a captação de fósforo, a razão OAPD/OAP, após 150 dias ($13,6 \text{ mg P g}^{-1} \text{ VSS h}^{-1}$) de 41%, a qual foi relativamente constante ao longo de todo o período experimental.

Desta forma, a atividade das OAPDs encontrada neste estudo foi acima do esperado, justificando os baixos valores de nitrato registrados no efluente, uma vez que o nitrato produzido durante os processos de nitrificação era simultaneamente consumido por esses organismos.

Tabela 7 – Comparação entre as diferentes taxas de fósforo liberado e captado durante os ensaios de bancada, por organismos OAP e OAPD.

Tempo (h)	Taxa de captação de fósforo		
	Aeróbia $\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ SSV h}^{-1}$	Anaeróbia $\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ SSV h}^{-1}$	Razão OAPD/OAP
4:30	15,6	12	0,8
5:00	13,2	9,4	0,7
Média	14,4	10,7	0,7
Global (3:30 – 5:30)	14,9	9,2	0,6

Figura 34 – Captação de fósforo durante ensaios de bancada com lodo do SBR2 em condições anaeróbias e aeróbias (SSV=2,5 e 2,8 g L⁻¹, respectivamente).



Este fato associado com a baixa ocorrência de organismos desnitrificantes, como discutido na análise FISH, sugere que a maior parte da remoção de nitrato foi devida à ação de organismos OAPDs. Estes resultados podem auxiliar nos procedimentos operacionais, uma vez que apenas uma alimentação por ciclo já é suficiente para o fornecimento de substrato para a biomassa desnitrificante.

4.2.5 Identificação das bandas do DGGE e análise filogenética

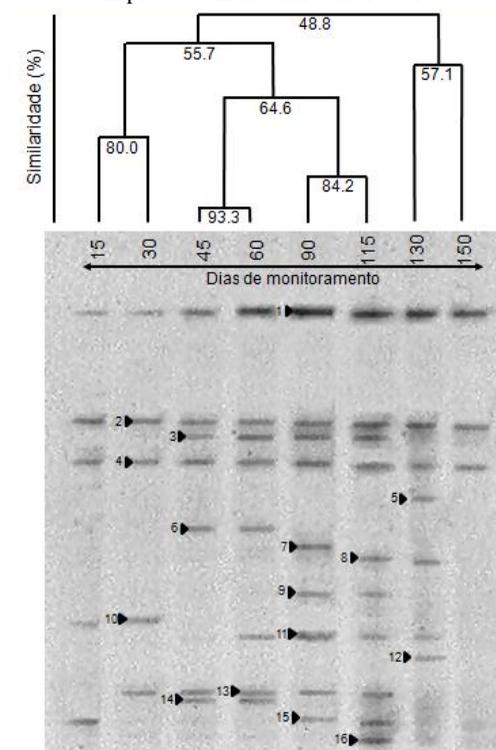
Mudanças na composição da comunidade bacteriana do RBS2 foram investigadas através de técnica de PCR-DGGE. A Figura 35 mostra o padrão de bandas típico de um gel de DGGE, com as impressões moleculares referentes ao período monitorado. Cada banda corresponde a uma espécie microbiana dominante assim, quanto mais bandas, maior a diversidade e quanto mais intensa, maior a abundância do grupo na amostra. Em geral, a análise de DGGE mostrou mudanças no perfil de bandas ao longo do tempo de tratamento biológico, bem como variações na sua intensidade da banda (por exemplo, amostras do dia 15 a 150, banda 1).

Apenas as bandas 1, 2 e 4 estiveram presentes em todas as amostras, apresentando, no entanto, variação na sua intensidade. A banda 1 apresentou aumento de intensidade entre os dias 15 e 90

decaindo conseqüentemente entre os dias 115 a 150. As demais bandas observadas (3 e de 5-16) apareceram em diferentes períodos, não estando necessariamente presentes ao longo de todo período monitorado, indicando mudanças na composição microbiana do reator. Desta forma, sugere-se que a biodiversidade tenha sido afetada diretamente pela qualidade do aflúente no RBS, uma vez que as amostras foram recolhidas a partir de um mesmo ponto do reator.

Conforme mostrado na Figura 35, um total de 13 diferentes bandas foram observadas no perfil do DGGE sendo estas, posteriormente, excisadas do gel e sequenciadas. Dentre as bandas sequenciadas, quatro bandas apresentaram resultados de DNA ambíguos, tendo sido removidas da análise filogenética. A afiliação filogenética das sequências após encontradas as regiões de similaridade através da pesquisa BLAST, são apresentados na Tabela 8. Os microrganismos foram taxonomicamente classificados no Domínio Bacteria, com similaridade mais próxima com organismos não cultivados para todas as bandas analisadas.

Figura 35 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados do 16S rDNA pela técnica de DGGE utilizando DNA genômico extraído do licor misto das amostras do RBS2, ao longo dos dias de monitoramento. Análise de agrupamento apresentada como um dendograma mostrando a similaridade entre diferentes impressões moleculares no reator.



Todas as bandas sequenciadas apresentaram semelhanças com microrganismos previamente encontrados em lodos ativados ou em amostras ambientais. Dentre os grupos classificados, grupos bacterianos envolvidos na remoção de nutrientes como N e P foram encontrados nas bandas 2 e 4, e semelhantes as relatadas em meio anaeróbico foram encontradas na banda 9. Este resultado pode ser devido às condições de baixo OD registrado no período estudado ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabela 8 – Resultados encontrados na pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE do RBS2.

Bandas	Grupos Relacionados (Número de Acesso)	% *	Fonte
1	Bactéria não cultivada gene 16S rRNA clone TB127-25 (AB196115)	98	Bactérias em lodo ativado com água de descarga de banheiro
2	Bactéria não cultivada <i>Chlorobi</i> clone OMBR76 16S rRNA (DQ119094.1)	96	Bactérias em A/O reator de membranas com remoção de nitrogênio
3	Bactéria não cultivada de solo clone S084 gene 16S rRNA (AY037607)	90	Bactérias de solo de agricultura
4	Bactéria não cultivada Betaproteobactéria (SBR1011)	94	Bactérias em RBS com organismos acumuladores de fosfato
6	Bactérias não cultivada, gene parcial 16S rRNA, clone DGGE3 (AJ548781)	93	Amostra ambiental
9	Bactéria não cultivada clone N1_2_4797 gene 16S rRNA (JQ131477)	97	Bactérias de digestor anaeróbico em escala real.
11	Bactéria não cultivada clone J3_2_777 gene 16S rRNA (JQ110669)	91	Amostra ambiental
13	Bactéria não cultivada clone F1Q32TO05GHG5F 16S rRNA (GU489669)	95	Bactérias de sistema de lodo ativado de biofilme em escala real.
15	Bactéria não cultivada clone F1Q32TO04EN7LK 16S rRNA (GU761347)	92	Bactérias de sistema de filtração por membranas para tratamento de água potável

* (%) – Refere-se à porcentagem de similaridade.

A análise por agrupamento foi utilizada sob a forma de dendograma, a fim de apresentar a porcentagem de semelhança entre os diferentes perfis de DGGE, conforme apresentado na Figura 33. Observou-se que no período entre 45 e 60 dias, a comunidade microbiana do RBS apresentou máxima similaridade, com valores de semelhança chegando a 93,3% durante este período seguido por 80% de similaridade durante o período compreendido entre 90 e 115 dias. Os valores de similaridade mínima ocorreram no período final de monitoramento com similaridade de 57,1% entre os dias 130 e 150. Esta variação significativa da comunidade microbiana no reator durante o período de monitoramento pode ser atribuída às alterações

das concentrações afluentes, como também a problemas operacionais como queda de energia ou a troca de aeradores. Mudanças no perfil e aumento da diversidade microbiana foram observadas entre os dias 90 e 130, enquanto que no dia 150 observou-se menor diversidade e baixa similaridade (57,1%) foi observada entre este, e o período anterior.

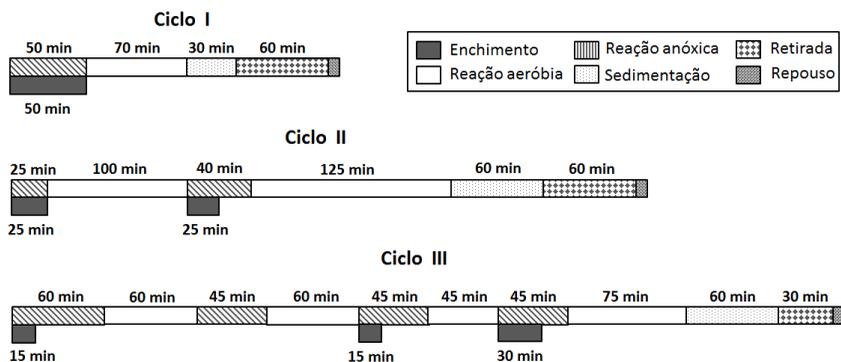
4.2.6 Conclusões

Este estudo apresentou resultados de eficiência do RBS2 em escala real e sua viabilidade no tratamento de esgoto sanitário. O reator apresentou taxas de remoção satisfatórias para as principais variáveis de qualidade analisadas, incluindo 83% para DQOS, 60% para o $N-NH_4^+$, 70% para SST e 80% para SSV, mesmo com variações das cargas aplicadas e a baixa relação C/N (3 g-DQO/gN). A microscopia evidenciou um lodo concentrado, composto majoritariamente por amebas nuas e tecadas, ciliados e rotíferos. Técnicas moleculares foram utilizadas como ferramentas de verificação da composição bacteriana do lodo, revelando grandes variações na diversidade microbiológica ao longo do período monitorado, devido às variações na qualidade do afluente. No entanto, não houve quedas significativas na remoção das principais variáveis de qualidade. Este fato vai ao encontro da concepção de que a biomassa, em sistemas RBS, é capaz de passar por processos graduais de aclimação, modificando a estrutura da comunidade microbiológica e garantindo a estabilidade do processo, mesmo quando há baixa relação A/M. A baixa concentração de OD pode explicar a alta incidência de organismos OAPDs (razão OAPD/OAP média de 70%), que atuaram no processo de desnitrificação.

4.3 ARTIGO 3: O PAPEL DOS MICRORGANISMOS NO RBS2 QUANDO OPERADO SOB CONDIÇÕES DE BAIXA AERAÇÃO E DIFERENTES TEMPOS DE CICLO - ESTÁGIO III

Neste estudo, o RBS2 foi avaliado por meio de uma análise comparativa entre ciclos operados com três diferentes tempos: 3:30 horas (Ciclo I), 6:50 horas (Ciclo II) e 8:50 horas (Ciclo III), conforme apresentado na Figura 36 e protocolo de amostragem descrito no item 3.2. A atividade e a estrutura da comunidade microbiana foram determinadas conforme descrito nos itens 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7, e as condições operacionais do reator por variáveis físico-químicas (item 3.3), de forma a verificar os principais fatores que podem contribuir para melhorar a atividade dos processos bioquímicos e, com isso, a qualidade do efluente tratado. Outros tempos de ciclo também foram observados, variando de 2:30 horas a 17:00 horas. No entanto, no mínimo 3 repetições (para que fossem estatisticamente relevantes) com o mesmo tempo de ciclo foram obtidas apenas para estes três tempos estudados.

Figura 36 – Esquema operacional dos ciclos monitorados.



4.3.1 Remoção de matéria orgânica e nutrientes

O RBS2 apresentou eficiência de remoção satisfatória para os parâmetros analisados produzindo efluente que atende aos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira. Ao longo de todos os ciclos monitorados, o reator apresentou baixa concentração de OD, com média de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. No entanto o desempenho do reator não foi

afetado. As cargas aplicadas são apresentadas na Tabela 9. O volume de enchimento total por ciclo foi de 26,7 m³. A proporção de C (DQOT): N (NTK): P (Ptotal) foi de 150:3,7:0,7 para o Ciclo I, 150:1,8:0,3 para o Ciclo II e 150:4,6:0,7 para o Ciclo III.

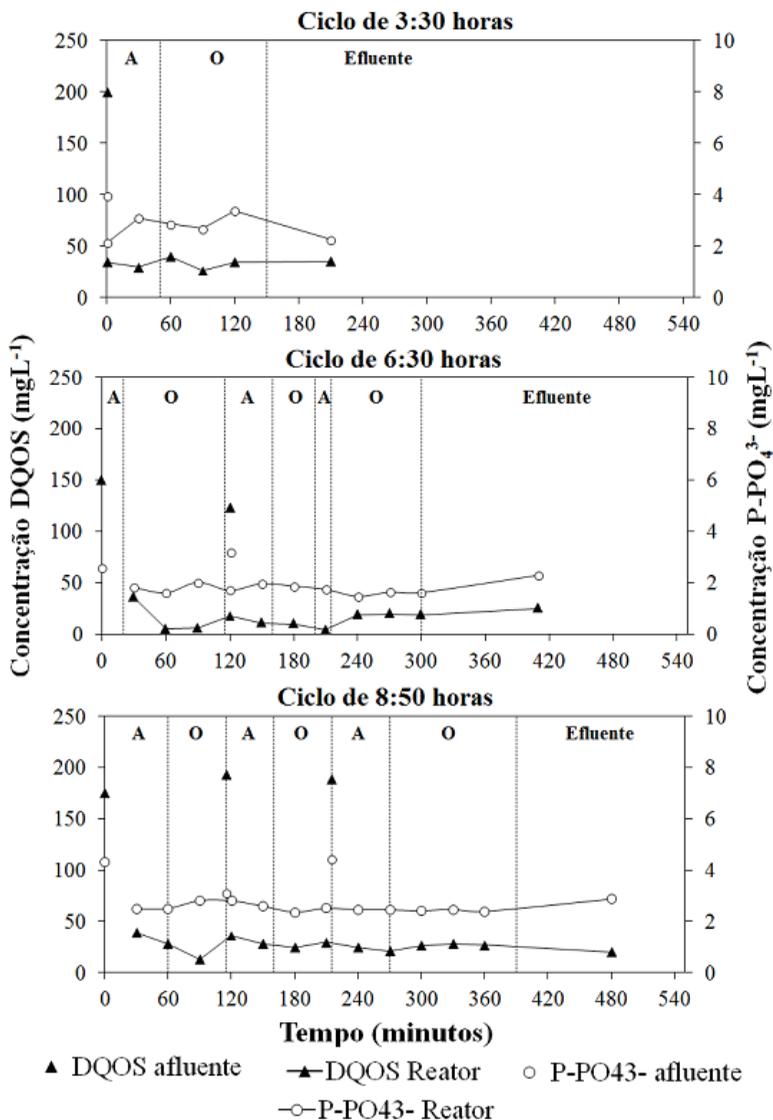
Tabela 9 – Cargas aplicadas no RBS2 para cada ciclo monitorado.

Variável	Carga Aplicada (kg m ⁻³ d ⁻¹)		
	Ciclo I	Ciclo II	Ciclo III
DQO	3,42	3,25	1,05
DQOS	0,21	0,07	0,08
NH ₄ ⁺ -N	0,07	0,03	0,02
NTK	0,09	0,04	0,03
PO ₄ ³⁻	0,004	0,002	0,002

A remoção de DQOS média foi consistentemente elevada (acima de 81%) para todos os tempos de ciclos, conforme apresentado na Tabela 9. Houve pouca variação na concentração afluente de DQOS em diferentes ciclos monitorados (concentração média máxima para o Ciclo I, seguido pelo III e II) não interferindo na eficiência de remoção, a qual se manteve com valores próximos para todos os ciclos. A Figura 37 mostra o perfil de variação na concentração de DQOS e P no RBS durante os ciclos de I, II, e III. Observa-se que, depois de entrarem no reator, a concentração afluente é reduzida rapidamente durante a primeira fase óxica. Este fato foi observado até mesmo no Ciclo I onde o volume de enchimento total é adicionado ao reator ao final de apenas uma alimentação, demonstrando o potencial desses sistemas em remover DQO bem como capazes de resistir a variações de carga, mantendo a estabilidade do processo.

Baixas concentrações afluentes de fosfato foram registradas ao longo de todos os ciclos monitorados (abaixo de 4 mg L⁻¹). Além disso, as remoções de fosfato em ambos, afluentes e efluentes, foram muito próximas, com um máximo de 50%, 33%, e 25% para os ciclos de I, II, e III, respectivamente. Estas remoções pouco satisfatórias estão relacionadas às baixas concentrações de OD no reator as quais inibem a absorção deste íon por organismos OAP, bem como à elevada quantidade de compostos orgânicos (DQOS). Organismos OAP rapidamente assimilam os substratos orgânicos (utilizados na síntese de PHA) ocorrendo a degradação do polifosfato anteriormente acumulado, com consequente liberação de ortofosfato no meio líquido (SEVIOUR *et al.*, 2003).

Figura 37 – Concentração de DQOS e P-PO₄³⁻ no RBS2 durante os Ciclos I, II e III. “A” representa o período anóxico e “O” o período óxico.

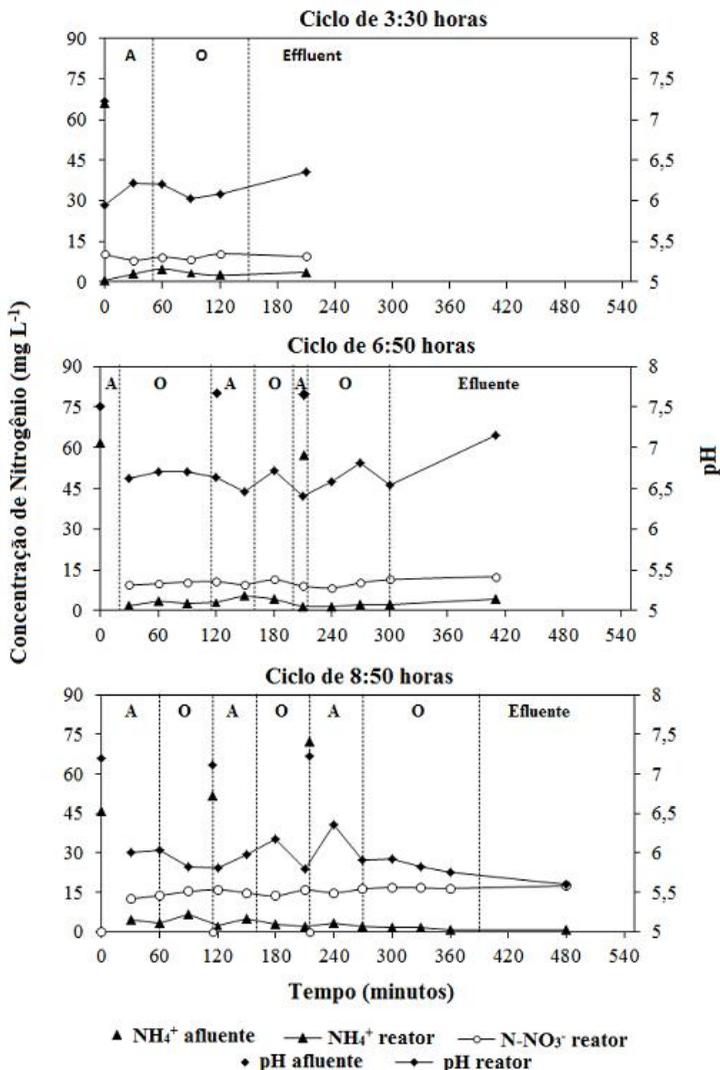


As concentrações dos compostos de N medidos são apresentadas na Tabela 10. Poucas diferenças nas concentrações afluentes e efluentes foram encontradas para os diferentes ciclos. A maior parcela de NTK medida foi encontrada como NH_4^+ . Adicionalmente, a média de remoção de N total (TKN+ $\text{NO}_x\text{-N}$) apresentou valores acima de 60% e pode ter sido afetado pelas baixas concentrações de OD. No entanto, a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal foi elevada (acima de 93%) ao longo do período estudado e para todos os ciclos (Figura 38).

Tabela 10 – Condições dos ciclos e desempenho do RBS2. Valores apresentados com média \pm SD. ND = não detectado.

Variável	Ciclo I n=6	Ciclo II n=4	Ciclo III n=5
Afluente			
DQOS	199 \pm 30,8	136 \pm 42,1	186 \pm 36,7
NTK	80 \pm 12,1	72 \pm 10,2	95 \pm 13,6
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	66 \pm 7,2	60 \pm 6,3	56 \pm 8,6
$\text{NO}_2^-\text{-N}$	ND	ND	ND
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	ND	ND	ND
PO_4^{3-}	4 \pm 1,2	3 \pm 1,5	4 \pm 1,1
Alcalinidade	262 \pm 42	188 \pm 47	266 \pm 28
DQOS/NTK	2,5	1,8	2,0
Efluente			
DQOS	35 \pm 8,3	25 \pm 10,1	20 \pm 9,6
NTK	19 \pm 5,3	11 \pm 7,9	11 \pm 6,2
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	3 \pm 2,6	4 \pm 1,6	1 \pm 0,9
$\text{NO}_2^-\text{-N}$	ND	ND	ND
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	9 \pm 3,3	6 \pm 4,0	9 \pm 5,1
PO_4^{3-}	2 \pm 1,9	2 \pm 1,6	3 \pm 2,6
Alcalinidade	28 \pm 12	63 \pm 19,3	20 \pm 11,5
DQOS/NTK	1,8	2,3	1,5
Remoção Carga aplicada (%)			
DQOS	82	81	89
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	95	93	98
NTK	76	85	86
NTotal	61	76	79

Figura 38 – Concentração de Nitrogênio-N e pH no RBS2 durante os Ciclos I, II e III. “A” representa o período anóxico e “O” o período óxico.



A concentração de nitrato aumentou com o tempo de ciclo; assim, concentrações efluentes de 41 mg L⁻¹, 42 mg L⁻¹ e 67 mg L⁻¹ foram observadas nos Ciclos I, II e III, respectivamente, enquanto o

pH médio foi de 6,1; 6,7 e 6,0 para os Ciclos I, II e III, respectivamente. De acordo com a literatura científica (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999; RITTMAN e MCCARTY, 2001; METCALF & EDDY, 2003), o pH recomendado para os processos de nitrificação deve estar entre 7,0 e 7,8, quando o pH atinge valores abaixo de 6,0 a atividade de bactérias nitrificantes é inibida. O pH no RBS2 manteve-se abaixo do mínimo necessário para a nitrificação. No entanto, pressupõe-se que não houve inibição da nitrificação, uma vez que houve considerável redução na concentração de amônia, bem como o pH apresentou-se numa faixa que previne sua volatilização.

De acordo com Hoffmann *et al.* (2007), as águas residuárias brasileiras apresentam frequentemente baixa alcalinidade, com média de 110-170 mg CaCO₃ L⁻¹ (2,2-3,4 mmol HCO₃ L⁻¹). Neste estudo, a alcalinidade do afluente esteve acima da média variando entre 262, 188 e 266 mg CaCO₃ L⁻¹ para os Ciclos I, II e III, respectivamente. A alcalinidade não foi um fator limitante para a nitrificação para todos os ciclos, uma vez que seu consumo não excedeu 7,14 mg CaCO₃/ mg N-NH₄⁺ oxidada. O consumo de alcalinidade pela nitrificação ocorre porque 1 mol de N-NH₄⁺ produz exatamente 2 mols de H⁺ (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999).

A amônia afluente foi oxidada (acima de 93%) na primeira hora da fase óxica em todos os três ciclos. No efluente, somente uma pequena porção de amônia afluente corresponde ao nitrato (média de 13%), não tendo sido detectado nitrito. Assim, o reator mostrou evidência de processo NDS, uma vez que mesmo em baixas concentrações de OD no reator, a amônia foi removida e foram obtidas baixas concentrações de NO_x-N no efluente (JU *et al.*, 2007). Esta desnitrificação foi provavelmente favorecida pela alta relação C:N (39C:1N; 82C:1N e 33C:1N para ciclos de I, II e III, respectivamente). De acordo com Ryu e Lee (2009), a desnitrificação é favorecida quando o carbono orgânico está disponível, sendo a relação 10C:1N considerada suficiente para uma desnitrificação completa.

4.3.2 Caracterização da biomassa

O tempo de retenção do lodo no RBS2 foi de aproximadamente 131 dias para os ciclos I, 105 dias para os ciclos II e 89 dias para os ciclos III. Os valores de SST no licor misto variaram entre 3 g L⁻¹ (ciclo I e II) e 4 g L⁻¹ (ciclo III). Desta forma, durante todo período

monitorado, observou-se um elevado tempo de retenção e baixa frequência de descarga do lodo.

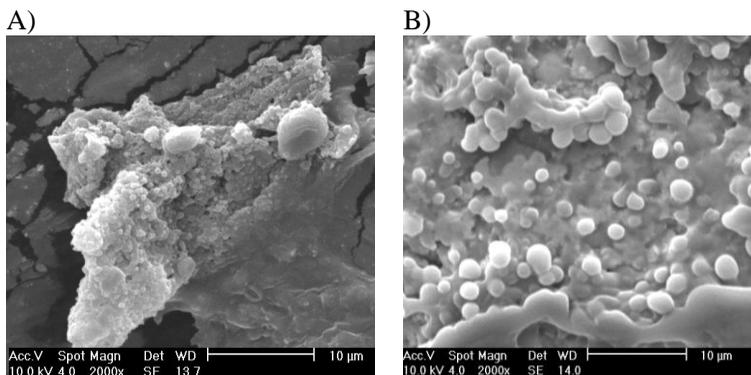
De acordo com Mohammadi (2011), em sistemas de tratamento de águas residuárias onde há falta de descarga de lodo aliado ao elevado tempo de retenção celular, ocorre um aumento da concentração da biomassa no tanque de aeração, diminuindo a relação A/M, uma vez que a concentração de entrada de substância no tanque de aeração é praticamente constante, aumentando assim a população de microrganismos e diminuindo a proporção de substrato para cada célula. No entanto, como já visto no item 4.3.1, embora o afluente tenha apresentado poucas variações de concentração de entrada, o fato de o reator apresentar alimentação escalonada, pode ter levado à ocorrência de uma elevada relação A/M.

Neste sistema, a relação A/M aumentou com a diminuição da concentração de SSV, variando entre 1,32 g DQO/g SSV d para o ciclo I, 1,35 g DQO/g SSV d para o ciclo II e 1,57 g DQO/g SSV d para o ciclo III, valores estes muito elevados, comparados ao intervalo padrão que é de 0,25 a 0,50 g DQO/g SSV d (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999). A relação SSV/SST durante todo o período monitorado foi de 81% para os ciclos de I e III, e 71% para o ciclo II.

4.3.3 Análise da diversidade microbiana

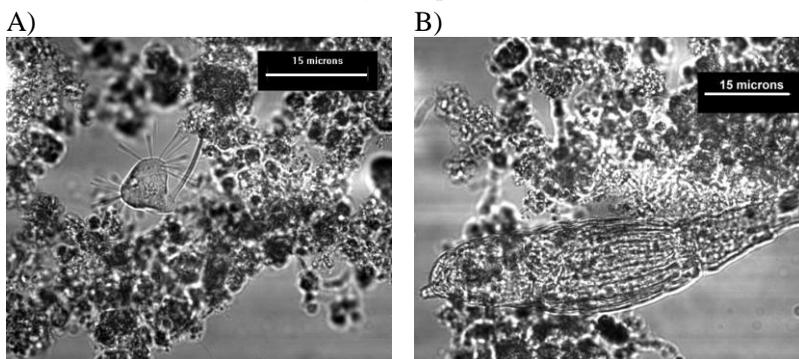
Observou-se pouca variação entre os diferentes tempos de ciclos estudados e as características físico-químicas e também microbiológicas do reator, uma vez que um determinado tempo de ciclo não era realizado sequencialmente, por um longo período. Desta forma, os diferentes tempos se intercalavam ao longo de um dia, por exemplo. Foi observado através de microscopia óptica e MEV que, para todos os tempos de ciclo, o lodo se apresentou altamente concentrado, constituído por flocos compactos, em arranjos irregulares, compostos de células em forma de cocos (Figura 39), ricos em matéria orgânica suspensa e particulada, com pouca presença de bactérias filamentosas.

Figura 39 – Fotografias obtidas por MEV da comunidade microbiana no RBS2 em um ciclo de 8:50 horas. A e B) Colônias bacterianas constituídas na sua maioria por células em forma de cocos.



Quanto aos protozoários presentes, foram encontrados os mesmos microrganismos descritos no item 4.2.3. No entanto, houve variação na sua ocorrência, sendo recorrentes não apenas ciliados livres, mas também ciliados pedunculados, dentre os quais *Vorticella* sp. e *Tocophyra* sp., bem como houve um aumento na ocorrência de metazoários (rotíferos) (Figura 40).

Figura 40 – Microfotografias de microrganismos aderidos no lodo, presentes no RBS2: (A) *Tocophyra* sp. e (B) rotífero.



Dados dos testes respirométricos realizados em diferentes tempos de ciclos mostraram valores de TCO muito próximos ao longo de todo monitoramento. A TCO específica média para biomassa nitrificante e heterotrófica foi de 5,51 e 11,42 mg O₂ g SSV⁻¹ h⁻¹,

respectivamente. A concentração da biomassa ativa heterotrófica ($X_H = \text{mg DQO L}^{-1}$) foi de 113,2 mg DQO L⁻¹ (87,8% da biomassa do sistema global), enquanto que a biomassa ativa autotrófica ($X_A = \text{mg L}^{-1}$) foi de 15,76 mg DQO L⁻¹ (12,2% da biomassa do sistema global), indicando que o reator era composto principalmente de microrganismos heterotróficos.

A técnica FISH foi realizada para diferentes tempos de ciclos a fim de verificar a presença de organismos capazes de remover nutrientes como N e P. Quantidades elevadas de microrganismos do Domínio Bacteria (85% de células coradas com DAPI) foram encontradas, indicando elevada atividade metabólica. Os sinais obtidos com todas as sondas de oligonucleotídeos mostraram-se intensos, indicando alto conteúdo celular de rRNA. Na Tabela 11 são apresentadas as sondas utilizadas (as quais tiveram sinal positivo), seus respectivos grupos alvo e a média (em porcentagem) de incidência.

Tabela 11 – Detalhes dos resultados positivos obtidos pelo técnica de FISH para as diferentes sondas utilizadas, grupos alvo e média de incidência para todo os ciclos monitorados no RBS 2.

Sonda	Grupo Alvo	Média (%)
EUB _{mix}	Maioria Bacteria, Planctomicetales e Verrucomicrobiales	85
NOS 190	Betaproteobacteria (BOA)	10
NEU 653	<i>Nitrosomonas</i> sp.	5
Ntspa 662	<i>Nitrospira</i> sp.	10
NIT 3	<i>Nitrobacter</i> sp.	5
Ntspn 693	<i>Nitrospina gracilis</i>	5
OAG _{mix}	Candidatus <i>Competibacter phosphatis</i>	3
OAP _{mix}	Candidatus <i>Accumulibacter</i>	25

Conforme pode ser visualizado na Tabela 11, bactérias nitrificantes foram encontradas em diferentes porcentagens sendo 10% para subclasse de Betaproteobacteria (com *Nitrosomonas* spp. representando 5% das células coradas com DAPI), 10% para subclasse de Alfabroteobacteria (com *Nitrobacter* spp. e *Nitrospina gracilis* representando 5% das células coradas com DAPI) e 10% para o gênero *Nitrospira* spp., oxidantes de nitrito. De acordo com Denecke *et al.* (2012), embora a concentração de nitrito no reator fosse muito

baixa, esta, já pode ser suficiente para o crescimento de *Nitrospira* spp.

Microrganismos desnitrificantes *Thiobacillus* e *Thiobacillus denitrificans* não foram detectados em nenhum período do monitoramento e tempo de ciclo. Demais desnitrificante não foram concomitantemente avaliados.

Organismos acumuladores de glicogênio (OAG) foram detectados com baixa ocorrência, com média de 3% do total de células coradas com DAPI, em contraste com os OAP os quais apresentaram ocorrência de 25%. Estes resultados são inesperados, uma vez que o reator apresentava elevada relação C:N. De acordo com Liu *et al.* (1994), quando esgoto com baixo teor de fósforo é tratado em um sistema de lodos ativados sob condições anaeróbia-aeróbio, além da presença de OAP, pode também ser observado um crescimento considerável de OAG. No entanto, em uma análise comparativa sobre o consumo de glicogênio por organismos OAP e OAG, Zhou *et al.* (2008) mostraram que os OAP podem comportar-se como OAG sob condições limitantes de P, assim como são capazes de metabolizar o acetato sob condições anaeróbicas e estocarem PHA usando glicogênio como fonte de energia primária. Os membros OAP são também capazes, mas não todos, de realizar processos de desnitrificação (KONG *et al.*, 2004).

Devido à elevada incidência de OAP detectada através da técnica de FISH, testes de bancada foram realizados para mensurar a atividade específica de OAPD/OAP. O teste mostrou que sob condições anaeróbicas (OAP e OAPD), ocorre a liberação de P para o meio e na fase aeróbia (OAP) a absorção de P foi maior do que a fase anóxica (OAPD). A porcentagem de atividade OAPD (razão OAPD/OAP) foi de 72%. Esse valor está muito acima do encontrado por Monclús *et al.* (2010), que encontraram uma porcentagem média de 41%, após 150 dias de monitoramento utilizando biorreatores de membrana.

Desta forma, a quantidade de OAPDs encontrados neste estudo está bem acima do esperado, fato este que pode ser justificado pela capacidade desses organismos em utilizar nitrato ou nitrito como acceptor final de elétrons, ao invés do oxigênio, o qual é extremamente baixo neste reator. Este fato sugere ainda que grande parte dos processos desnitrificantes no RBS2 foi realizada devido à ação de OAPDs.

4.3.4 Conclusões

Neste trabalho foram apresentados os resultados de viabilidade do uso do RBS2 no tratamento de esgoto sanitário, operado sob diferentes tempos de ciclos (3:30 horas, 6:50 horas e 8:50 horas), baixas concentrações de OD ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$) e elevada relação C/N. As remoções de DQO e N (NTK e amônio) ocorreram nas primeiras horas do ciclo, indicando que o sistema funciona eficientemente em ciclos de duração inferior a 4 horas. O tempo total dos ciclos não interferiu consideravelmente na qualidade do efluente. A presença de organismos nitrificantes correspondentes aos membros do gênero *Nitrosomonas* e mais frequentemente para *Nitrospira* foi também verificada. A grande atividade de organismos OAPDs (relação OAPD/OAP média de 72%) medida foi responsável pelo processo de desnitrificação observado. Membros OAP apresentaram-se também com elevada ocorrência, no entanto, a remoção de P foi mediana, uma vez que esta é dependente de ajustes em fatores determinantes como concentração de OD e de matéria orgânica (DQOS).

4.4 ARTIGO 4: ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA E SUA INFLUÊNCIA NO DESEMPENHO DO RBS2 QUANDO OPERADO SOB CONDIÇÕES DE BAIXA E ALTA CARGA ORGÂNICA - ESTÁGIO II E III

Este artigo teve como objetivo investigar o funcionamento do RBS2 e seu desempenho no tratamento de esgoto sanitário quando operado sob duas formas de alimentação: com baixa e alta carga orgânica. Para tal, foram analisados os dados obtidos no Estágio II durante os meses correspondentes ao outono e inverno de 2011 e os dados do Estágio III; e as variáveis físico-químicas de remoção da matéria orgânica e nutrientes no esgoto tratado no reator, descritas no item 3.3. A estrutura da comunidade microbiana foi também avaliada utilizando-se diferentes ferramentas de identificação taxonômica, de forma que pudesse ser comparada e correlacionada sua constituição com a qualidade do efluente, conforme protocolos apresentados nos itens 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7.

4.4.1 Remoção de matéria orgânica e nutrientes

As cargas aplicadas durante os dois períodos monitorados para o RBS2 estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Cargas volumétricas aplicadas para os dois períodos monitorados no RBS2.

Conteúdo	Média \pm SD (kg m ⁻³ d ⁻¹)	
	Período 1	Período 2
DQOT	0,203 \pm 0,083	2,263 \pm 0,982
DQOS	0,074 \pm 0,030	0,152 \pm 0,063
NH ₄ ⁺ -N	0,018 \pm 0,009	0,051 \pm 0,013
NTK	0,025 \pm 0,010	0,066 \pm 0,040
PO ₄ ³⁻ -P	0,005 \pm 0,002	0,009 \pm 0,003

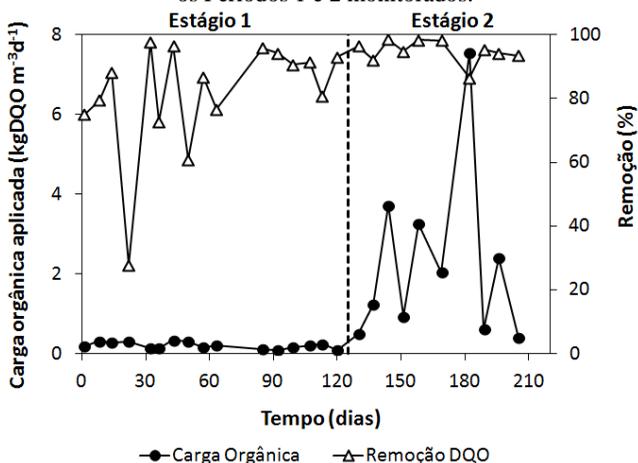
O período 1 de baixa carga, corresponde ao final do outono e inverno (quando ocorre uma diminuição da procura por locais turísticos e/ou litorâneos), que acarretou em uma considerável diminuição do número de habitantes por apartamento e, conseqüentemente do volume de esgoto gerado no condomínio residencial. O período 2 de alta carga foi observado durante os meses correspondentes ao verão quando houve um maior volume de esgoto

produzido e o reator funcionou com ciclos curtos (3:30 horas em sua maioria, exceto a noite quando os ciclos eram de 10 a 14 horas) devido ao maior número de habitantes por apartamento.

A matéria orgânica presente nos esgotos sanitários apresenta grande influência na composição das comunidades microbianas. O afluente apresentou para o Período 1 baixa relação C:N:P, estando em 150:18:3, enquanto para o Período 2 a relação foi de 150:5:1, que segundo Metcalf e Eddy (2003) caracteriza-o como esgoto sanitário padrão. Esta relação C:N do afluente é um dos parâmetros mais críticos para os processos de remoção de nitrogênio de sistemas de tratamento de esgotos uma vez que afeta diretamente aspectos funcionais da população microbiana, incluindo bactérias BOAs, BONs e desnitrificantes heterotróficas (TAN *et al.*, 2013).

Nos dois períodos estudados, o reator foi eficiente na remoção de DQO como pode ser visualizado nas Figuras 41 e 42, mesmo sendo operado com baixa concentração de OD (média de 0,3 mg L⁻¹). No segundo período houve a colocação de um segundo aerador, que possibilitou ao reator suportar a elevação da carga, sem colapsar o tratamento.

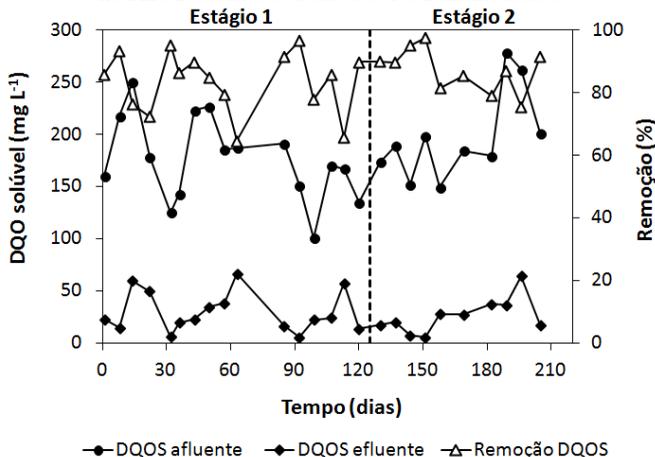
Figura 41 – Carga orgânica aplicada e a eficiência de remoção no RBS2, durante os Períodos 1 e 2 monitorados.



Observa-se pela análise da Figura 41 pouca variação na concentração da carga orgânica aplicada (em termos de DQO) no Período 1 estando cerca de 5 vezes menor que a carga orgânica

aplicada no Período 2, onde maiores variações foram verificadas. No entanto, maiores eficiências de remoção foram verificadas no Período 2 (média de 94%) quando comparado com o Período 1 (média de 82%).

Figura 42 – Concentração de DQOS afluente e efluente e eficiências de remoção, no RBS2 durante os Períodos 1 e 2 monitorados.



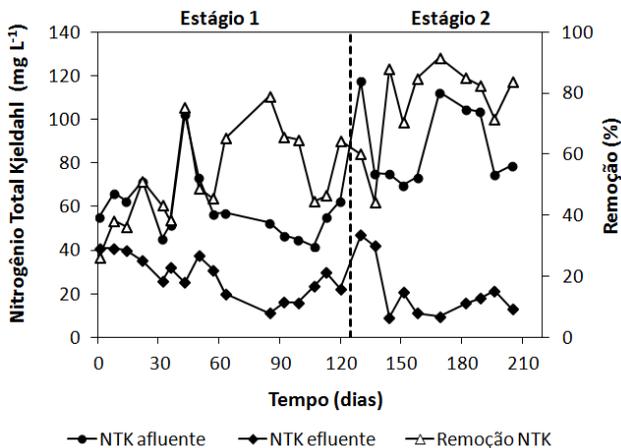
Para a DQOS, observa-se pela Figura 42 grandes variações nas concentrações afluentes e efluentes ao longo de todo período monitorado, com média de remoção para os Períodos 1 e 2 muito próximas (83% e 87%, respectivamente). Baixa eficiência de remoção para DQOS foi verificada no Período 1 em três momentos: no dia 22, 63 e 113 devido principalmente a instabilidade na concentração afluente, que era de 1054 mg L⁻¹ (DQOT) e 251 mg L⁻¹ (DQOS) no dia 22; e a um acúmulo progressivo de lodo observado até o dia 57, quando o SSV atingiu valor próximo à 9 g L⁻¹ com posterior retirada de lodo, igualmente ocorrendo no período entre os dias 95 a 113.

A maioria dos estudos efetuados em RBS utilizando reatores em escala piloto e efluente sintético, como por exemplo, Bassin *et al.* (2012b) e Denecke *et al.* (2012), ao quais relataram a eficiência dos RBSs na remoção de elevadas concentrações de DQO (acima de 90%), viabilizando esse sistema quanto a sua capacidade na remoção de carbono orgânico, sendo ainda capaz de absorver choques de carga orgânica, garantindo a estabilidade do processo biológico. Os resultados apresentados no presente trabalho utilizando esgoto sanitário revelaram a capacidade do reator para tratar DQO na maioria

do período de estudo com eficiência de remoção superior a 80% porém com um efluente com qualidade variando entre 5 e 65 mg L⁻¹ de DQOS.

A Figura 43 apresenta a variação na concentração e eficiência de remoção para NTK. Pela análise da figura, observa-se no Período 1 poucas variações nas concentrações afluentes (média de 59 mg L⁻¹) com valor acima da média apenas no dia 43, sendo registrado concentração afluente de 103 mg L⁻¹. A remoção para este período apresentou média de 52%. Verifica-se maiores valores afluentes (média de 89 mg L⁻¹) e maior eficiência de remoção (média de 76%) apesar das flutuações na concentração do esgoto bruto para o Período 2.

Figura 43 – Nitrogênio Total Kjeldahl afluente, efluente e eficiências de remoção.

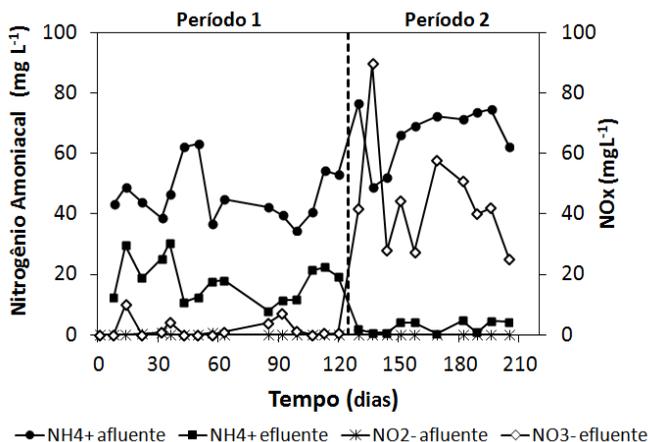


Na Figura 44, são apresentadas as variações nas concentrações das diferentes espécies de nitrogênio no reator, para os dois períodos monitorados.

Observa-se que basicamente todo NTK foi encontrado na forma de NH₄⁺ (Figuras 43 e 44). No Período 1 praticamente não houve formação de nitrato ou de nitrito, havendo no entanto remoção de amônia, em um sistema onde a média de OD era de 0,3 mg L⁻¹ e o pH médio no reator era de 6,5; indicando possível processo NDS. Neste caso, devido às baixas concentrações de oxigênio, ocorre a oxidação parcial da amônia sem produção de nitrato.

De acordo com Sliemers *et al.* (2005), baixas concentrações de OD inibem o desenvolvimento de bactérias autotróficas nitrificantes, deixando o papel de oxidante de amônio para os heterotróficos nitrificantes. Além disso, é importante destacar que devido à alimentação do reator ocorrer por etapas (escalonado), havia considerável fornecimento de substratos orgânicos ao longo de todo o ciclo, tornando-os disponíveis às bactérias heterotróficas as quais os utilizam como fonte de carbono e energia na conversão de amônio em N gasoso.

Figura 44 – Variações nas concentrações das diferentes espécies de nitrogênio, no RBS durante os Períodos 1 e 2 monitorados.



Já no Período 2, observa-se que também não houve produção de nitrito, porém ocorreu produção de nitrato (média de 44,7 mg L⁻¹), indicando processos de nitrificação completa. Estes resultados provavelmente devem-se ao fato que no Período 2, dois aeradores estavam em funcionamento, suprindo com maior concentração de oxigênio o reator, embora o valor médio de OD registrado manteve-se em 0,3 mg L⁻¹, indicando que maior concentração de oxigênio fornecida era rapidamente consumida nos processos biológicos.

A média de remoção de nitrogênio amoniacal foi de 60% e 96% para os Períodos 1 e 2, respectivamente, com média de N total (TKN + NOx-N) removido de 49% e 25%.

O pH médio do reator obtido ao longo dos Períodos 1 e 2 foi de 6,5 e 6,3, respectivamente, o que, de acordo com Van Haandel e

Marais (1999), não provocou inibição do processo de nitrificação, mantendo-se dentro de uma faixa de neutralidade e sem indução da volatilização de amônia. Ainda segundo os mesmos autores, a alcalinidade também não foi um fator limitante para a nitrificação já que não ultrapassou 7,14 mg CaCO₃/mg N-NH₄⁺ oxidado. A alcalinidade média afluente foi de 217 e 245 mg CaCO₃ L⁻¹ para os Período 1 e 2, respectivamente, estando acima da média relatada para águas residuais brasileiras (HOFFMANN *et al.*, 2007).

A concentração de P não apresentou uma clara tendência de remoção para os dois períodos monitorados, maiores variações de concentração afluente foram encontradas no Período 1 (mínima de 2,7 mg L⁻¹ e máxima de 17,1 mg L⁻¹) enquanto menores variações ocorreram no Período 2 (mínima de 7,9 mg L⁻¹ e máxima de 15,9 mg L⁻¹). Nos dias 22 e 137, a concentração afluente e efluente foi a mesma, não havendo remoção, enquanto no dia 92, a concentração efluente foi maior que a afluente, indicando relargagem de P para este ciclo. Tal fato provavelmente ocorreu devido à baixa concentração de OD no reator, que faz com que os OAP assimilem AGV de cadeias curtas, utilizando-as na síntese de PHA com consequente liberação de fosfato (NIELSEN e HANSEN, 2009). No entanto, para a maioria dos dias monitorados, a concentração efluente esteve abaixo da afluente com eficiência média de remoção de 50 e 32% para os Períodos 1 e 2, respectivamente.

Dessa forma, observa-se que houve maior remoção no Período 1 que no Período 2, corroborando com observações reportadas por alguns autores sobre o efeito da razão C:P na remoção de P, em que melhores desempenhos de remoção não estão restritas a sistemas que apresentam elevada razão C:P (CHONG *et al.*, 2013; OEHMEN *et al.*, 2005). Além disso, no Período 2 observou-se uma grande formação de nitrato no reator (média de 44,7 mg L⁻¹), o que de acordo com Hoffmann *et al.* (2004), pode ter inibido a remoção de P, uma vez que no processo de biodesfosfatação, o fósforo que foi liberado em condições anaeróbias é reabsorvido em uma quantidade maior em fases aeróbias quando não há presença de nitrato. No entanto, pelo fato do reator apresentar em seu interior zonas com diferentes concentrações de OD, as eficiências de remoção, ainda que baixas, podem ter sido explicadas em ambos os períodos.

Na Tabela 13 é apresentada uma síntese das cargas aplicadas e removidas para cada período monitorado, bem como suas respectivas porcentagens de remoção.

Tabela 13 – Carga de nutrientes e matéria orgânica aplicada, removida e respectivas eficiências de remoção, nos Períodos 1 e 2 no RBS2.

	Período 1				Período 2			
	DQOT	NTK	N-NH ₃	PT	DQOT	NTK	N-NH ₃	PT
Carga Aplicada (kg m ⁻³ d ⁻¹)	0,203	0,025	0,018	0,005	2,263	0,066	0,051	0,009
Carga Removida (kg m ⁻³ d ⁻¹)	0,043	0,012	0,007	0,002	0,153	0,015	0,002	0,006
Eficiência (%)	82	52	60	52	95	76	96	32

4.4.2 Caracterização da biomassa

O tempo de retenção celular médio foi de 183 e 50 dias para os Períodos 1 e 2, respectivamente. Na Figura 45 são apresentados os valores de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) para todo o período estudado. Os valores de SST variaram, com média de 4,3 g L⁻¹ e 3,7 g L⁻¹ para os Períodos 1 e 2, respectivamente. No entanto, a relação SSV/SST foi de 0,8 para ambos os períodos. A eficiência média de remoção de SST foi de 71% (Período 1) e 90% (Período 2). Grandes variações nas concentrações de SST e SSV no reator foram registrados no Período 1, enquanto menores oscilações foram encontradas no Período 2. Tal fato pode ser resultado da maior aeração (devido ao acionamento dos dois aeradores) no Período 2, resultando em um lodo mais homogêneo, o que levou à uma menor variação na sua concentração.

A relação A/M em g DQO/g SSV d, aumentou com a diminuição da concentração de SSV, variando entre 0,15 (dia 92) e 0,85 (dia 22) no Período 1; e 0,68 (dia 205) e 11,51 (dia 182) no Período 2, conforme apresentado na Figura 46. Valores médios de 0,4 e 4,0 g DQO/g SSV d, foram obtidos para os Períodos 1 e 2, respectivamente. De acordo com van Haandel e Marais (1999), o padrão médio varia entre 0,25 e 0,50 g DQO/g SSV d. O crescimento bacteriano se processa em decorrência da remoção de substrato. Assim, quanto mais alimento for assimilado, maior a taxa de crescimento bacteriano.

Figura 45 – Concentração de sólidos no reator e no efluente nos Períodos 1 e 2 monitorados no RBS2.

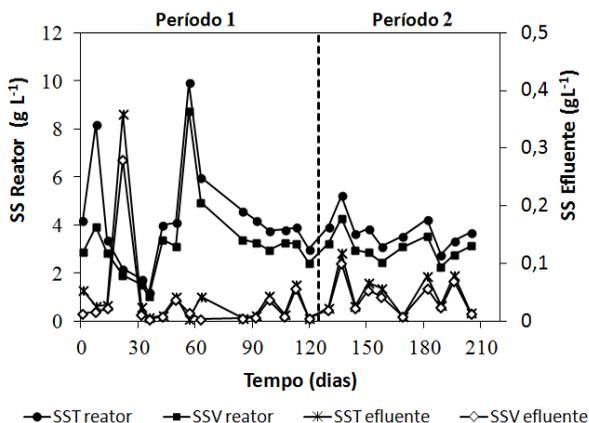
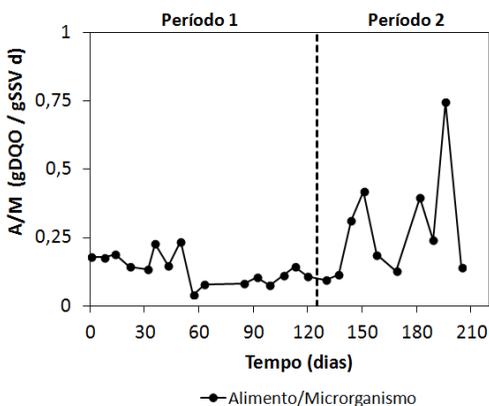


Figura 46 – Relação Alimento/Microrganismo (g DQO/g SSV d) nos Períodos 1 e 2 monitorados no RBS2.



4.4.3 Diversidade microbiana e análise filogenética bacteriana

Através do uso da microscopia óptica foi realizada a caracterização microbiológica do lodo para os Períodos 1 e 2. O lodo apresentou-se bastante concentrado, formado por flocos compactos dispostos em arranjos irregulares com predominância de bactérias em

forma de cocos, alguns bacilos e diplobacilos e poucas bactérias filamentosas. Dentre os protozoários e micrometazoários mais frequentemente encontrados, citam-se: ciliados (livres natantes, rastejantes e fixos), rotíferos e amebas nuas e/ou tecadas. Dentre as espécies recorrentes no Período 1, citam-se as amebas tecadas *Euglypha tuberculata* e *Arcella vulgaris*, muitos ciliados holotricos Colpodidos e hipotricos (*Aspidisca costata*), alguns ciliados pedunculados (*Vorticella* sp., *Tokophyra* sp.), rotíferos (*Rotaria* sp.) e muitos protozoários flagelados. No Período 2, estes microrganismos também estiveram presentes, porém com maior ocorrência de ciliados fixos e livres natantes, do que de amebas tecadas, quando comparados ao Período 1.

A importância desses protozoários e micrometazoários, bem como sua atuação e correlação com as condições de depuração quando presentes nos sistemas de tratamento, já foram previamente discutidos nos itens 4.1.3 e 4.2.4.

Visando determinar a composição de biomassa ativa no reator, ensaios respirométricos foram realizados periodicamente. A respiração microbiana aeróbia e a captação de OD (medida através da TCO) de um sistema estão intimamente ligados e esses valores são particularmente sensíveis a mudanças na atividade microbiana. A média da TCO específica ($\text{mg O}_2 \text{ g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para biomassa heterotrófica e nitrificante foi de 16,4 e 4,1 para o Período 1 e de 22,3 e 5,4 para o Período 2, com concentração da biomassa ativa heterotrófica ($X_H = \text{mg L}^{-1}$) e autotrófica ($X_A = \text{mg L}^{-1}$) similar para os dois períodos. A concentração de X_H no Período 1 foi de 171,3 mg DQO L^{-1} (89,6% da biomassa global do sistema) enquanto X_A foi de 19,9 mg DQO L^{-1} (10,4% da biomassa global). No Período 2 X_H foi de 144,6 mg DQO L^{-1} (88,5% da biomassa global do sistema) e X_A foi de 18,8 mg DQO L^{-1} (11,5 % da biomassa global). Tais valores obtidos para os dois períodos monitorados indicam que o reator era composto principalmente de microrganismos heterotróficos. Esta diversidade microbiana observada em sistemas de tratamento em escala real depende de fatores como a composição do esgoto (que deve ser fornecido com os nutrientes essenciais para o crescimento celular) e operação do sistema. No entanto, os fatores de controle que determinam essa diversidade ainda são pouco compreendidos. Sabe-se que os microrganismos nitrificantes crescem mais lentamente quando comparados aos heterotróficos, uma vez que os processos de oxidação de compostos inorgânicos apresentam um baixo rendimento

energético, tornando-os ainda mais sensíveis as variações destes fatores (DAIMS *et al.*, 2009; SEVIOUR, 2010).

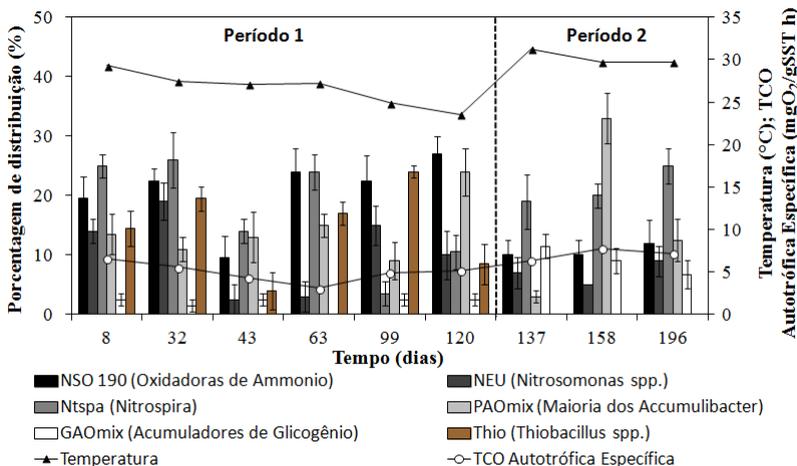
A técnica FISH foi realizada para identificar alguns dos gêneros bacterianos envolvidos na remoção biológica de N e P no reator. Em todo o período monitorado, verificou-se uma grande quantidade de microrganismos pertencentes ao Domínio Bactéria (mais de 80% de células coradas com DAPI), indicando elevada atividade metabólica destas, de acordo com Amann *et al.* (1997). Na Figura 47 são apresentadas as porcentagens de ocorrência dos principais grupos bacterianos monitorados ao longo dos dois períodos operacionais e sua correlação com a temperatura (°C) e atividade da biomassa autotrófica específica ($\text{mg O}_2 \text{g}^{-1} \text{SST h}^{-1}$).

Observa-se pela análise da Figura 47 que bactérias nitrificantes foram encontradas com grandes variações na sua porcentagem ao longo de todo período monitorado. No Período 1, o grupo das betaproteobactérias oxidadoras de amônio (BOA) dentre as quais, *Nitrosomonas* spp, foram encontradas em elevada concentração, quando comparada com o Período 2. No entanto, no Período 2, observa-se um aumento considerável na concentração de bactérias oxidadoras de nitrito (BON) do gênero *Nitrospira* spp, favorecendo o acúmulo de nitrato no reator.

A respirometria mostrou variação na atividade da biomassa ativa autotrófica específica, no Período 1, diminuindo com a temperatura, passando de 6,63 para 3,1 $\text{mg O}_2 \text{g}^{-1} \text{SST h}^{-1}$ quando a temperatura caiu de 29 para 25°C. No Período 2 a atividade manteve-se constante (em torno de 7 $\text{mg O}_2 \text{g}^{-1} \text{SST h}^{-1}$).

O gênero *Thiobacillus* pôde ser verificado ao longo do Período 1, enquanto no Período 2, sua ocorrência não foi observada. Tal fato sugere que, no Período 1, a ocorrência do processo NDS tenha sido possibilitado pela presença desses microrganismos desnitrificantes. No Período 2 houve acúmulo de nitrato e baixa ocorrência de desnitrificação.

Figura 47 – Distribuição dos grupos bacterianos analisados pela técnica de FISH no RBS2 e sua correlação com a temperatura (°C) e biomassa autotrófica ativa específica (mg O₂ g⁻¹ SST h⁻¹) ao longo de todo período monitorado.



Os organismos OAP foram detectados ao longo de todo o período monitorado, com maior amplitude de variação no Período 2, com elevada incidência no dia 158 (representando 32% das células coradas com DAPI). No entanto, baixa eficiência de remoção de fósforo foi encontrado nesse período, estando até mesmo abaixo da média registrada no Período 1. Esta alta incidência de OAP no período 2, porém baixa eficiência de remoção, pode ser justificada pela elevada concentração de nitrato no reator observada no Período 2 (média de 44,7 mgL⁻¹), que pode ter prejudicado a atuação das bactérias OAP na remoção do fosfato.

Organismos acumuladores de glicogênio (OAG) foram também observados em quase todos os períodos monitorados, porém com rara ocorrência no Período 1 enquanto no Período 2, atingiram uma média de quase 10%. De acordo com Nielsen e Hansen (2009), esses microrganismos geralmente coexistem com OAP, sendo capazes de captar cadeias curtas de ácidos graxos e/ou glicose com a formação de PHAs, quando em condições anaeróbias, e subsequente síntese de glicogênio (mas não polifosfato) quando em condições aeróbias.

Tal fato pode justificar sua maior ocorrência no período onde maior substrato orgânico estava disponível (Período 2). No entanto, existe ainda limitada informação na literatura sobre as possíveis diferenças na sua distribuição e ecologia em sistemas de escala real.

Sabe-se, contudo do potencial de alguns *Competibacter* na desnitrificação, porém, a distinção desses microrganismos através de sondas com genes específicos, ou ainda por outro método molecular, ainda não é conhecida. Por fim, observa-se ainda na Figura 47 que neste reator, a temperatura não se apresentou como fator determinante na atividade bacteriana.

A técnica de PCR-DGGE foi também utilizada para verificar as mudanças na composição da comunidade bacteriana ao longo dos dois períodos monitorados. Na Figura 48 são apresentados os padrões de banda obtidos no gel de DGGE monitorados ao longo do tempo. Observa-se que mudanças consideráveis foram registradas na intensidade e no perfil de bandas entre os dois períodos de monitoramento. Nas amostras do Período 1 foi observado um total de 16 bandas no perfil do DGGE, sendo os resultados do sequenciamento para a grande maioria e análise filogenética previamente discutidas no item 4.2.6. Contudo, no perfil de bandas do Período 2 observou-se uma grande redução no número de bandas, totalizando apenas 5 (A-E), com ausência de variação entre os dias de monitoramento. Tendo em vista que cada banda corresponde aproximadamente a um grupo microbiano, observa-se que houve maior diversidade durante o Período 1 que o verificado no Período 2.

Esta constância verificada dos grupos microbianos presentes no Período 2, pode estar ligada à uma maior estabilidade do tratamento, confirmada pelos dados das variáveis físico-químicas monitoradas, tais como DQO e amônia, as quais foram mais estáveis neste período. Além disso, observa-se que houve a extinção de alguns grupos microbianos presentes, como por exemplo, na banda 1 do Período 1, a qual não se faz presente no Período 2. Este fato pode estar relacionado à maior carga orgânica disponível nesse período, aliado a uma aeração mais efetiva, devido ao acionamento dos dois aeradores componentes do reator. Outra hipótese para esta invariabilidade dos grupos microbianos verificados no Período 2, pode estar relacionado à maior homogeneização do licor misto, minimizando a formação de macro e micro zonas anóxicas/óxicas e portanto, possibilitando a retirada de amostras mais uniformes.

As bandas encontradas no Período 2 foram excisadas do gel de DGGE e posteriormente sequenciadas. A familiaridade das sequências após encontradas as regiões de similaridade através da pesquisa BLAST, são apresentados na Tabela 14. Os microrganismos foram taxonomicamente classificados no Domínio Bacteria, com

similaridade mais próxima com organismos não cultivados para todas as bandas analisadas.

Figura 48 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados do 16S rDNA pela técnica de DGGE utilizando DNA genômico extraído do licor misto das amostras do RBS2, ao longo dos Períodos 1 e 2 monitorados.

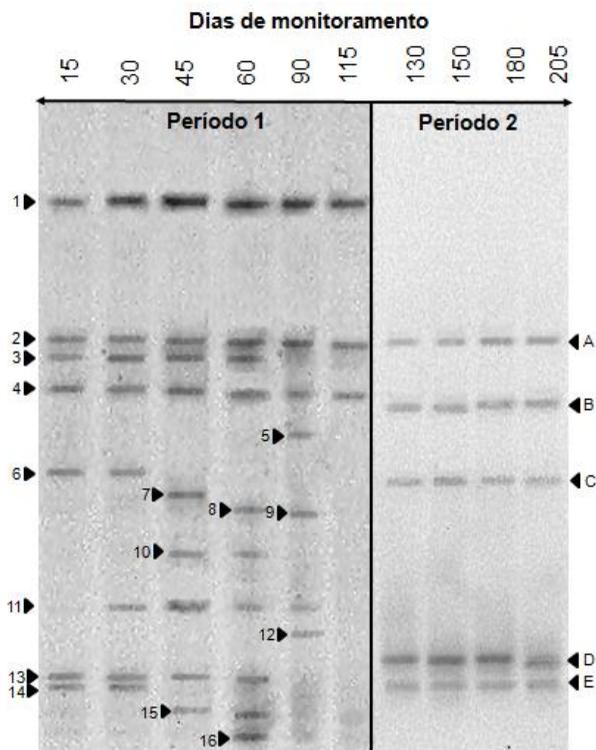


Tabela 14 – Resultados encontrados na pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE do RBS2 durante o Período 2.

Bandas	Grupos Relacionados (Número de Acesso)	% *	Fonte
A	Gama proteobactéria não cultivada clone nsc116, 16S rRNA clone TB127-25 (DQ211466)	98	Bactérias em bioreatores com sistema de circulação
B	Beta proteobactéria não cultivada clone MKC18 16S rRNA (JX555954.1)	89	Bactérias de solo. Amostras de bioremediação.
D	Bactérias <i>Bacterioidetes</i> não cultivada, clone L01-20, 16S rRNA (GU954504.1)	90	Bactérias de solo.
E	Bactéria não cultivada clone F1Q32TO05GI9G0 16S rRNA (GU495653.1)	95	Bactérias de sistema de lodo ativado de biofilme em escala real.

*(%) – Refere-se à porcentagem de similaridade.

4.4.4 Conclusões

O estudo com o RBS2 operado sob baixa e alta carga orgânica (0,2 e 2,2 kg DQOT m⁻³ d⁻¹, respectivamente) apresentou viabilidade no tratamento de esgoto sanitário. O reator foi eficiente para as principais variáveis monitoradas, com valores de remoção superiores a 80% para DQOS e DQOT; 60% e 96% para N-NH₄⁺, para os Períodos 1 e 2, respectivamente, com maior estabilidade operacional no segundo período. A biomassa era formada por um consórcio de microrganismos comumente relatados em sistemas de tratamento por lodos ativados. No período de baixa carga houve ocorrência de microrganismos desnitrificantes (*Thiobacillus* spp.). O período de alta carga favoreceu a ocorrência de protozoários ciliados livres e pedunculados, prevalência de bactérias nitrificantes (*Nitrospira* spp.) e aumento no percentual de OAP e OAG. Foi verificada a influência da temperatura na atividade da biomassa ativa autotrófica específica. A comunidade microbiana no período de alta carga apresentou menor diversidade e frequência constante. Houve correlação entre alguns grupos encontrados em ambos os períodos.

5. CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho foi avaliada a estrutura da comunidade microbiana e sua influência no desempenho de dois reatores operados em bateladas sequenciais (RBS1 e RBS2), componentes de sistemas descentralizados de tratamento de esgoto sanitário. Monitorados durante 192 dias (RBS1) e 232 dias (RBS2), os reatores foram operados sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido (média de 0,7 e 0,3 mg L⁻¹ para o RBS 1 e 2, respectivamente) e diferentes razões C/N, obtendo-se as seguintes conclusões:

- Ambos os reatores mostraram-se eficientes na remoção de matéria orgânica e nitrogênio, com remoções de DQO solúvel e total >80% em ambos os reatores; N-NH₄⁺ >70% no RBS1 e >60% no RBS2;
- Os tempos totais dos ciclos não influenciaram nas características físico-químicas e microbiológicas dos reatores. Estes podem ser operados com ciclos de duração inferior a 4 horas;
- A temperatura apresentou-se como um fator determinante na atividade da biomassa autotrófica (medida pela atividade respirométrica) nos reatores;
- O processo NDS ocorreu em ambos os reatores, verificado pela ausência de nitrito ou nitrato remanescentes no efluente (com redução do nitrogênio total) e pela presença de microrganismos como as BOAs e OAP no RBS1 e de bactérias do gênero *Thiobacillus*, OAP e OAG no RBS2;
- O processo de nitrificação completa com produção de nitrato em elevada concentração (média de 44 mg L⁻¹) ocorreu quando o RBS2 funcionou com dois aeradores, embora o valor médio de OD registrado fosse de 0,3 mg L⁻¹, indicando que a maior concentração de oxigênio fornecida era rapidamente consumida nos processos biológicos;
- Os principais grupos nitrificantes, recorrentes em ambos os reatores, apresentaram grandes variações na abundância. Houve baixa incidência no RBS1 de microrganismos dos gêneros *Nitrobacter* e *Nitrospira* (máximo de 5% para ambos), enquanto elevada incidência foi verificada no RBS2 (5% para *Nitrobacter* e 20% para *Nitrospira*);

- A retirada do lodo excedente estimulou o aumento no número de microrganismos no RBS1, dentre eles os pertencentes ao grupo das OAP (*Candidatus Accumulibacter*) e do gênero *Nitrosomonas*;
- No RBS2 um aumento no número de organismos OAP e OAG (*Candidatus Competibacter phosphatis*) foi verificado após o aumento da carga orgânica afluyente. Cerca de 70% do total de OAP correspondiam a organismos capazes de realizar desnitrificação (OAPDs). Esta relação de OAPDs está muito acima daqueles reportados na literatura, indicando a contribuição desses organismos na realização do processo NDS;
- A remoção de fósforo foi variável nos reatores, refletindo as diferentes condições operacionais aplicadas: cargas, retirada de lodo e tempos de ciclos. A eficiência de remoção de fósforo nas condições de aeração empregadas foi além do esperado, o que revela o potencial dessa forma de operação frente a uma das atuais dificuldades de grande parte dos sistemas de tratamento de esgotos. O aumento ao longo do período monitorado de bactérias OAP (*Candidatus Accumulibacter*) no RBS1 refletiu em um aumento da remoção de fósforo neste reator, alcançando média de 50%;
- A composição da comunidade bacteriana variou ao longo do tempo, apresentando mudanças consideráveis para os dois reatores. Uma redução no número de microrganismos no período de alta carga e maior aeração, e ausência de variação temporal entre as populações foram observadas no RBS2. Grande diversidade microbiana foi verificada com presença de microrganismos taxonomicamente similares aos organismos dos grupos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* no RBS1; assim como *Chlorobi*, *Bacteroidetes* e com membros de Betaproteobactérias e Gamaproteobactérias no RBS2. A maioria dos microrganismos apresentou correlação com grupos normalmente observados em sistemas de tratamento de águas residuárias. Demais microrganismos sequenciados mostraram similaridade com microrganismos não cultivados.

Os RBSs mostraram-se versáteis e eficientes no tratamento de esgotos sanitários de condomínios residenciais, adaptando-se às mudanças de cargas aplicadas e tempos de ciclos, com estabilidade no processo de

tratamento. Variações na ocorrência e diversidade da comunidade microbiana tiveram relação direta com as condições operacionais dos reatores, com aclimatação gradual da biomassa e diferentes respostas na qualidade do efluente, em termos de remoção de matéria orgânica e nutrientes.

6. RECOMENDAÇÕES

Tendo em vista os resultados obtidos com o presente estudo, para futuros trabalhos têm-se as seguintes recomendações:

- Ampliar o número de sondas utilizadas nas avaliações de biologia molecular (FISH), a fim de verificar a ocorrência de outros grupos microbianos, dentre os quais as populações desnitrificantes e do filo *Bacteroidetes* presentes no processo de tratamento biológico e bactérias ANAMMOX;
- Para uma análise filogenética mais precisa quanto à afiliação microbiológica, testar outros primers de DGGE, que apresentem maior tamanho de fragmento amplificado.
- Melhorar o controle do período de retirada do lodo, a fim de reduzir a idade do lodo, resultando em uma biomassa mais ativa e estável, refletindo positivamente na qualidade do efluente;
- Para a melhora na remoção de fósforo, deve-se estudar a possibilidade de remoção combinada: biológica e química, com aplicação de coagulantes metálicos.
- Realizar um estudo do consumo energético do reator, correlacionando-o com a qualidade do efluente.

REFERENCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 13969. Projeto, construção e operação de unidades de tratamento complementares e disposição final dos efluentes de tanques sépticos: procedimentos. Rio de Janeiro: ABNT, 1997, 57p.
- ABREU, A. A. V. *Identificação de bactérias filamentosas em processos de lamas ativadas através da técnica de hibridização in situ fluorescência (FISH)*. Dissertação (Mestrado) Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal, 142p, 2004.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; HOPKIN, K. *Fundamentos da Biologia Celular*. 2. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006.
- AMANN R.I., BINDER B.J., OLSON R.J., CHISHOLM S.W., DEVEREUX R.; STAHL D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 1919-1925, 1990.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Identification and in situ detection of individual bacterial cells. *FEMS Microbiology Letters*, 100: 45–50, 1992.
- AMANN R. In situ identification of microorganism by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. IN: A.D.L. Akkerman, J.D.van Elsas, F.J. de Bruijn (eds). *Molecular microbial Ecology Manual*, p.1–15, 1995.
- ANDREOTTOLA, G., OLIVEIRA, E. L., FOLADORI, P. Método Respirométrico para o monitoramento de processos biológicos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 10 (1): 4–23, 2005.
- APHA. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 21th Ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- ARAÚJO, J.C.; CAMPOS, A.P.; CORREA, M.M.S.; SILVA, E.C.; SPERLING, M.V.; CHERNICHARO, C.A.L. Enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia – Anammox. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 15 (2): 205–212, 2010.
- ARDEN, E.; LOCKETT, W.T. The oxidation of sewage without the AID of filters. Part III. *Journal of the Chemical Society Ind.* XXXIV, 18: 937–943, 1915.

- ARORA, M.L.; BARTH, E.F.; UMPHRES, M.B. Technology evaluation of sequencing batch reactors. *Journal Water Pollution Control Federal*, Alexandris, 57 (8): 867–875, 1985.
- ARTAN, N.; ORHON, D. *Mechanism and desing of sequencing batch reactors for nutrient removal*. In: IWA Publishing. Scientific and Technical Report, (19), 2005, 99p.
- ARVIN, E. Biological removal of phosphorous from wasterwaters. *Critical Reviews in Environmental Control*, 15: 25–64, 1985.
- Associação FloripAmanhã. Disponível em: <http://floripamanha.org/2011/01/saneamento-em-2015-ainda-sera-pessimo/>. Consultado em 23 de fevereiro de 2011.
- ATV Manual. (1997) *ATV Handbuch Biologische und Weitergehende Abwassereinigung* 4. Auflage 1997, Ernst and Sohn, Berlin, ATV, Hennef (Germany).
- BARBOSA, S. R. *Tratamento de efluentes em reator de leito fluidizado sequencial em batelada*. Dissertação de mestrado, Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis, SC, 2004.
- BARTHEL, L. *Estudo de Biofilme Desenvolvido em Reator de Leito Fluidizado Trifásico Aeróbio no Tratamento de Efluentes Têxteis*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
- BASSIN, J.P.; KLEEREBEZEM, R.; DEZOTTI, M.; LOOSDRECHT, M.C.M. Simultaneous nitrogen and phosphorous removal in aerobic granular sludge reactors operated at different temperatures. In proceeding *IWA, Worl Water Congress & Exhibition, Busan - Korea*, 2012a.
- BASSIN, J.P.; ABBAS, B.; KLEEREBEZEM, R.; MUYZER, G.; ROSADO, A.S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; DEZOTTI, M. Characterization of the microbial community of moving-bed biofilm reactors operated under different COD/N ratio. In proceeding *IWA, Worl Water Congress & Exhibition, Busan - Korea*, 2012b.
- BENTO, A.P. *Tratamento de esgoto doméstico em lagoas de estabilização com suportes para o desenvolvimento de perifiton - biofilme*. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- BERKS, B.C.; BAIZATTA, D.; RICHARDSON, D.J.; FERGUSON, S.J. Purification and characterization of a nitrous oxide reductase

- from *Thiosphaera pantotropha*. Implications for the mechanism of aerobic nitrous oxide reduction. *European Journal of Biochemistry*, 212: 467–476, 1993.
- BERTANZA, G. Simultaneous nitrification-denitrification process in extended aeration plants: Pilot and real scale experiences. *Water Science and Technology*, 35 (6): 53–61, 1997.
- BITTON, G. *Wastewater microbiology*, 3rd edition. Hoboken, New Jersey, Canadá: Jonh Wiley & Sons. 2005. 750p.
- BORTOLLOTTO NETO, A.F. *Estratégias para a nitrificação em reator de leito fluidizado sequencial em batelada*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- CABEZAS, A., DRAPER, P., ETCHEBEHERE, C. Fluctuation of microbial activities after influent load variations in a full-scale SBR: recovery of the biomass after starvation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84: 1191–1202, 2009.
- CAMPOS, R. H. *Estudo da remoção de carbono e nitrogênio de efluentes urbanos em um reator de leito fluidizado operado em bateladas sequenciais*. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- CAMPOS, R. H. *Utilização de reator de leito fluidizado trifásico aeróbio em sistema de tratamento combinado de águas residuárias*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- CANFIELD, D.E.; DES MARAIS, D.J. Aerobic sulfate reduction in microbial mats. *Science*, 251, 1471–1473, 1991.
- CANLER, J.P., PERRET, J.M. DUCHÈNE, P., COTTEUX, E. *Aide au diagnostic des stations d'épuration per l'observation microscopique des boues activées*. Copyright Cemagref Éditions, 1999.
- CARVALHO, G.; LEMOS, P.C.; OEHMEN, A.; REIS, M.A.M. Denitrifying phosphorous removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Research*, 41 (19): 4383–4396, 2007.
- CASTRO, M. L., GIANOTTI E. P., FORESTI, E. Desnitrificação Curta a partir do nitrito realizada por biomassa nitrificante/desnitrificante de reator em batelada submetido à aeração intermitente. In: *22º Congresso Brasileiro de Engenharia*

- Sanitária e Ambiental*. CD-ROM. Joinville/SC. Rio de Janeiro: ABES, 2003.
- CHANG, Y.-J.; STEPHEN, J.R.; RICHER, A.P.; VENOSA, A.D.; BRÜGGERMANN, J.; MACNAUGHTON, S.J.; KOWALCHUK, G.A.; HAINES, J.R.; KLINE, E.; WHITE, D.C. Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *Journal of Microbiological Methods*, 40:19–31, 2000.
- CHEN, F.; XIA, Q.; JU, L.K. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 6715–6722, 2003.
- CHERNICHARO, C.A. *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios*. Belo Horizonte. Projeto PROSAB, 2001.
- CHONG, T.; MA, F.; QIU, S. Impact of carbon to nitrogen ratio on nitrogen removal at low oxygen concentration in a sequencing batch biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 67(3): 612-618.
- COELHO, M.A.Z.; RUSSO, C.; ARAÚJO, O.Q.F. Optimization of a Sequencing Batch Reactor for Biological Nitrogen Removal. *Water Research*, 34(10): 2809–2817, 2000.
- COMEAU, Y.; HALL, K.J.; HANCOCK, R.E.W.; OLDHAM, W.K. Biochemical-model for enhanced biological phosphorous removal. *Water Research*, 20: 1511–1521, 1986.
- COSTA, T.B. *Desempenho de reator em batelada sequencial (RSB) com enchimento escalonado no tratamento de esgoto sanitário doméstico*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- COSTA, A.G.; FERREIRA, A.F.; VAN HAANDEL, A. Monitoramento da atividade bacteriana de um sistema de lodos ativados Bardenpho por meio de respirometria. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, 12 (1): 17–23, 2007.
- COSTA, R.H.R.; HOFFMANN, H.; THANS, F.C.; RAE, M.; CAMPOS, R.H.; PLATZER, C. Nitrification control and simultaneous denitrification via dissolved oxygen concentration in sequencing batch reactors (SBR) in a small community. In: *8th IWA Specialized Conference on Small Water and Wastewater Systems (SWWS) and 2nd IWA Specialized Conference on*

- Decentralised Water and Wastewater International Network* (DEWSIN), Coimbatore, India, 2008.
- CROCETTI, G.R.; BANFIELD, J.F.; KELLER, J.; BOND, P.L.; BLACKALL, L.L. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, 148: 3353-3364, 2002.
- DAIMS, H.; BRÜHL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.-H.; WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 434-444, 1999.
- DAIMS, H.; PURKHOLD, U.; BJERRUM, L.; ARNOLD, E.; WILDERER, P.A.; WAGNER, M. Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Science Technology*, 41: 85–90, 2001.
- DEBIK, E.; MANAV, N. Sequence optimization in a sequencing batch reactor for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33: 533–540, 2010.
- DENECKE, M.; EILMUS, S.; RÖDER, N.; ROESCH, C.; BOTHE, H. Molecular identification of the microbial diversity in two sequencing batch reactors with activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:1725–1734, 2012.
- DEVI, R., DAHIYA, R.P. COD and BOD removal from domestic wastewater generated in decentralized sectors. *Bioresource Technology*, 99: 344–349, 2008.
- DÍEZ, B.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MARSH, T. L.; MASSANA, R. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied Environmental Microbiology*, 67 (7): 2942–2951, 2001.
- DIONISI, H.M.; LAYTON, A.C.; ROBINSON, K.G.; BROWN, J.R.; GREGORY, I.R.; PARKER, J.J.; SAYLER, G.S. Quantification of Nitrosomonas oligotropha-Like Ammonia- Oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. from Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 245–253, 2002.
- DORIGO, U.; VOLATIER, L.; HUMBERT, J-F. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, 39: 2207–2218, 2005.

- ECKENFELDER, W.W.; MUSTERMAN, J.L. *Activated sludge treatment of industrial wastewater*, USA: Technomic Publishing Company, Inc, 1995, 281p.
- EGLI, K.; FANGER, U.; ALVAREZ, P.J.J.; SIEGRIST, H.; VAN DER MEER, J.R.; ZEHNDER, A.J.B. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology*, 175: 198-207, 2001.
- EPA, United States Environmental Protection Agency. *Manual Nitrogen Control*. Technomic Publishing, Washington, USA, 1993, 311 p.
- ETCHEBEHERE, C.; MENES, R.J. Caracterização, monitoramento e controle de processos: técnicas de caracterização microbiológica. In: *V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos*. Florianópolis, 2005, 18 p.
- FERNANDEZ, N.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J.A.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, 2008.
- FERREIRA, E.D.S.; SOARES, S.R.A.; BERNARDES, R.S. Uso da respirometria para a caracterização de esgotos domésticos: aplicação, limites e apresentação de método simplificado. In: *Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Anais... Cancun, México, 2002.
- FIGUEROLA, E.L.; ERIJMAN, L. Bacterial taxa abundance pattern in an industrial wastewater treatment system determined by the full rRNA cycle approach. *Environmental Microbiology*, 9 (7):1780-9, 2007.
- FUJII, T.; SUGINO, H.; ROUSE, J.D.; FURUKAWA, K. Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 412-418, 2002.
- GIANOTTI, E.P. *Denitrificação em uma lagoa marginal do rio Mogi-Iguaçu, Lagoa do Infernã (Estação Ecológica do Jataí – Luiz Antônio – SP)*. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 1994.
- GOMES, P.M.; HARADA, A.L. As questões ambientais, técnica e implicação social da locação das unidades operacionais de

- esgotos. In: *19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Anais... Foz do Iguaçu/PR: ABES, 1997.
- GORONSZY, M.C. Intermittent operation of the extended aeration process for small systems. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 51 (2): 274–287, 1979.
- GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (12): 5488–5491, 2000.
- GUISASOLA, A.; QURIE, M.; VARGAS, M.M.; CASAS, C.; BAEZA, J.A. Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as an electron acceptor. *Process Biochemistry*, 44: 689–695, 2009.
- HENZE, M.; GRADY, C.P.L.; GUJER, W.; MARAIS, G.V.R.; MATSUO, T. *Activated sludge Model No 1*. IAWPRC Scientific and Technical Reports No 1. London UK. 1987.
- HENZE, M.; HARREMOËS, P.; JANSEN J. LA C.; ARVIN, E. *Wastewater treatment: Biological and Chemical Processes*. Springer, 2001, 430 p.
- HEUER, H.; HARTUNG, K.; WIELAND, G.; KRAMER, I.; SMALLA, K. Polynucleotide Probes That Target a Hypervariable Region of 16S rRNA Genes To Identify Bacterial Isolates Corresponding to Bands of Community Fingerprints. *Applied and Environmental microbiology*, 65 (3): 1045–1049, 1999.
- HOFFMANN, H., PLATZER, C. Aplicação de imagens microscópicas do lodo ativado para a detecção de problemas de funcionamento das estações de tratamento de esgotos na Alemanha. In: *I SEMINARIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO SANEAMENTO*, Anais... Universidade Federal do Espírito Santo, p. 108–120, 2000.
- HOFFMANN, H.; COSTA, T.B.; WOLFF, D.B.; PLATZER, C.; COSTA, R.H.R. The potential of denitrification for the stabilization of activated sludge processes affected by low alkalinity problems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 329–337, 2007.
- HOFFMANN, H.; WOLFF, D.B.; COSTA, T.B.; WEITZ J.; PLATZER, C. e COSTA, R.H.R: Avaliação de Reatores Sequenciais por Batelada do Tipo Lodo Ativado. In: *IV Simpósio*

- Internacional De Qualidade Ambiental. Anais... ABES, Porto Alegre, 2004. CD ROM.*
- HOLMAN, J. B.; WAREHAM, D. G. COD, ammonia, and dissolved oxygen time profiles in the simultaneous nitrification/denitrification process. *Biochemical Engineering Journal, Amsterdam*, 22: 125–133, 2005.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.G.; PACE, N.P. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal Bacteriology*, 180: 4765–477, 1998.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2000). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 25 nov. 2006.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2008) Pesquisa Nacional do Saneamento Básico. Disponível em: www.ibge.gov.br. Consultado em 23 de fevereiro de 2011.
- IRVINE, R.L.; BUSH, A.W. Sequencing batch biological reactors – an overview. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 51 (2): 264–273, 1979.
- 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. IWA Publishing. London, 2001.
- JETTEN, M.S.; CIRPUS, I.; KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; SLIEKERS, O.; HAAIJER, S.; VAN DER STAR, W.; SCHMID, M.; VAN DE VOSSENBERG, J.; SCHMIDT, I.; HARHANGI, H.; VAN LOOSDRECHT, M.; GIJS, KUENEN, J.; OP DEN CAMP, H.; STROUS, M. 1994–2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochemical Society Transactions*, 33: 119-123, 2005.
- JEYANAYAGAM, S. True Confessions of the Biological Nutrient Removal Process. *Florida Water Resources Journal*: January 2005.
- JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. *Tratamento de Esgotos Domésticos*. 4. ed. Belo Horizonte: Segrac Editora, v. 1, 2005, 906 p.
- JU, L. -K.; HUANG, L.; TRIVEDI, H. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in single-tank low-dissolved-oxygen systems under cyclic aeration. *Water Environmental Research*, 79 (8): 912–920, 2007.

- JUNGLES, M.K. *Desenvolvimento de grânulos aeróbios no tratamento de esgoto sanitário em reatores operados em bateladas sequenciais (RBS)*. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- JURETSCHKO, S.; LOY, A.; LEHNER, A.; WAGNER, M. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full cycle rRNA approach. *Systematic and Applied Microbiology*, 25:84–99, 2002.
- KAMIYAMA, H.; TSUTIYA, M. T. Lodo ativado por batelada; um processo econômico para o tratamento de esgotos em estações de grande porte. *Revista DAE*. 52 (165): 1–7, 1992.
- KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.C.; SCHMIDT, I.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; CIRPUS, I.; VAN DER STAR, W.; VAN LOOSDRECHT, M.; ABMA, W. Application, ecophysiology and biodiversity of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3(3):255-264, 2004.
- KARTAL, B.; RATTRAY, J.; NIFTRIK, L.A. VAN.; VOSSENBERG, J. VAN DE.; SCHMID, M.C.; WEBB, R.I.; SCHOUTEN, S.; FUERST, J.A.; DAMSTÉ, J.S.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 30: 39-49, 2007.
- KHIN, T.; ANNACHHATRE, A.P. Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*, 22: 519-532, 2004.
- KIELING, D. D. *Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Florianópolis, 2004. 106p.
- KOIZUMI, Y.; KELLY, J. J.; NAKAGAWA, T.; URAKAWA, T.; EL-ANTROUSSI, S.; AL-MUZAINI, S.; FUKUI, M. URUSHIGAWA, Y.; STAHL, D. A. Parallel characterization of anaerobic toluene and ethylbenzene degrading microbial consortia by PCR denaturing gradient gel electrophoresis, RNA-

- DNA membrane hybridisation, and DNA microarray technology. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3215–3225, 2002.
- KONG, Y.H.; NIELSEN, J.L.; NIELSEN, P.H. Microaudiographic study of Rodocyclus-related polyphosphate accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorous removal plants. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 5389–5390, 2004.
- KULKARNI, P.M. Nitrophenol removal by simultaneous nitrification denitrification (SND) using *T. pantotropha* in sequencing batch reactors (SBR). *Bioresource Technology*, 128: 273–280, 2013.
- KUNKEL D. *Observación de la estructura y composición superficial de sólidos*. Dennis Kunkel Microscopy, Inc., P. O. Box, Kailua, Hawaii, 9: 67–34, 2008.
- LAMEGO, NETO. L. G. *Tratamento de esgoto urbano em reator híbrido operado em bateladas sequencias (RHBS) submetido a variações de carga*. Dissertação de mestrado, Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis, SC, 2008, 203p.
- LANTZ, P-G.; TJERNELD, F.; HAHN-HAGERDAL, B.; RADSTROM, P. Use of aqueous two-phase systems in sample preparation for polymerase chain reaction-based detection of microorganisms. *Journal of Chromatography*, 680: 165–170, 1996.
- LASPIDOU, C.Y.; RITTMANN, B.E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, 36: 2711–2720, 2002.
- LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.
- LERAT, E.; DAUBIN, V.; OCHMAN, H.; MORAN, N.A. Evolutionary origins of Genomic Repertoires in Bacteria. *Plos Biology*, 3 (5): 807–814, 2005.
- LIN, Y.-F.; JING, S.-R. Characterization of denitrification and nitrification in a step-feed alternating anoxic-oxic sequencing batch reactor. *Water Environment Research*, 73(5): 526–533, 2001.
- LIU, W.-T.; MINO, T.; NAKAMURA, K.; MATSUO, T. Role of glycogen in acetate uptake and polyhydroxyalkanoate synthesis in anaerobic–aerobic activated sludge with a minimized polyphosphate content. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77 (5): 535–540, 1994.

- LONG, X., CHEN, C.; XU, Z., OREN, R., HE, J.-Z. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a temperate forest ecosystem under ten-years elevated CO₂. *Soil Biology and Biochemistry*, 46: 163–171, 2012.
- LOPES, D.D. *Tratamento de esgoto sanitário empregando reatores compartimentados anaeróbio/aeróbio em série*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000, 272p.
- LUZ, E.L. *Tratamento de esgoto em reatores por bateladas controlados por sistema de telegestão e suporte operacional informatizado*. Dissertação de mestrado, Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10^a ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004, 608 p.
- MALIK, S.; BEER, M., MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34: 265–276, 2008.
- MANZ, W.; EISENBRECHER, M.; NEU, T.R.; SZEWCZYK, U. Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*, 25: 43-61, 1998.
- MARSILI-LIBELLI, S.; TABANI, F. Accuracy analysis of a respirometer for activated sludge dynamic modelling. *Water Research*, 36: 1181–1192, 2002.
- MARTÍN-CERECEDA, M., PÉREZ-UZ, B.; SERRANO, S., GUINEA, A. Dynamics of protozoan and metazoan communities in a full scale wastewater treatment plant by rotating biological contactors. *Microbiological Research*, 156: 225–238, 2001.
- MARTINS, C. L. *Comportamento de reator de leito fluidizado trifásico aeróbico utilizando diferentes materiais suporte*. Dissertação (mestrado), Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 156p, 2003.
- MCMAHON, K.D.; HE, S.; OEHMEN, A. The microbiology of phosphorous removal. In *Microbial Ecology of Activated Sludge*, Seviour, R.; Neilsen, H. IWA Publishing, London, UK. 2010, 667p.

- MEGANCK, M.T.J.; FAIP, G.M. Enhanced biological phosphorous removal from waste waters. *Biotreatment System*, 3: 11–204, 1988.
- METCALF & EDDY. *Wastewater engineering: Treatment and reuse*. 4ª Ed. Mc Graw Hill, Inc. New York, 2003, 1819 p.
- MOHAMMADI, A. R.; MEHRDADI, N.; BIDHENDI, G.N.; TORABIAN, A. Excess sludge reduction using ultrasonic waves in biological wastewater treatment. *Desalination*, 275: 67–73, 2011.
- MONCLÚS, H.; SIPMA, J.; FERRERO, G.; RODRIGUES-RODA, I.; COMAS, J. Biological nutrient removal in a MBR treating municipal wastewater with special focus on biological phosphorous removal. *Bioresource Technology*, 101: 3984–3991, 2010.
- MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista da Saúde Pública*, 36(3): 370–4, 2002.
- MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695–700, 1993.
- NIELSEN, J.L.; HANSEN, A.A. Identification of denitrifying microorganisms in activated sludge by FISH. In: *FISH handbook for biological wastewater treatment*. Ed Nielsen, Daims and Lemmer. IWA Publishing. London- UK, 123, 2009.
- NIKOLAUSZ, M.; SIPOS, R.; RÉVESZ, S.; SZÉKELY, A.; MÁRIALIGETI, K. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiology Letters*, 244: 385–390, 2005.
- OCHOA, J.C.; COLPRIM, J.; PALACIOS, B.; PAUL, E.; CHATELLIER, P. Active heterotrophic and autotrophic biomass distribution between fixed and suspended systems in a hybrid biological reactor. *Water Science and Technology*, 46: 397–404, 2002.
- OEHMEN, A.; LEMOS, P.C.; CARVALHO, G.; YUAN, Z.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L.; REIS, M.A.M. Advances in enhanced biological phosphorous removal: from micro to macro scale. *Water Research*, 41: 2271–2300, 2007.
- OEHMEN, A.; CARVALHO, G.; LOPEZ-VAZQUEZ, C.M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; REIS, M.A.M. Incorporating

- microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Research*, 44: 4992–5004, 2010.
- OKABE, S.; SATOH, H.; WATANABE, Y. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 3182–3191, 1999.
- OMS (WHO - World Health Organization) e UNICEF. *Progress on Sanitation and Drinking-water: 2010 Update*. WHO Press, Switzerland, 2010.
- ONUKI, M.; SATOH, H.; MINO, T.; MATSUO, T. Application of molecular methods to microbial community analysis of activated sludge. *Water Science and Technology*, 42 (3): 17–22, 2000.
- PARK, J.J.; BYUN, G.; YU, J.C.; PARK, S.R.; JU, D.J. HUR, S.H. PARK, T.J. Analysis of nitrifying bacterial communities in aerobic biofilm reactors with different DO conditions using molecular techniques. *Water Science and Technology*, 1889–1899, 2008.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. v.1, São Paulo: McGraw-Hill, 1980, 1072 p.
- PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J. Fluorescence in situ hybridization the identification of of environmental microbes. *Methods in Molecular Biology and Protocols*, 353:153–164, 2007.
- PHILIPPI, L. S; SEZERINO, P. H.; CAMPOS, R.H. *Sistemas descentralizados de tratamento de esgotos*. Florianópolis: Pandion, 2007, 63p.
- PHILIPPI, L.S. Saneamento descentralizado: instrumento para o desenvolvimento sustentável. In: *IX SILUBESA - Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Anais... Maceió, 2010.
- PICKBRENNER, K. *Uso de reator sequencial em batelada (RBS) para pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio*. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental. URGs, Porto Alegre, 2002.
- POCHANA, K.; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Science Technology*, Oxford 39 (6): 61–68, 1999.
- POLPRASERT, C.; SAWAITTAYOTHIN, V. Nitrogen mass balance and microbial analysis of constructed wetlands treating municipal

- landfill leachate. *Water Science and Technology*, 54(11-12): 147-54, 2006.
- PURKHOLD, U.; POMMERING-RÖSER, A.; JURETSCHKO, S.; SCHMIDT, M.C.; KOOPS, H.P.; WAGNER, M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16SrRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 5368–5382, 2000.
- QUAN, Z.; RHEE, S.; ZUO, J.; YANG, Y.; BAE, J.; PARK, J.R.; LEE, S.; PARK, Y. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing ANAMMOX reactor. *Environmental Microbiology*, 10(11): 3130–3139, 2008.
- RITTMANN, B.E.; MC CARTY, P.L. *Environmental biotechnology: principles and applications*. Published by Mc Graw-Hill, 2001, 754p.
- RITTMANN, B.E. The role of molecular methods in evaluating biological treatment processes. *Water Environment Research*, 74: 421–427, 2002.
- ROBERTIS, E. de; HIB, J. *Bases da biologia celular e molecular*. Tradutor Antonio Francisco Dieb Paulo, revisão técnica por Jorge Mamede de Almeida. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2006.
- RYU, H.D.; LEE S.I. Comparison of 4-stage biological aerated filter (BAF) with MLE process in nitrogen removal from low carbon-to-nitrogen wastewater. *Environmental Engineering Science*, 26: 163–170, 2009.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–491, 1988.
- SALES, R. *Cinética de degradação de efluente têxtil por biofilme em leite fluidizado trifásico aeróbio*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.
- SAMARAS, P.; PAPADIMITRIO, C.A.; VAVOULIDOU, D.; YIANGOU, M.; SAKELLAROPOULOS, G.P. Effect of hexavalent chromium on the activated sludge process and on the sludge protozoan community. *Bioresource Technology*, 100: 38–43, 2009.

- SCHMID, I.; SLIEKERS, O; SCHMID, M.; BOCK, E. ; FUERST, J.A.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology*, 27: 481-492, 2003.
- PENTON, C.R.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. Molecular Evidence for the Broad Distribution of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Freshwater and Marine Sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 6829-6832, 2006.
- SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em Biorreatores. In: *Biotecnologia Industrial*, vol 2, 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, p. 277–331. 2001.
- SCHRAMM, A.; de BEE, D.. van den HEUVEL, J.C. OTTENGRAF, S.; AMANN, R. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp.along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3690–3696, 1999.
- SEIXO, J.; VARELA, M.H.; COUTINHO, J.A.P.; COELHO, M.A.Z. Influence of C/N ratio on autotrophic development in a sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 21: 131–139, 2004.
- SEVIOUR, R.J. An overview of the microbes in activated sludge, In: Seviour, R.J., Nielsen, P.H. (Eds.). *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing, 2010, 667p.
- SEVIOUR, R.J. e NIELSEN, P.H. *Microbial Ecology of Activated Sludge*, IWA Publishing, 2010, 667p.
- SEVIOUR, R.J.; MINO, T.; ONUKI, M. The microbiology of biological phosphorous removal in activated sludge systems. *Microbiology Reviews*, 27: 99–127, 2003.
- SLIEKERS, A.O.; HAAIJER, S.C.M.; STAFSNES, M.H.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. Competition and coexistence of aerobic ammonium and nitrite-oxidizing bacteria at low oxygen concentrations. *Applied Microbiol Biotechnology*, 68: 808–817, 2005.
- SOUSA, J. T.; FORESTI, E. Avaliação de reator seqüencial em batelada (SBR) no pós-tratamento de efluentes de reator UASB. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES – RJ*, 6 (1 e 2): 9–16, 2001.
- SOUTO, V. S. *Utilização de reatores híbridos de fluxo contínuo e em bateladas sequenciais para remoção conjunta de carbono e nitrogênio de esgoto urbano*. Dissertação (Mestrado), Programa

- de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- SPANJERS, H.; VANROLLEGHEM, P.; OLSSON, G.; DOLD, P. Respirometry in control of activated sludge process: principles. IWAQ *Scientific and Technical Report* No 7. London UK. 1998.
- STROUS, M.; FUERST, J.; KRAMER, E.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; PASSCHOONEN, K.T.; VAN DE WEEB, R.; KUENEN, J. G.; JETTEN M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400: 446-449, 1999.
- SUN, S-H.; NÄCHER, C.P.; MERKEY, B.; ZHOU, Q.; XIA, S.Q.; YANG, D.H; SUN, J.H.; SMETS, B.F. Effective biological nitrogen removal treatment processes for domestic wastewaters with low C/N ratios: A review. *Environmental Engineering Science*, 27: 111–126, 2010.
- TAN, C.; MA, F.; QIU, S. Impacto f carbon to nitrogen ratio on nitrogen removal at a low oxygen concentration in a sequencing batch biofilm reactor. *Water Science and Technology* 67(3): 612–618, 2013.
- THANS, F. C. *Controle operacional de reator em bateladas sequenciais (rbs): ajustes na concentração de oxigênio dissolvido visando a remoção de nutrientes*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- THIRD, K.A.; GIBBS, B.; NEWLAND, M.; CORD-RUWISCH, R. Long-term aeration management for improved N-removal via SND in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 39:3523–3530, 2005.
- TOURNA, M.; FREITAG, T.E.; NICOL, G.W.; PROSSER, J. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 10 (5): 1357–1364, 2008.
- TSUNEDA, S.; EJIRI, Y.; OGIWARA, M.; NAGANO, T.; HIRATA, A. Characteristics and applicability of nitrifying granules produced in an anaerobic upflow fluidized bed reactor. In: *Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series*. IWA Publishing. Munich, 15–24, 2005.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. Nutrient control design manual. EPA/600/R-10/100, 2010.

- VAN DE GRAAF, A.A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN M.S.M.; KUENEN, J.G. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142: 2187 - 2196, 1996.
- VAN HAANDEL, A. C.; CATUNDA, P. F. C. Determinação da taxa de consumo de oxigênio em sistemas de tratamento de esgoto. *Revista Engenharia Sanitária*, 21 (4): 481–488, 1982.
- VAN HAANDEL, A. C.; MARAIS, G. O. *O comportamento do sistema de lodo ativado - teoria e aplicação para projeto e operação*. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, Egraf, 1999, 472 p.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M. e JETTEN, M.S.M. Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 38: 1-7, 1998.
- VIANCELLI, A., KUNZ, A., ESTEVES, P.A., BAUERMAN, F., FUJII, T., FURUKAWA, K., ANTONIO, R.V., VANOTTI, M.,. Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54: 1035–1041, 2011.
- VON SPERLING, M. Dimensionamento de lodos ativados por batelada utilizando os princípios da teoria do fluxo de sólidos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 6 (3): 147–156, 2001.
- VON SPERLING, M. *Lodos Ativados*. Vol.4. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG. 2ªEd.. 2002, 428p.
- VON SPERLING, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG. Belo Horizonte. 2005, 452p.
- WACHTMEISTER, A.; KUBA, T.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. A sludge characterization assay for aerobic and denitrifying phosphorus removing sludge. *Water Research*, 31 (3): 471–478, 1997.
- WAGNER, J. *Desenvolvimento de grânulos aeróbios e tratamento de esgoto doméstico em um reator em bateladas sequenciais (RBS) sob diferentes condições operacionais*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- WAGNER, M.; LOY, A.; NOGUEIRA, R.; PURKHOLD, U.; LEE, N.; DAIMS, H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:665–680, 2002.

- WAGNER, M.; RATH, G.; KOOPS, H.P.; FLOOD, J.; AMANN, R. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology*, 34: 237–244, 1996.
- WARREN, A., SALVADÓ, H., CURDS, C.R., ROBERTS, D.MCL. Protozoa in activated sludge processes. In: Seviour, R., Mielsen, P.H. (Eds.), *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing, UK, 667 p., 2010.
- WILDERER, P.A. Decentralized versus centralized wastewater management. In: *Decentralised Sanitation and Reuse - Concepts, systems and implementation* (P. Lens, G) P. Lens, G. Zeeman and G. Lettinga, eds). IWA Publishing, Integrated Envir. Techn. Series, London, UK, pp. 39–54, 2001.
- WILDERER, P.A.; IRVINE, R.L.; GRONZSY, M.C. *Sequencing Batch Reactor Technology*, IWA Scientific and Technical Report N°10, IWA Publishing (UK), 2001.
- WOEBKEN, D.; LAM, P.; KUYPERS, M.M.; NAQVI, S.W.; KARTAL, B.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.; FUCHS, B.M.; AMANN, R. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel Candidatus Scalindua phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, 10: 3106–3119, 2008.
- WOLFF, D. B., *Remoção biológica de carbono e nitrogênio de esgoto urbano em reatores híbridos utilizando dois materiais suporte flutuantes*. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- WOLFF, D.B.; CHAVEZ, J.C.O.; PAUL, E.; COSTA, R.H.R. *Estudo da biomassa heterotrófica e autotrófica ativa desenvolvida em reatores híbridos no tratamento de esgoto urbano*. In: SINAFERM2003 – XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis, SC, 2003.
- WOLFF, D.B. *Estudo da tratabilidade de um efluente têxtil por biomassa fixa através de um reator de leito fluidizado trifásico aeróbio*. Dissertação de Mestrado, Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis, SC, 1997.
- WREGGE M. *A ética da água*. InformANDES, 96:12, 2000.
- WU, G.; SORENSEN, K.B.; RODGERS, M.; ZHAN, X. Microbial community associated with glucose-induced enhanced biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*, 60 (8): 2105–2113, 2009.

- YU, Z.; MORRISON, M. Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (8): 4800–4806, 2004.
- ZHANG, Z.; LI, H.; ZHU, J.; WEIPING, L.; XIN, X. Improvement strategy on enhanced biological phosphorus removal for municipal wastewater treatment plants: Full-scale operating parameters, sludge activities, and microbial features. *Bioresource Technology* 102: 4646–4653, 2011.
- ZHOU, K.; XU, M.; LIU, B.; CAO, H. Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. *Journal of Environmental Sciences*, 20: 482–486, 2008.
- ZWIRGLMAIER, K. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - the next generation. *FEMS Microbiology letters*, 246: 151–158, 2005.

APENDICE 1

ANAIS DO 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL

II-428 – Avaliação de Sistemas de Reatores em Bateladas Sequenciais (RBS), em Escala Real, Visando o Tratamento de Esgoto Doméstico

Heloísa Fernandes⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Mestre em Engenharia Ambiental pela UFSC. Doutoranda em Engenharia Ambiental na UFSC.

Thiago Albuquerque Algayer

Graduando de Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Heike Hoffman

Microbióloga pela Universidade Greifswald/ Alemanha, Doutora em Ecologia pela Universidade Rostock/Alemanha, Pós-doutorado na UFSC (DAAD), Rotária do Brasil Ltda.

Rejane Helena Ribeiro da Costa

Engenheira Civil pela Universidade Federal da Paraíba, Mestre em Hidráulica e Saneamento EESC-USP - São Carlos – SP, Doutora pelo Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA), França. Pós Doutora pela Université Montpellier I, UM I, França. Professora Titular do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFSC.

Endereço⁽¹⁾: R. Professor Milton Sullivan, 164. Apto. 02-Florianópolis - SC - CEP: 88040-620 - Brasil - Tel: (48) -3721-7743 - e-mail: lola_sc@hotmail.com

RESUMO

Este estudo descreve o perfil de funcionamento de duas estações de tratamento de esgoto composto por Reatores em Bateladas Sequenciais (RBS), em escala real, localizados em dois condomínios residenciais da cidade de Florianópolis. A fim de avaliar o desempenho dos reatores quando operados sob condições de baixa aeração, bem como avaliar a diversidade microbiana presente, os reatores (R1 e R2) foram monitorados por dois meses e operados em ciclos sucessivos de 8 horas, com 3 etapas de alimentação ao longo do ciclo (escalonado). Parâmetros físico-químicos também foram avaliados e a diversidade bacteriana determinada por meio de microscopia óptica e ensaios respirométricos. Constatou-se que

ambos os reatores recebem elevada carga orgânica e amoniacal, sendo os valores de maior remoção para o Reator 1, referentes às variáveis DQO total, DQO filtrada, NTK e Amônia, representadas por 52%, 85%, 74% e 92%, respectivamente. Para o Reator 2 houve remoção apenas das variáveis DQO total e DQO filtrada (66% e 63%, respectivamente). Os ensaios respirométricos apresentaram para a biomassa heterotrófica (XH) presente no R1 valores de 188,11 mg DQO total/L (94,78% do total da biomassa ativa) enquanto R2 apresentou 78,46 mg DQO total /L (98,68% do total de biomassa ativa). A biomassa ativa autotrófica (XA) foi de 10,35 mg DQO total /L para o Reator 1 (5,22% do total de biomassa ativa) e para o Reator 2 de 1,05 mg DQO total /L (1,32% da biomassa ativa). As análises microscópicas revelaram no Reator 1 a presença de flocos de lodo altamente concentrado, compactados e bem formados, com alta diversidade e poucas bactérias filamentosas. Dentre os grupos recorrentes cita-se *Euglypha* sp., *Rotatoria* sp., cistos de *Vorticella* sp., *Epistylis* sp. e numerosos zooflagelados. Para o Reator 2, no entanto, foi observado um lodo com baixa diversidade microbiana, com presença algumas bactérias e fungos filamentosos, bem como bactérias do tipo *Zooglea* e *Beggiatoa*.

PALAVRAS-CHAVE: Reatores em Bateladas Sequenciais, Esgoto Doméstico, Respirometria, Avaliação Microbiológica.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a preocupação com o cumprimento das normas de descarga de efluentes domésticos, visando melhorias do tratamento e minimização dos impactos ambientais, tem-se apresentado cada vez maior. Desta forma, estudos que possibilitem o controle da eficiência do sistema, viabilidade econômica e que produzam efluentes com satisfatória qualidade físico-química, visando atender as legislações ambientais vigentes, tornam-se relevantes. Neste contexto, o tratamento descentralizado tem sido apresentado como uma excelente alternativa para a população urbana de pequeno porte, uma vez que enfatizam a redução da extensão da rede de esgotos, buscando oportunidades que melhor se adaptam à realidade local, com o mesmo grau de eficiência nos aspectos sanitários e ecológicos (Philippi, 2007).

Dentre as tecnologias de tratamento utilizadas em sistemas descentralizados, os Reatores em Bateladas Sequencias (RBS) vem se apresentando com uma série de vantagens por ser um sistema flexível, seu funcionamento pode apresentar ciclos adaptados às necessidades de eficiência de tratamento, à vazão de esgoto e da carga orgânica afluente, redução do tamanho das unidades, menor produção de lodo e

menor consumo de energia. Além disso, esses sistemas apresentam-se como um tratamento de alta eficiência no consumo de matéria orgânica, principalmente na remoção de nutrientes (Coelho et al., 2000). Outra vantagem está no fato de serem instalações mais compactas, possibilitando a inserção destes em um ambiente urbano, com impacto relativamente baixo e, acima de tudo, altamente resistente a cargas de choque, temperatura e toxicidade, permitindo continuar a adaptar os ciclos de acordo com as necessidades de tratamento de esgoto descarga total, orgânica e consumo de energia (Orhon & Artan, 2005).

Nestes reatores utiliza-se um curso de operação padrão, composto por 5 (cinco) fases (enchimento, reação, decantação, retirada e repouso). Lin e Jing (2001) sugerem ainda a utilização de RBS com “enchimento escalonado” (*step-feed*), que proporciona um efluente de melhor qualidade, com maior remoção do nitrogênio total (NT) comparativamente ao processo com um único enchimento. Todo o ciclo de operação ocorre em uma mesma unidade, através dos ciclos seqüenciais intermitentes de aeração e não aeração, possibilitando a oxidação da matéria carbonácea, a remoção de nutrientes e a separação sólido/líquido por sedimentação (Sousa & Foresti, 2001).

Nos processos biológicos de tratamento, tais como os RBS, forma-se um ambiente favorável ao crescimento maximizado das células microbianas, responsáveis pela reciclagem da matéria orgânica e dos nutrientes (Jenkins, 2007). As células microbianas se apresentam agregadas a outras partículas formando flocos biológicos. O floco desempenha um papel fundamental no processo de remoção da matéria orgânica apresentando-se como uma estrutura heterogênea, contendo material orgânico adsorvido, material inerte dos esgotos, material microbiano produzido para a matriz, células vivas e mortas (Von Sperling, 2005). Sua comunidade microbiana é bastante diversa, formada por bactérias, protozoários, pequenos metazoários, rotíferos, nematódeas, anelídeos e larvas de insetos (Juretschko et al., 2002). Esta composição diversa da microfauna do lodo revela uma tendência dos processos de lodos ativados, quanto à eficiência na remoção de DBO₅ e sólidos suspensos (SS); nas condições de sedimentação do lodo; nível de aeração empregado; toxicidade; além de indicar a ocorrência de sobrecargas orgânicas e nitrificação (Hoffmann *et al.*, 2007).

O conhecimento da comunidade biológica envolvida nas etapas do tratamento dentro do reator, associada ao monitoramento dos parâmetros físico-químicos, tais como oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e concentração de sólidos, torna-se essencial para a manutenção da qualidade do efluente tratado. Além disso, a determinação da atividade da biomassa a partir da resposta das populações de microrganismos apresenta-se como importante parâmetro para o monitoramento da eficiência destes processos de tratamento (McNicholl et al., 2007). Diversos métodos são utilizados para estimar a atividade da biomassa, sendo a respirometria um método simples, eficaz e rápido, amplamente utilizado (Weiss et al., 1999). Partindo-se deste contexto o presente trabalho objetiva investigar o desempenho de dois sistemas de tratamento de esgoto doméstico, formado por reatores em bateladas seqüenciais (RBS), em escala real, de dois condomínios residenciais, situados na cidade de Florianópolis, correlacionando a diversidade microbiana presente às variáveis físico-químicas monitoradas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização e Descrição dos Sistemas de Tratamento

Os reatores em bateladas seqüenciais (RBS) utilizados neste estudo são componentes das Estações de Tratamento de Esgotos Sanitários, de dois diferentes condomínios residenciais, localizados nos bairros João Paulo (Reator 1) e Itacorubi (Reator 2), da cidade de Florianópolis/SC. Projetados para atender diferentes demandas populacionais (Tabela 1), os sistemas foram desenvolvidos (e também operados) pela empresa Rotária do Brasil Ltda., de acordo com as normativas, determinações e padrões de qualidade exigidos para o lançamento de efluentes em corpos d'água, conforme a Resolução CONAMA nº 357/2005 e o Decreto Municipal nº 077/96 de Florianópolis/SC. O Reator 1 encontra-se em operação desde 2005 e o Reator 2 desde 2007.

Os reatores são alimentados com os esgotos sanitários provenientes dos respectivos condomínios residenciais, os quais entram no reator de forma descontínua (escalonada), após serem bombeados da câmara de equalização (última das câmaras componentes do tratamento preliminar).

Tabela 1: Dados adotados no projeto nas diferentes ETE.

	Reator 1	Reator 2
Tipo Ocupação	Residencial	Residencial (83%) Comercial (17%)
População Total	840	440
Contribuição Per Capita	200 L/hab.dia	119L/hab.dia (Residencial=130 L/hab.dia Comercial=50 L/pes./dia)
Vazão Média Diária de Esgoto	141,12 m ³ /dia	54,98 m ³ /dia

Na Figura 1 estão apresentados os reatores 1 e 2 componentes de cada sistema, e na Tabela 2 são apresentadas suas principais características físicas.



Figura 1: Reatores RBS em escala real, utilizados para tratamento biológico de esgoto sanitário.

Nestes reatores, a aeração artificial define o início dos processos de nitrificação. Esta aeração é realizada por meio de um sistema composto por compressores de ar, que enviam o ar comprimido para o interior do reator, passando por uma membrana de bolhas finas. Desta forma, os reatores foram operados através de ciclos de 8 horas, distribuídas nas seguintes fases: enchimento (1h), anóxica (3h), aeróbia (3h) e retirada (1h).

Tabela 1: Características físicas dos reatores componentes de cada sistema de tratamento.

Características	Reator 1	Reator 2
Altura (m)	4,2	3,8
Largura (m)	4,5	3,0
Comprimento (m)	11,15	7,0
Volume total (m³)	155	60
Teor de SST (alta carga)	3	2,5

Amostragem e Monitoramento

As amostras foram realizadas semanalmente (entre os meses de maio e junho de 2010), totalizando 3 semanas para cada Estação. Os pontos determinados para a coleta, em cada sistema de tratamento, foram: 1) câmara de equalização (para a análise do afluente bruto); 2) ponto central de cada reator, para o acompanhamento de cada fase (hora em hora) do tratamento biológico e 3) saída do sistema (para avaliação do efluente tratado). As variáveis físico-químicas analisadas seguiram a metodologia do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), sendo estas: alcalinidade, Demanda Química de Oxigênio total e solúvel (DQO total e solúvel), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e série de sólidos. As variáveis temperatura (°C), pH, Oxigênio Dissolvido (OD) em mg/L, Potencial Redox (ORP) em mV, Condutividade em mS/cm foram medidas *in situ*, utilizando-se uma sonda multiparâmetros YSI 6600. Através de cromatografia iônica (DIONEX DX 120) foram analisados: fosfatos (P-PO₄⁻²), acetato, nitritos (N-NO₂⁻), nitratos (N-NO₃⁻), cloretos e sulfatos. Para a identificação da diversidade microbiológica, foi utilizada microscopia óptica binocular (modelo BX-41 - Olympus) e microscópio invertido (modelo XDS - 1 - Bioval), com as amostras frescas e/ou preservadas em refrigerador. Testes respirométricos foram também realizados de acordo com a metodologia descrita por Wolff e colaboradores (2003), objetivando obter: a respiração endógena (TCOend); consumo de oxigênio durante a nitrificação (TCOA), sem fonte de carbono, após a adição de substrato específico para as bactérias autotróficas; e a respiração exógena (TCOH) com adição de fonte de carbono (substrato para as bactérias heterotróficas), após a adição de um inibidor seletivo da nitrificação com Allylthiourea (ATU). O respirômetro era composto por uma unidade respirométrica fechada (erlenmeyer) com capacidade de 1 L. A amostra (940 mL do “licor misto” coletado no interior do

reator durante a fase aeróbia) foi mantida com aeração e agitação constantes, por meio de uma bomba de aquário e de um agitador magnético. O pH foi mantido entre 7,0 e 7,5. A concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi controlada através de um oxímetro até a estabilização do eletrodo de OD, quando então a aeração era desligada até a queda de 1-2 mg/L de concentração de OD. Em seguida, a aeração era ligada novamente até a estabilização do OD na amostra. Então foram construídos respirogramas com o ajuste da melhor reta e utilizando o coeficiente angular da mesma para se obter o valor da velocidade de respiração celular (TCO), sendo a cada 5 segundos gravados os valores de OD da amostra, para posterior cálculo da velocidade de consumo de oxigênio. A biomassa ativa heterotrófica (BAH) e a biomassa ativa autotrófica (BAA) são calculadas de acordo com o ASM1 – Activated Sludge Model n. 1 (Henze et al., 1987).

RESULTADOS

Os valores de média e desvio-padrão, obtidos nas análises das variáveis físico-químicas, monitoradas no afluente bruto e no efluente final do sistema, de cada estação de tratamento, são apresentadas na Tabela 3. Observa-se pela análise da tabela, que ambos os sistemas de tratamento recebem elevada carga orgânica e amoniacal. Os valores de maior remoção para o para o Sistema 1, referem-se às variáveis DQO total, DQO filtrada, NTK e Amônia, representadas por 52%, 85%, 74% e 92%. No entanto, para o sistema 2, houve remoção apenas das variáveis DQO total e DQO filtrada (66% e 63%, respectivamente), não havendo remoção de NTK e Amônia.

Na avaliação dos reatores ao longo do ciclo (8 horas), observa-se (Figura 2) que o reator 1 apresentou excelente desempenho na remoção de Amônia com valores na entrada entre 31,4 mg/L e 44,8 mg/L (valor médio de 38,08); as etapas de desnitrificação apresentaram valores entre 4,5 mg/L e 7,3 mg/L, (valor médio de 5,6 mg/L); as etapas de nitrificação entre 3,4 mg/L e 7,8 mg/L (média de 4,76 mg/L). O efluente tratado (saída do reator) teve uma concentração média de 3,36 mg/L (variando entre 2,2 e 4,5 mg/L) estando desta forma abaixo de 20 mg/L, atendendo a Resolução nº 357/05 do CONAMA para lançamentos de efluentes em corpos d'água.

Tabela 3: Valores de média \pm desvio padrão, obtidos no afluente bruto e no efluente final (saída) dos Reatores 1 e 2.

Variáveis	Reator 1		Reator 2	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Temperatura (°C)	21,5 \pm 0,01	23,3 \pm 0,05	23,9 \pm 0,5	25,4 \pm 0,1
OD (mg/L)	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,08	0,1 \pm 0,07	0,09 \pm 0,02
pH	6,5 \pm 0,03	6,5 \pm 0,02	7,5 \pm 0,01	7,1 \pm 0,01
Condutividade	590 \pm 0,7	423 \pm 2,5	710 \pm 1,4	769 \pm 2,3
Alcalinidade (mg/L)	223 \pm 94	50 \pm 15	226 \pm 19	215 \pm 6
DQO total (mg/L)	689 \pm 282	333 \pm 102	439 \pm 45	151 \pm 11
DQO filtrada (mg/L)	248 \pm 17	37 \pm 3	320 \pm 30	120 \pm 27
NTK (mg/L)	58 \pm 8	15 \pm 2	39 \pm 4	47 \pm 2
Amônia (mg/L)	38 \pm 9	3 \pm 1	40 \pm 2	34 \pm 3
Nitrito (mg/L)	0	0	0	0
Nitrato (mg/L)	3,1 \pm 1,5	15,7 \pm 5	0	0
SST (mg/L)	430 \pm 123	10 \pm 1	-	-

Quanto ao sistema 2, a mesma eficiência não foi verificada, possivelmente devido à falhas operacionais no aerador, o qual apresentou baixo desempenho de aeração, com valores de OD no reator variando entre 0,6 mg/L e 0,2 mg/L (média de 0,3 mg/L) durante as etapas de nitrificação. Na Figura 3 são apresentados os resultados obtidos ao longo do ciclo em R2, onde observa-se a ineficiência de remoção de amônia, bem como ausência de nitrito e nitrato ao longo de todo processo de tratamento.

Os resultados para os perfis de pH e OD durante o ciclo operacional em R1 e R2 apresentaram para o pH baixa amplitude de variação ao longo do ciclo, em ambos os reatores, com valores entre 6,38 e 6,58 (média de 6,48 para todos os períodos) em R1 e valores entre 7,08 e 6,9 (média de 7,02) para R2. Os valores máximos de pH foram encontrados nos primeiros 60 minutos (média de 7,3 em R1 e 7,52 em R2). Para R1, foram observadas variações na concentração de OD em função da fase anóxica/aeróbia do processo (média de 1,7 mg/L para a fase aeróbia e 0,2 mg/L para a fase anóxica), com valor médio ao

longo do ciclo de 0,8 mg/L. Durante a fase anóxica, a concentração média ficou sempre abaixo de 0,5 mg/L, estando de acordo com o recomendado por Ferreira (2000) como condição ideal para a desnitrificação. No Reator 2, também foi observada variação na concentração de OD em função da fase anóxica/aeróbica do processo porém, devido a ineficiência na aeração registrada nesse período, os valores máximos chegaram apenas a 0,7 mg/L, com mínimo de 0,1 mg/L (média de 0,4 mg/L).

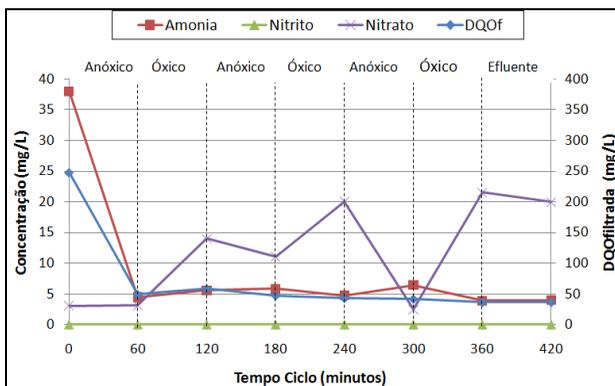


Figura 2: Variação nas concentrações de amônia, nitrito, nitrato e DQO filtrada no reator, ao longo de um ciclo padrão (8 horas) no Reator 1.

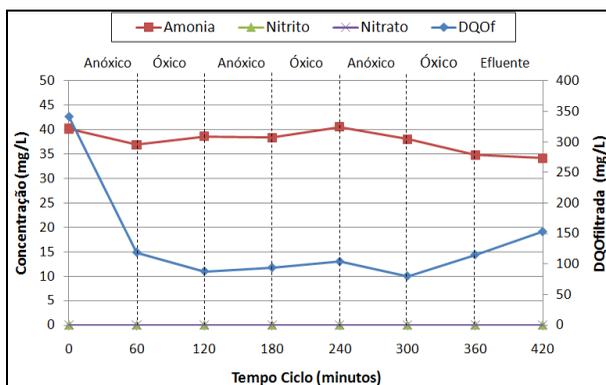


Figura 3: Variação nas concentrações de amônia, nitrito, nitrato e DQO filtrada no reator, ao longo de um ciclo padrão (8 horas) no Reator 2.

Os respirogramas obtidos na determinação da velocidade de consumo de oxigênio dissolvido (TCO) nas três condições: respiração endógena e respiração exógena, em amostras providas de R1 e R2, 24 horas

após a coleta, são apresentados nas Figuras 4 e 5. Na Tabela 4 o valor da velocidade de consumo de OD determinado durante a respiração endógena (TCO_{end}) foi subtraído dos valores obtidos posteriormente (TCO_{XA} e TCO_{XH}), a fim de obter o consumo de oxigênio necessário para metabolizar o substrato adicionado. Pode-se observar pela Tabela 4 que a velocidade de consumo de OD durante a nitrificação apresentou valores máximos para o Reator 1 (5,84) e mínimo para o Reator 2 (0,59) mg O₂/L.h. O mesmo acontece para a respiração exógena, com valores mais elevados de velocidade de consumo de OD no Reator 1 (27,62 mg O₂/L.h) quando comparado ao Reator 2 (11,52 mg O₂/L.h). Costa et al. (2002), utilizando amostras de lodo ativado de um sistema do tipo Bardenpho, obtiveram uma TCO durante a respiração exógena igual a 38,7 mg O₂/L.h, após adição de 170 mg/L de solução de acetato de sódio.

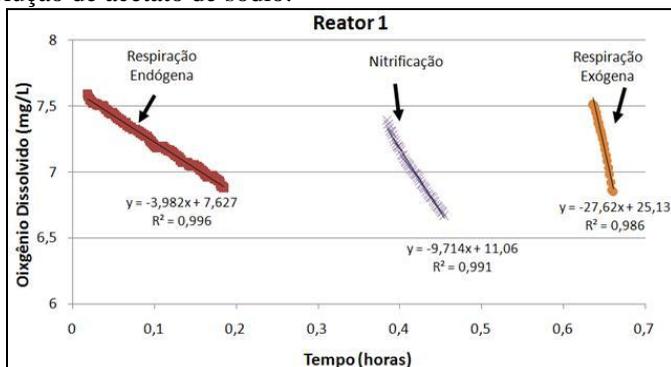


Figura 4: Respirograma obtido para o lodo de R1.

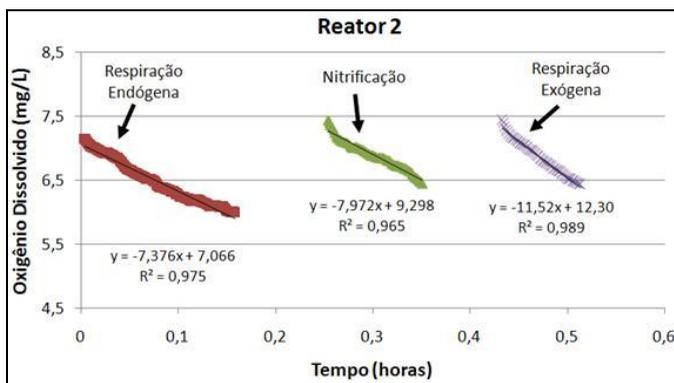


Figura 5: Respirograma obtido para o lodo de R2.

Tabela 4: Resultados de TCO e TCOe dos testes respirométricos.

	Fase	Coefficient e Angu- lar	TCO (mgO ₂ /L.h)	X	TCOe (mgO ₂ / gSS T/L)
Reator 1	Endógena	3,98	3,98	3,03	1,31
	Nitrificação	9,82	5,84	3,03	1,93
	Exógena	27,62	27,62	3,03	9,12
Reator 2	Endógena	7,38	7,38	2,96	2,49
	Nitrificação	7,97	0,59	2,96	0,2
	Exógena	11,52	11,52	2,96	3,89

Quanto à atividade da biomassa heterotrófica (XH) o Reator 1 apresentou concentração de 188,11 mg DQO total/L, representando 94,78% do total de biomassa ativa do sistema enquanto o Reator 2 apresentou 78,46 mg DQO total /L, representando 98,68% do total de biomassa ativa do sistema. A biomassa ativa autotrófica (XA) foi de 10,35 mg DQO total/L para o Reator 1, representando 5,22% do total de biomassa ativa no sistema e para o Reator 2 de 1,05 mg DQO total/L, representando 1,32% da biomassa ativa total no sistema. Os resultados revelaram assim, que a biomassa ativa de ambos os reatores consiste preponderantemente de organismos heterotróficos. Plattes e colaboradores (2007) utilizando ensaios respirométricos para caracterizar a biomassa ativa autotrófica e heterotrófica em um reator biológico de leito móvel, em escala piloto, obtiveram uma concentração de biomassa ativa autotrófica de 49 mg DQO total/L e de heterotrófica de 2230 mg DQO total/L, com 98% da biomassa do sistema formada por bactérias heterotróficas. Wolff e colaboradores (2003) estudando dois reatores híbridos de leito móvel, encontraram elevados valores para a fração de biomassa ativa heterotrófica, chegando a 82% no reator com suporte de polietileno e 74% no reator com plástico reciclado, ambos com idade de lodo de 3 dias.

Quanto às análises microscópicas realizadas nos Reatores, evidenciou-se para R1 a presença de flocos de lodo altamente concentrado, compactados e bem formados, com alta diversidade e poucas bactérias filamentosas, não afetando a sedimentação. Dentre os grupos recorrentes encontrados neste reator cita-se os gêneros *Euglypha* spp., *Rotatoria* sp., cistos de *Vorticella*, *Epistylis* spp. e numerosos Zooflagelados (Figura 6). De acordo com Hoffmann e colaboradores (2007), esses microrganismos são indicadores da estabilidade biológica, boas condições e purificação além de ocorrência de

nitrificação. Para o Reator 2 no entanto, foi observado um lodo com baixa diversidade microbiana, com presença algumas bactérias e fungos filamentosos, bem como bactérias do tipo Zooglea e Begiatoa (Figura 7), indicando baixa oxigenação no meio (Hoffmann et al., 2007).

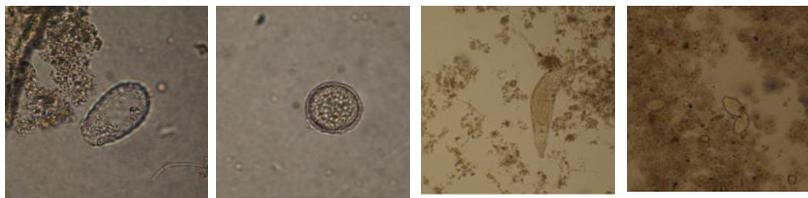


Figura 6: Microrganismos presentes no lodo do RBS 1. Microscopia óptica, aumento 400X. a) *Euglypha* spp; b) Cisto de *Vorticella* sp., c) *Rotatoria* sp.e d) *Epistylis* spp.

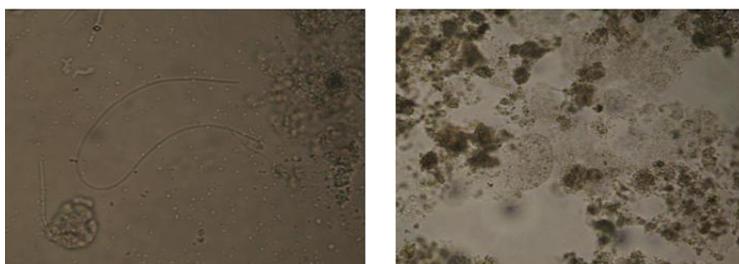


Figura 7: Microrganismos presentes no lodo do RBS 2. Microscopia óptica, aumento 400X. A) *Begiatoa* sp.; B) *Zooglea*.

CONCLUSÕES

Os reatores em bateladas seqüenciais em escala real estudados apresentaram-se com comportamentos divergentes. Houve manutenção da temperatura (em torno de 25°C) e alimentação com elevada carga orgânica e amoniacal em ambos os sistemas. Os valores de maior remoção para o reator 1 referem-se às variáveis DQO total, DQO filtrada, NTK e Amônia, representadas por 52%, 85%, 74% e 92%. No entanto, para o reator 2 houve remoção apenas das variáveis DQO total e DQO filtrada (66% e 63%, respectivamente), não havendo remoção de NTK e Amônia, não atendendo desta forma a Resolução n° 357/05 do CONAMA.

Os resultados para os perfis de pH e OD durante o ciclo operacional em R1 e R2 apresentaram, para o pH, baixa amplitude de variação ao longo do ciclo, em ambos os reatores, com valores entre 6,38 e 6,58 em R1 e entre 7,08 e 6,9 em R2. Para R1, foram observadas variações na concentração de OD em função da fase anóxica/aeróbia do processo (média de 1,7 mg/ L para a fase aeróbia e 0,2 mg/L para a fase anóxica). No Reator 2, devido a ineficiência na aeração registrada nesse período, os valores máximos de OD chegaram apenas a 0,7 mg/L.

Quanto à atividade da biomassa heterotrófica (XH) o Reator 1 apresentou 94,78% do total de biomassa ativa do sistema enquanto o Reator 2 apresentou 98,68%; para a biomassa ativa autotrófica (XA) o Reator 1, apresentou 5,22% do total de biomassa ativa e o Reator 2 1,32%.

As análises microbiológicas revelaram, para o Reator 1, alta diversidade em flocos compactos, formados por microrganismos dos gêneros: *Euglypha* sp., *Rotatoria* sp., *Vorticella* sp. e *Epistylis* sp., além de numerosos Zooflagelados. No Reator 2, as análises apresentaram lodo com baixa diversidade, com presença de bactérias e fungos filamentosas, indicando baixa oxigenação no meio, bem como bactérias do tipo Zooglea e Begiatoa.

Desta forma, observa-se que o Reator 2 necessita de melhorias para que se alcance a satisfatória eficiência de remoção das principais variáveis de monitoramento. Para isso, algumas modificações já foram propostas para esta estação de tratamento, dentre as quais a mais importante inicialmente, que se refere ao ajuste da concentração de oxigênio dissolvido durante a etapa aeróbia do processo biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 21th Ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
2. ARTAN, N.; ORHON, D. Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal. In: IWA Publishing. 99 p. Scientific and Technical Report, n. 19, 2005.

3. COELHO, M. A. Z., RUSSO, C., ARAÚJO, O. Q. F. Optimization of a Sequencing Batch Reactor for Biological Nitrogen Removal. *Water Research*, 34(10): 2809- 2817, 2000.
4. COSTA, A. G.; FERREIRA, A. F.; GUIMARÃES, P.; CATUNDA, S. Y. C.; Van HAANDEL, A. Respirimetria aplicada no sistema de lodo ativado. Influência de interrupções da oxigenação sobre a viabilidade e atividade de lodo ativado. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, 2002.
5. FERREIRA, E. S. Cinética química e fundamentos dos processos de nitrificação e desnitrificação biológica. Em: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais-ABES, Porto Alegre, 2000.
6. HENZE, M.; GRADY, C.P.L.; GUJER, W.; MARAIS, G.V.R.; MATSUO, T. Activated sludge Model No 1. IAWPRC Scientific and Technical Reports No 1. London UK. 1987.
7. HOFFMANN, H; COSTA; T.B.; WOLFF; D.B.; PLATZER, C. e COSTA, R.H.R. The Potential of Denitrification for the Stabilization of Activated Sludge Processes Affected by Low Alkalinity Problems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. V. 50, n. 2 : pp. 329-337. 2007.
8. JENKINS, D.; RICHARD, M.G.; DAIGGER, G.T. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. Lewis Publishers, Boca Raton, 1993.
9. LIN, Y.-F.; JING, S.-R. Characterization of denitrification and nitrification in a step-feed alternating anoxic- oxic sequencing batch reactor. *Water. Environment Research*, 73(5): 526-533, 2001.
10. MCNICHOLL, B.P., MCGRATH, J.W., QUINN, J.P. Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water Research*, 41: 127-133, 2007.
11. PHILIPPI, L. S. Sistemas descentralizados de tratamento de esgotos. Florianópolis: Pandion, 2007. 63p.
12. PLATTES M., FIORELLI D., GILLÉ S, GIRARD C., HENRY E., MINETTE F., O’NAGY O., SCHOSSELER P.M. Modeling and dynamic simulation of a moving bed bioreactor using respirometry for the estimation of kinetic parameters. *Biochemical Engineering Journal*, 33: 253-259, 2007.

13. SOUSA, J. T.; FORESTI, E. Avaliação de reator seqüencial em batelada (SBR) no pós-tratamento de efluentes de reator UASB. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES – RJ, 6 (1 e 2): 9-16, 2001.
14. VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG. Belo Horizonte. 2005, 452p.
15. WOLFF, D. B.; CHAVEZ, J. C. O.; PAUL, E.; COSTA, R. H. R. Estudo da Biomassa Heterotrófica e Autotrófica Ativa Desenvolvida em Reatores Híbridos no Tratamento de Esgoto Urbano. In: SINAFERM2003 – XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis, SC, 2003.