

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS LONDRINA
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

ANA CAROLINA PIEROTTI JACOBS

**INFLUÊNCIA DO MEIO SUPORTE NA FORMAÇÃO DE BIOFILME UTILIZANDO
REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**LONDRINA - PARANÁ
2013**

ANA CAROLINA PIEROTTI JACOBS

**INFLUÊNCIA DO MEIO SUPORTE NA FORMAÇÃO DE BIOFILME
UTILIZANDO REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientador: Profa. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates

LONDRINA - PARANÁ

2013



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná
Campus Londrina
Coordenação de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Monografia

Influência do meio suporte na formação de biofilme utilizando reator em
batelada sequencial

por

Ana Carolina Pierotti Jacobs

Monografia apresentada no dia 12 de setembro de 2013 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho (aprovado, aprovado com restrições ou reprovado).

Prof. Dr. Ajadir Fazolo
(UTFPR)

Profa. Dra. Patrícia C. Lobo Faria
(UTFPR)

Profa. Dra. Kátia Valéria Cardoso Marques Prates
(UTFPR)
Orientadora

Profa. Joseane Debora Peruço Theodoro
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

À memória de Samanta Pierotti Jacobs pelo exemplo de
vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo direito à vida e sempre proporcionar meios para enfrentar todos os desafios impostos.

À minha querida orientadora, professora Dr^a Kátia Valéria Marques Cardoso Prates, pela paciência e dedicação. Obrigada por ao longo desse período estar disposta a ensinar e dedicar tanto carinho a minha pessoa e trabalho. Agradeço profundamente seu papel na minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Sua presença foi caráter importantíssimo para escolhas feitas e superação em momentos difíceis de minha vida.

Aos meus pais, Ana e José, que são exemplos de vida e porto seguro. Obrigada pelos ensinamentos e dedicação nos momentos de maior dificuldade. Vocês tiveram papel fundamental na minha formação.

A minha irmã Giovana que se tornou mais um motivo de inspiração e realização de bons exemplos. Obrigada por permitir que eu seja seu exemplo. E à Samanta, que apesar do pouco tempo, pode me ensinar o valor de cada momento.

Ao meu namorado, Ítalo, pelos incentivos e paciência ao me escutar todos os dias e entender minha ausência.

Aos amigos e companheiros de laboratório que prontamente me auxiliaram e fizeram companhia até nos momentos mais complicados, Bruna Raña, Michel Iuri, Luís Fernando Demetrio, Daniela Nakagawa e Camila Zoe, não tenho palavras para descrever meus agradecimentos.

Muito obrigada aos amigos de turma que compartilharam conhecimentos e momentos de muita alegria. Em especial à Fernanda Bezerra Mangili, Isabela Machado de Tavares, Tais Andrea Albertoni e Erika Ivanagava que nos momentos mais difíceis estiveram presentes e tornaram momentos descontraídos dignos de serem revividos.

À empresa Sanepar pelo apoio e doação do efluente.

Por fim peço desculpa por esquecer de citar alguém, mas agradeço por toda colaboração.

RESUMO

JACOBS, A. C. P. Influência do meio suporte na formação de biofilme utilizando reator em batelada sequencial. 2013. Monografia Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

O lançamento de efluentes sem o devido tratamento é uma das fontes de poluição dos ecossistemas aquáticos, ocasionando mudanças drásticas nas condições ecológicas da água. O tratamento dos efluentes é uma solução para amenizar os danos causados e o tratamento biológico com biofilme tem sido bastante difundido. Esse estudo buscou avaliar a influência de dois meios suportes (espuma de poliuretano e bucha vegetal) na evolução microbiana do biofilme formado em reatores em batelada sequencial operado com esgoto sanitário. Os reatores foram operados por 42 dias com tempo de cada ciclo de 48 horas. Foram analisados as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de bactérias heterotróficas, o número mais provável das bactérias nitrificantes e desnitrificantes (NMP/100mL), nitrogênio amoniacal, nitrato, nitrito, pH, temperatura, biomassa seca aderida, polissacarídeo e exame em microscópico e estereomicroscópio. O pH médio do RBSB ficou em 6,34, RBSE 6,39 e o RBSS 6,62. A temperatura dos reatores manteve-se entre 20 e 25°C. As UFCs de heterotróficas ficaram na ordem de 10^8 a 10^{12} para o RBSB, 10^7 a 10^8 para RBSE, e 10^5 a 10^8 para RBSS O NMP/100mL foi maior no RBSB para o grupo nitrificante e desnitrificante. Constatou-se pelos dados de UFC, biomassa seca aderida e polissacarídeos que a bucha vegetal como material suporte foi mais favorável ao desenvolvimento do biofilme em relação à espuma de poliuretano. O reator contendo espuma de poliuretano apesar de não favorecer o estabelecimento do biofilme nas condições de operação do reator proporcionou melhor conversão do nitrogênio do que o reator contendo a bucha vegetal.

Palavras-chave: Biofilme. Bucha vegetal. Espuma de poliuretano. Reator em batelada sequencial. NMP.

ABSTRACT

JACOBS, A. C. P. **Influence of the support materials on biofilm formation using sequential batch reactor.** Monograph Environmental Engineering course, Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2013.

The eviction of effluents without proper treatment is one of the sources pollutions of aquatic ecosystems, causing drastic changes ecological conditions of water. The effluent treatment is a solution to reduce the damage caused and the biological treatment using biofilm has been widespread. This assignment aimed evaluate the influence of two supports (vegetal loofah and polyurethane foam) for biological removal of organic matter from domestic sewage using a sequential batch reactor. The reactors were operated for 42 days and each cycle has a duration of 48 hours. . It has been analyzed CFU/mL, MPN/100mL, ammonia, nitrate, nitrite, pH, temperature, dry biomass adhered, polysaccharide and microscopic and stereoscopic examination. The RBSB pH average was 6,34, RBSE 6,39 and RBSS 6,62. The reactor temperature was maintained between 20 and 25°C. The UFCs of the heterotrophics were on the order of 10^5 to 10^{12} for the RBSB, 10^7 to 10^8 for the RBSE, and 10^5 to 10^8 for the RBSS. The MPN/100mL was highest on RBSB for the group of nitrifying and denitrifying. It was found, through UFCs datas, dry biomass adhered and polysaccharides, that the vegetal loofah as support material was more favorable to the development of the biofilm than polyurethane foam. The polyurethane foam although not favor the establishment of biofilm on the imposed conditions provided good removal of nitrogen by the process via nitrite.

Keywords: Biofilm. Vegetal Loofah. Polyurethane foam. Sequencing batch reactor. MPN.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Esquema do biofilme em reatores.....	24
Figura 02: Representação da formação do biofilme. Em (a) Colonização primária do meio suporte, (b) o crescimento e a divisão celular, produção de exopolissacarídeo, (c) adesão de células individuais ou grupos e em (d) a maturação do biofilme.	25
Figura 03: Localização da ETE-Norte no município de Londrina – PR.	26
Figura 04: Coleta do esgoto sanitário na ETE -Norte após o tanque desarenador.	27
Figura 05: Em (a) conjunto de reatores confeccionados em PVC, em (b) interior do reator contendo espuma de poliuretano e suporte com lâminas de vidro. ..	28
Figura 06: Material suporte utilizado. Em (a) bucha vegetal e em (b) espuma de poliuretano.....	28
Figura 07: Efeito sobre a concentração de oxigênio dissolvido.....	31
Figura 08: Procedimento de diluição em série e contagem em placa do ensaio quantitativo para bactérias heterotróficas. Em (a): Tubo Falcon com 10g de pérolas de vidro, (b) agitação do tubo contendo o meio suporte em vórtex, (c) preparação da diluição em série e em (d) plaqueamento em triplicata meio PCA das diluições selecionadas.....	33
Figura 09: Fluxograma dos procedimentos de análise dos tubos de BOA quanto a produção de nitrito.....	36
Figura 10: Fluxograma dos procedimentos de análise dos tubos de BON quanto a produção de nitrato.	36
Figura 11: Fluxograma dos procedimentos de resultados dos tubos de desnitrificante.	38
Figura 12: Procedimento para quantificação da biomassa seca. Após a retirada do meio suporte do RBS, esse era colocado em cadinhos, pesados, e secado em estufa por 12 horas a 105°C.....	39
Figura 13: Gráfico do comportamento do pH ao longo do monitoramento dos reatores e efluente.	42
Figura 14: Comportamento da temperatura ao longo do monitoramento dos reatores com diferentes meios suportes.	44
Figura 15: Quantidade de bactérias heterotróficas em RBS com diferentes meios suportes. O dia zero de operação a estimativa foi realizado no efluente bruto, ou seja, no inoculo.	47
Figura 16: Valores apresentados de bactérias nitrificantes e desnitrificantes. .	50
Figura 17: Perfil de concentração de biomassa seca aderida ao meio suporte em RBS.....	52
Figura 18: Comportamento do percentual da concentração de polissacarídeos nos meios suportes.	54
Figura 19: Fotos do meio suporte-bucha vegetal observadas em estereomicroscópio. Em (a) 7 dias de operação; (b) 14 dias de operação; (c) 21 dias de operação e em (d) 28 dias de operação. Aumento de 20x.	56
Figura 20: Microrganismo semelhante ao ácaro, aumento de 20x.....	56
Figura 21: Material aderido a espuma de poliuretano, aumento de 20x.....	57
Figura 22: Protozoários presente no esgoto sanitário.....	58
Figura 23: Presença de <i>Vorticellas</i>	58

Figura 24: Diversidade microbiológica encontrada nas lâminas de vidro inseridas nos reatores. Em (a) estreptobacilos,(b) estreptococos, (c) vibrião, (d) estafilococos, (e) bacilos e em (f) cocos. Objetiva de 100x..... 59
Figura 25: Dendograma as colônias caracterizadas segundo Rodina (1972).. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:Valores típicos dos parâmetros dos esgotos domésticos.....	12
Tabela 02:Fatores na formação e comportamento do biofilme.	22
Tabela 03: Relação e frequência das análises físico-químicas.....	29
Tabela 04: Relação e frequências as análises microbiológicas.	32
Tabela 05: Meios de cultura específicos para grupo de bactérias nitrificantes	35
Tabela 06: Exemplo de resposta do teste para BOA.	37
Tabela 07: Meio de cultura específico para grupo de bactérias desnitrificantes	37
Tabela 08: Preparação das amostras para obtenção da curva de Calibração - Polissacarídeos	40
Tabela 09: Valores máximo, mínimo e médio do pH encontrado nas análises.	43
Tabela 10: Temperaturas máximas, mínimas e médias dos reatores e a temperatura ambiente ao longo da operação de operações dos reatores.	44
Tabela 11: Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal em cada um dos RBS.....	45
Tabela 12: Resumo dos valores encontrados para nitrato e nitrito nos RBS. ..	46
Tabela 13: Valores de UFC/mL encontrados nos RBS.	47
Tabela 14: Valores do NMP/100 mL em cada reator estudado.....	50
Tabela 15: Concentração em gramas da biomassa seca aderida ao meio suporte.	52
Tabela 16: Concentração de polissacarídeos encontrados no RBSB.	54
Tabela 17: Superfície coberta dos meios suporte nos RBS.	55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	9
3 REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1 SANEAMENTO BÁSICO – A QUESTÃO DO ESGOTO SANITÁRIO	10
3.2 TRATAMENTOS BIOLÓGICOS	12
3.2.1 Reator em batelada sequencial	14
3.3 MICRORGANISMOS PRESENTES NO TRATAMENTO DE EFLUENTE... ..	15
3.3.1 Bactérias	16
3.3.1.1 Bactérias Heterotróficas	17
3.3.1.2 Bactérias nitrificantes e desnitrificantes	18
3.4.2 Protozoários	20
3.4 BIOFILMES	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 COLETA DO EFLUENTE: ESGOTO SANITÁRIO	26
4.2 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL	27
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	29
4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	32
4.4.1 Ensaio quantitativo de bactérias heterotróficas	32
4.4.2 Bactérias nitrificantes e desnitrificantes	34
4.4.3 Quantificação da biomassa seca aderida	38
4.4.4 Concentração de polissacarídeos aderidos	39
4.4.5 Ensaio qualitativo da formação de biofilme	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1 ANÁLISES FÍSICO- QUÍMICAS	42
5.1.1 pH	42
5.1.2 Temperatura	43
5.1.3 Nitrogênio	45
5.1.4 Respirometria	46
5.2 ENSAIO QUANTITATIVO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS	47
5.3 BACTÉRIAS NITRIFICANTES E DESNITRIFICANTES	49
5.4 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA SECA ADERIDA	51
5.5 CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	53
5.6 ENSAIOS QUALITATIVOS	55
5.6.1 Análises em estereomicroscópio	55
5.6.2 Análises em microscópio	57
6. CONCLUSÕES	61
REFERENCIAS	62

INTRODUÇÃO

O saneamento básico é um dos requisitos fundamentais para garantir a qualidade de vida da sociedade e tem sido motivo de grande preocupação em todo o mundo. O descarte de efluentes doméstico e industrial nos corpos receptores é um fator que compromete e atinge diversos níveis de uma cadeia extensa, incluindo desde a própria qualidade da água, como a preservação de espécies e a saúde da população.

Nesse contexto, vê-se a necessidade de tomadas de decisões para reverter o quadro de deterioração da qualidade dos recursos hídricos sendo um dos objetivos o tratamento dos efluentes, domésticos ou industriais, antes do seu lançamento, já que podem apresentar em sua composição elevada concentração de poluentes como o nitrogênio.

Os efluentes podem ser tratados por processos químicos ou biológicos. No caso da remoção do nitrogênio por ação biológica tem-se os processos conhecidos como nitrificação/desnitrificação.

A essência dos tratamentos biológicos está na capacidade dos microrganismos envolvidos transformarem a matéria orgânica biodegradável poluente em subprodutos que possam ser removidos ou descartados no tratamento sem prejudicar o recurso hídrico. Esse tipo de tratamento ainda depende fundamentalmente dos microrganismos estarem adaptados ao efluente a ser tratado e serem resistentes às variações do processo.

O tratamento de efluentes pode ser realizado por processos biológicos como em reatores em batelada sequencial com biomassa aderida. Estes proporcionam uma maior quantidade de microrganismos presentes no reator durante o tempo de ciclo e conseqüentemente apresenta atividade microbiana maior que reflete diretamente na redução dos nutrientes e matéria orgânica presente no efluente.

Baseado no que foi apresentado, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência de dois meios suportes (espuma de poliuretano e bucha vegetal) na colonização microbiana do biofilme formado em reatores em batelada sequencial (RBS) operado com esgoto sanitário.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi o de acompanhar a evolução da biomassa aderida em dois reatores em batelada sequencial operado com efluente sanitário bruto utilizando diferentes meios suportes comparando com um reator sem meio suporte.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Para alcançar o objetivo geral desta pesquisa, visou-se:

- ✓ Monitorar os parâmetros temperatura e pH no período de operação dos reatores;
- ✓ Determinar os valores inicial e final de nitrogênio amoniacal e de nitrato;
- ✓ Quantificar pela técnica de respirometria o oxigênio dissolvido consumido no final da operação;
- ✓ Caracterizar, inicialmente, a comunidade de bactérias heterotróficas, nitrificantes e desnitrificantes presentes no efluente sanitário utilizado para operar os reatores, e ao final da operação nos meios suportes e no efluente do reator sem meio suporte;
- ✓ Quantificar a biomassa aderida aos suportes pela análise de biomassa seca aderida e concentração de polissacarídeos;
- ✓ Caracterizar a comunidade bacteriana envolvida no processo de remoção de nitrogênio (nitrificantes e desnitrificantes) nos meios suportes presente nos reatores e no reator sem meio suporte no final da operação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 SANEAMENTO BÁSICO – A QUESTÃO DO ESGOTO SANITÁRIO

A água é um recurso natural escasso, de uso público e renovável (Lei 9.433/1997) indispensável à vida. O crescimento populacional associado ao mau uso desta tem influenciado diretamente na sua qualidade. Como por exemplo, o lançamento de efluentes domésticos e industriais nos rios quando não há um tratamento adequado, promove a degradação do corpo hídrico

A população grega foi a primeira a se preocupar com o esgotamento doméstico gerado nas cidades, desenvolvendo um sistema de canais que os transportava para a área agrícola para que pudesse ser aplicado nas lavouras. Já a implantação de sistemas de tratamento de esgoto doméstico só ocorreu a partir do final do século XIX e início do XX (LEME, 2010).

É adequado transcrever, que segundo a Lei 11.445/2007, saneamento básico é um conjunto de serviços, infraestruturas e instalações operacionais de abastecimento de água potável, esgotamento sanitário, limpeza urbana e manejo de resíduos sólidos, e, drenagem e manejo das águas pluviais urbanas.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelou em sua Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (IBGE, 2010) um aumento nos municípios brasileiros que apresentam serviço adequado de coleta de esgoto sanitário. Apesar do quadro crescente do serviço ofertado a pesquisa ressalta que apenas o Distrito Federal, São Paulo e Minas Gerais atendem mais que a metade dos domicílios por rede coletora de esgoto. O Paraná e o Rio de Janeiro atendem quase metade dos domicílios e ficam acima da média nacional que é de 44,0%.

O Atlas de Saneamento (RODRIGUES; SILVA, 2011) apresenta uma realidade preocupante onde a rede de coleta de esgoto sanitário, como política pública, desenvolveu-se predominantemente em áreas onde as pressões demográficas são maiores. Dessa forma, cidades que apresentam grande densidade demográfica são melhores assistidas assim como aquelas no seu entorno.

A cidade de Londrina, no Paraná, pode ser considerada um exemplo desse quadro. No ano de 2000 aproximadamente 63% dos domicílios eram atendidos pela rede de esgoto, ou seja, 78.207 de um total de 124.710 domicílios (BARROS, 2008). Em 2011, o índice de atendimento da rede coletora e tratamento de esgoto subiu para 87,30% e até 2013 pretende-se chegar a 93% o atendimento (SANEPAR, 2011).

Os esgotos sanitários podem ser considerados como aquele que provêm, principalmente, de residências, estabelecimentos comerciais ou qualquer edificação que utilize a água para fins domésticos. O esgoto é composto essencialmente da água do banho, excretas, restos de comida, sabão, detergentes e água de lavagem (JORDÃO; PESSOA, 2005). Os esgotos sanitários são constituídos essencialmente por água. Nas fezes estão cerca de 25% da matéria orgânica e na urina 2,5% (FUNASA, 2006).

As características físicas e químicas dos esgotos variam quantitativa e qualitativamente. As características físicas são: matéria sólida; temperatura; odor; cor; e turbidez. As químicas são, principalmente, matéria orgânica e inorgânica (JORDÃO e PESSOA, 2005).

O esgoto é constituído aproximadamente por 70% de matéria orgânica, em uma combinação de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. As substâncias orgânicas geralmente encontradas são compostos de proteína (40 a 60%), carboidratos (25 a 50%), gorduras e óleos (10%) e outros em menores porcentagens. A matéria inorgânica contida nos esgotos é formada por presença de areia e de substâncias minerais dissolvidas (FUNASA, 2006).

Os principais parâmetros analisados e seus valores típicos dos esgotos domésticos podem ser visualizados na Tabela 01.

No Brasil, a resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA 357/2005 dispõe sobre a classificação dos corpos hídricos e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, tendo como objetivo controlar o lançamento de poluentes no meio ambiente.

Visando um melhor controle dos poluentes lançados, em 2011 o Conselho publicou a resolução CONAMA 430/2011 que complementa e altera a resolução CONAMA 357/2005 nas condições e padrões de lançamento de efluente.

Tabela 01: Valores típicos dos parâmetros dos esgotos domésticos.

Tipo de parâmetro	Parâmetro	Carga total (kg/hab.dia)	Concentração (mg/L)
Físicos	Sólidos suspensos	0,07	300
	Sólidos Dissolvidos	0,10	440
Químicos	DBO ₅	0,06	250
	DQO	0,11	500
	TOC (Carbono orgânico total)		160
	N _{total}	0,01	40
	N _{orgânico}		15
	Amônia (NH ₄ -N)		25
	Nitritos		0
	Nitratos		0
	P _{total}	0,002	9
	P _{orgânico}		4
	P _{inorgânico}		6
	Alcalinidade		100
Microbiológico	Coliformes Totais		0,1 – 1 (10 ⁹ NMP/L)
	Coliformes Fecais		1-10 (10 ⁹ NMP/L)

Fonte: Múrias dos Santos (2002) adaptado de Kiely (1998).

O Artigo 21 (CONAMA 430/2011) estabelece as diretrizes para o lançamento de efluentes de sistema de tratamento de esgotos sanitários, entre as quais destacam-se: pH (entre 5 e 9); temperatura (inferior a 40°C); materiais sedimentáveis; demanda bioquímica de oxigênio; óleos e graxas; e, materiais flutuantes (ausência).

3.2 TRATAMENTOS BIOLÓGICOS

O aumento do rigor dos padrões de lançamento de efluentes líquidos e de resíduos sólidos contribuiu indubitavelmente para o processo de tratamento. Dessa forma, torna-se necessário encontrar alternativas para a remoção dos compostos poluentes com maior eficiência, novas alternativas de tratamento, unidades menores visando uma economia financeira na construção e operação, desenvolvimento de tecnologias para o gerenciamento das estações entre outros.

O tratamento de efluentes líquidos pode ser físico-químico, biológico ou misto. Estações de tratamento biológico de efluentes apresentam-se como uma alternativa bem difundida, essas utilizam microrganismos para a conversão da

matéria orgânica e inorgânica das águas residuárias industriais ou urbanas em produtos finais oxidados.

Os sistemas biológicos podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com a locação da biomassa dentro do reator: biomassa em suspensão e biomassa fixa. Um terceiro grupo pode ser criado caso una-se os dois tipos sendo conhecido como um sistema híbrido de tratamento (LAMEGO NETO, 2008).

O processo de tratamento de efluente de esgoto com biomassa em suspensão costuma ser aquele constituído por sistemas naturais, como lagoas de estabilização ou lodos ativados (LAMEGO NETO, 2008).

Segundo Jordão e Pessoa (2005) o lodo ativado pode ser definido como flocos produzidos através do crescimento de bactérias e outros organismos na presença de oxigênio dissolvido.

Os autores descrevem, ainda, que durante o tratamento, o efluente é misturado com o lodo ativado em tanques de aeração ou reatores biológicos após o tempo de detenção necessário, o lodo é separado do efluente por sedimentação. Parte do lodo retorna ao processo e a outra parte é descartada para a destinação final ou ainda poderá ser utilizado como adubo caso atenda as legislações pertinentes.

Os processos de tratamento de efluentes com biomassa fixa são aqueles que utilizam um meio suporte para fixação dos microrganismos. As características do material influenciam diretamente na eficiência de remoção de poluentes do efluente (LAMEGO NETO, 2008).

A concentração elevada de microrganismos ativos nos suportes proporciona uma maior velocidade de remoção e menor produção de lodo, apresentam uma capacidade boa de absorver cargas de nutrientes repentinas, permitindo uma estabilidade maior do sistema, baixo tempo de retenção hidráulica e a possibilidade de reatores mais compactos (TAVARES, 1992; FLORENCIO et al., 2009).

Acredita-se que a presença de biofilmes em sistemas de tratamento auxilia na remoção de nitrogênio, uma vez que a elevada quantidade de microrganismos fixados retiram de forma eficiente os nutrientes presentes no efluente e sua camada aderida desenvolve-se de forma crescente.

O tratamento com biomassa fixa apresenta vantagem em relação ao processo com lodo ativado, uma vez que, é menos dependente de boa decantação, menor sensibilidade a toxinas e apresenta coexistência da atividade metabólica anóxica e aeróbia dentro de um mesmo micro ecossistema de biomassa (LAMEGO NETO, 2008 e GONÇALVES et al., 2001).

3.2.1 Reator em batelada sequencial

Os reatores em batelada sequencial (RBS) formam um sistema biológico de tratamento de águas residuárias, onde se realiza, na mesma unidade, a oxidação da matéria carbonácea, a remoção de nutrientes e a sedimentação (separação sólido/líquido), sendo que o sistema pode ser constituído por um ou mais reatores (SOUZA; FORESTI, 2001).

Os reatores em batelada sequencial têm sido bastante utilizados para o tratamento de efluentes industriais, uma vez que, com algumas modificações pode alcançar a nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo. Ainda apresentam vantagens em relação a outros sistemas, principalmente em ocasiões onde o efluente é produzido em curto espaço de tempo, onde possam ocorrer diferentes vazões e/ou carga orgânica (VON SPERLING, 1996; DE LUCCA e FACCIN, 1991).

Segundo Artan e Orhon (2005) um ciclo padrão do RBS possui cinco fases operacionais, entre elas: a fase do enchimento; a fase de reação; fase de decantação ou sedimentação; fase de retirada e fase de repouso.

Na fase de enchimento acontece a entrada do efluente bruto ou decantado no reator, aconselha-se que o preenchimento seja feito de forma estática para que não ocorra a mistura entre lodo e o afluente, dessa forma é melhor que a aeração seja suspensa neste período (ARTAN; ORHON, 2005).

A fase de reação tem início quando os aerados são acionados e ocorre a mistura da massa líquida contida no reator. Nessa etapa as bactérias degradam a matéria orgânica e nutrientes. A principal função nessa etapa do tratamento é que ocorra a nitrificação seguida da desnitrificação, consegue-se alcançar esse objetivo interrompendo a aeração durante a reação

prevalecendo condições anóxicas durante um período de tempo (ARTAN; ORHON, 2005).

Durante a fase de decantação ou sedimentação ocorre o desligamento dos aeradores e os sólidos em suspensão sedimentam no interior do tanque, dessa maneira a concentração de sólidos totais do fundo deve aumentar. Após a fase de decantação o efluente tratado é drenado do sistema (fase de retirada) (ARTAN; ORHON, 2005).

Por fim acontece a fase de repouso onde o excesso de lodo poderá ser retirado e o lodo remanescente permanecerá em repouso no reator até o início do próximo ciclo de operação (ARTAN; ORHON, 2005).

Segundo Costa (2005), uma desvantagem nos sistemas em batelada sequencial refere-se ao descarte do efluente tratado de forma pontual a cada término de ciclo, o que pode ocasionar choque de carga no corpo receptor se o tratamento não foi bem realizado.

As vantagens do reator em batelada sequencial são: flexibilidade de ajuste no tempo de ciclo e condições de operação; a reação ocorre em um único tanque reduzindo custos financeiros e operacional; descarta a necessidade de reciclo de lodo e minimiza o arraste dos microrganismos do reator biológico, onde as bactérias autotróficas crescem mais lentamente (RUBINO *et al.*, 2003).

3.3 MICRORGANISMOS PRESENTES NO TRATAMENTO DE EFLUENTE

Segundo Rubino *et al.* (2003) os processos biológicos de tratamento de forma geral envolvem numerosos tipos de microrganismos, uma vez que, o efluente a ser tratado contém quantidade elevada de energia sob forma de nutrientes, sendo sua proporções variáveis dependendo das características do efluente.

Os microrganismos apresentam organização celular simples (unicelulares e multicelulares) e desempenham papel importantíssimo na reciclagem dos nutrientes no meio ambiente (SANT'ANNA Jr, 2010).

Em termos da avaliação da qualidade da água, os microrganismos assumem um papel de maior importância dentre os seres vivos, devido à sua

grande predominância em determinados ambientes, à sua atuação nos processos de depuração dos despejos ou à sua associação com as doenças ligadas à água (VON SPERLING, 2005).

A utilização de microrganismos no saneamento básico e ambiental é prática comum desde os primórdios do desenvolvimento dos processos biológicos de tratamento de águas residuárias e resíduos sólidos. É evidente, que a capacidade microbiana de catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraíndo desses compostos fontes nutricionais e energéticas, é o que possibilitou o emprego desses agentes biológicos, pela engenharia sanitária, como solução aos problemas gerados pelos rejeitos lançados no meio ambiente (AZEVEDO, 1998).

O papel desempenhado pelos microrganismos depende do processo a ser utilizado. Por exemplo, no tratamento de esgotos utilizando uma lagoa de estabilização facultativa, as algas têm uma função fundamental, relacionada à produção de oxigênio pela fotossíntese. O projeto das lagoas é feito de forma a otimizar a presença de algas no meio líquido e a obter um adequado equilíbrio entre bactérias e algas. Nos sistemas anaeróbios de tratamento, as condições são favoráveis, ou mesmo exclusivas, ao desenvolvimento de microrganismos adaptados funcionalmente à ausência de oxigênio (VON SPERLING, 1996).

A massa microbiana envolvida nos processos aeróbios é constituída basicamente por bactérias e protozoários. Outros organismos, como fungos e rotíferos podem ser eventualmente encontrados, mas sua importância é menor. Os rotíferos são eficientes no consumo de bactérias dispersas e pequenas partículas de matéria orgânica. A sua presença no efluente indica um eficiente processo de purificação biológica. De maneira geral, pode-se dizer que a diversidade de espécies dos vários microrganismos componentes da biomassa é baixa (VON SPERLING, 1996).

3.3.1 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares procariotos, podendo apresentar-se isoladamente ou formando colônias do tipo filamentosas, semelhantes a cachos de uva e outros. A classificação quanto a forma da

célula inclui as categorias: esférica, bastonete e espiralada (VON SPERLING, 1996).

A reprodução bacteriana se dá, principalmente, por divisão binária, além da formação de esporos e reprodução sexuada. O crescimento das bactérias é um processo complexo que envolve numerosas reações anabólicas e catabólicas. Em um meio de cultura rico, sob condições ideais, uma célula pode-se reproduzir em aproximadamente 10 minutos, mas há casos que podem levar anos (MAIER *et al.*, 2009).

O grupo de bactérias é o de maior importância e presença nos sistemas de tratamento biológico, sua principal função é a remoção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sendo as bactérias heterotróficas as principais agentes deste processo (VON SPERLING, 1996).

3.3.1.1 Bactérias Heterotróficas

Os organismos vivos podem ser agrupados em categorias de acordo com a forma que usam o carbono e a energia do ambiente. As bactérias heterotróficas obtêm o carbono a partir de compostos orgânicos para o seu desenvolvimento (GERALDI, 1994).

Esse grupo de microrganismos pode ser dividido em subgrupos sendo: bactérias foto-heterotróficas (geralmente não são importantes no tratamento de efluentes) e quimio-heterotróficas (VON SPERLING, 1996).

Os organismos foto-heterotróficos utilizam a luz como fonte de energia e sua fonte de carbono são os álcoois, ácidos graxos, alguns ácidos orgânicos e carboidratos. Os organismos quimio-heterotróficos, geralmente, usam o mesmo composto como fonte de energia e carbono (TORTORA *et al.*, 2005).

Fatores como pH e temperatura são fundamentais para o desenvolvimento das bactérias heterotróficas. Segundo Geraldi (1994) o pH típico para crescimento está próximo da neutralidade, ou seja, 7,0 mas há microrganismos que desenvolvem-se no pH mínimo de 5,5 e máximo entre 8,5 e 9,5. Em relação a temperatura irá depender em qual grupo as bactérias

heterotróficas se encontram, por exemplo, as bactérias mesofílicas tem a temperatura ideal em aproximadamente 30 a 35°C.

As bactérias heterotróficas podem degradar a maioria das substâncias que são encontradas naturalmente no ambiente, mas materiais como, a lignina, são degradados mais lentamente. As espécies de bactérias presentes no efluente estão intimamente ligadas com a composição deste (GERALDI, 1994).

O principal papel das bactérias heterotróficas no tratamento de águas residuárias é a remoção de compostos orgânicos solúveis e insolúveis. A maior massa microbiana envolvida no processo de tratamento consiste em organismos aeróbios heterotróficos (GERALDI, 1994).

3.3.1.2 Bactérias nitrificantes e desnitrificantes

As águas residuárias podem apresentar diversos contaminantes biodegradáveis como: compostos orgânicos, compostos orgânicos voláteis, metais tóxicos, sólidos suspensos, nutrientes e patógenos microbianos e parasitas (BITTON, 2005). Dentre eles encontra-se o nitrogênio, que em altas concentrações, causam eutrofização nos corpos d'água receptores dos efluentes podendo dependendo da sua espécie ser tóxicos a biota presente.

Os problemas ambientais associados às diversas formas de compostos nitrogenados atingem não somente as águas, mas também o solo e a atmosfera. Além da eutrofização podem causar odor e sabor desagradável em águas para consumo e diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (ISOLDI & KOETZ, 2004).

No ciclo do nitrogênio, o nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) é oxidado para produzir nitrato (NO_3), mas antes é oxidado em nitrito (NO_2). Esse processo é denominado nitrificação e é demonstrado em (1):



O outro processo conhecido como desnitrificação (2), segundo Tortora (2005), utiliza do nitrato como aceptor de elétrons para transformar em gás nitrogênio passando também pelo nitrito.



A nitrificação pode ser considerada um processo vulnerável no tratamento de efluentes, uma vez que, o crescimento das bactérias nitrificantes apresenta velocidade baixa por serem microrganismos autotróficos e a sensibilidade com condições do meio como o pH, temperatura e oxigênio dissolvido (CAMPOS, 2006).

As bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e as bactérias oxidadoras de nitrito (BON) são responsáveis pelo processo de nitrificação e os gêneros habitualmente encontrados são *Nitrosomonas* e *Nitrosospira* para as oxidadoras de amônia e para as oxidadoras de nitrito são as *Nitrobacter* e *Nitrospira* (TORTORA, 2005).

Para que o processo de nitrificação ocorra em um sistema de tratamento biológico é necessário atentar-se a alguns parâmetros de projeto como: tempo de retenção celular, configuração do sistema e tempo de detenção hidráulica. Além das condições operacionais: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, alcalinidade, relação entre carbono e nitrogênio (C/N), concentração de amônia livre, toxicidade e outras (OLIVEIRA, 2012).

Os microrganismos nitrificantes apresentam uma tendência a liberar polímero extracelular facilitando sua fixação na matriz de lodo. Portanto, a presença de materiais suportes otimiza a adesão dos microrganismos, evitando sua lavagem do sistema (GODOY, 2007).

O processo de desnitrificação ocorre quando há disponibilidade de matéria orgânica biologicamente biodegradável, sendo o carbono a fonte de energia para a geração de material celular (FREITAS, 2009) e na ausência de oxigênio dissolvido. O grupo de bactérias desnitrificantes apresenta velocidade de crescimento superior as nitrificantes, uma vez que são na maioria bactérias heterotróficas e utilizam o substrato orgânico como fonte de carbono orgânico, ou são facultativas, isto é, em ambiente aeróbia utilizam o oxigênio como

receptor final de elétrons e em ambientes anaeróbios utilizam o nitrato e/ou nitrito como receptor de elétrons.

Fatores que influenciam a desnitrificação podem ser: a concentração de nitratos; a ausência de oxigênio dissolvido; pH e temperatura (BITTON, 2005).

Os gêneros de bactérias desnitrificantes mais encontrados são *Pseudomonas*, *Paraccocus*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Spirillum*, *Bacillus*, entre outros, porém a diversidade dos microrganismos varia com o tipo de água residuária e a operação do sistema (OLIVEIRA, 2012).

Ao analisar o ciclo do nitrogênio percebe-se que o nitrito é um produto intermediário comum nos dois processos. Dessa forma, alguns sistemas de tratamento tentam conduzir a oxidação do nitrogênio até nitrito e pela desnitrificação o nitrito para gás nitrogênio pulando uma fase a fim de economizar tempo de execução do processo e recursos financeiros. Esse processo é conhecido como nitrificação via curta ou via nitrito.

A nitrificação por via curta pode proporcionar uma economia de até 25% na demanda de oxigênio dissolvido e até 40% na demanda de matéria orgânica necessária para desnitrificação (BLACKBURNE et al, 2008 apud FREITAS, 2009).

3.4.2 Protozoários

Os protozoários são organismos unicelulares, eucariotas, constituídos por uma massa de protoplasma. A grande maioria são organismos heterotróficos e aeróbios estritos. Estes organismos podem se alimentar de bactérias e costumam apresentar tamanho superior as bactérias. Suas principais atuações são: consumo da matéria orgânica, consumo de bactérias livres e participação na formação de flocos (VON SPERLING, 1996).

Os principais grupos de protozoários encontrados são: flagelados, amebas, ciliados de vida livre, e rotíferos. Os flagelados são organismos pequenos (5 a 20 μ m), costumam ter forma oval e se locomovem com auxílio de

flagelos. As amebas variam de tamanho e forma (10 a 200 μ m) e se movimentam via pseudópodes ("falsos pés"). Algumas espécies podem apresentar uma carapaça dura chamada de "teca" (JENKINS *et al.*, 2003).

Os ciliados de vida livre apresentam forma oval e tamanho variando de 20 a 400 μ m, sua motilidade ocorre por meio dos batimentos dos cílios. Os rotíferos apresentam uma variedade de formas, são muito maiores e tem estruturas mais complexas que outros protozoários (JENKINS *et al.*, 2003).

3.4 BIOFILMES

Os biofilmes microbianos são aglomerados complexos, formados por microrganismos aderidos a uma superfície sólida ou semi sólida em ambiente aquoso envoltos por uma matriz de exopolissacarídeo (DONLAN; COSTERTOM, 2002 apud CULLER, 2010).

Segundo Soares (2003), os biofilmes são heterogêneos e constituídos praticamente por água, variando seu teor de 79 a 95%, e pela matriz de polímeros externos que vão proporcionar a aderência e integridade estrutural. Esses proporcionam grande diversidade de espécies microbianas podendo ser bactérias, fungos, protozoários, microalgas e vírus. As bactérias são os organismos que melhor produzem o biofilme, pois apresentam características propícias como tamanho reduzido, boa capacidade de adaptação, alta taxa de reprodução e estruturas extracelulares que as protegem do meio que as circulam (CHAVES, 2004).

O desenvolvimento bacteriano no biofilme está ligado à presença de matéria orgânica, oxigênio e micronutrientes disponíveis. Fatores como temperatura, presença de agentes microbianos, quantidade de inóculo, forças hidrodinâmicas, características do substrato e variação de pH também podem interferir na dinâmica e desenvolvimento dos biofilmes (CHAVES, 2004). Almeida (2007) elencou, em síntese, alguns fatores importantes na formação e comportamento do biofilme aderido que podem ser observados na Tabela 02.

Os sistemas de tratamento que visam à remoção do nitrogênio têm o processo com biofilme como um aliado, pois a retenção da biomassa favorece

o desenvolvimento das bactérias nitrificantes, uma vez que, impede o arraste desta do reator (ROUSE *et al.*, 2007).

Tabela 02:Fatores na formação e comportamento do biofilme.

Fator Interveniante	Característica	Aspectos recorrentes
Espécie e fisiologia microbiana	Biológica	Alguns microrganismos produzem maior quantidade de polímeros extracelulares, facilitando a aderência a superfície sólida. Compatibilidade hidrofílica ou hidrofóbica do microrganismo com a superfície sólida.
Rugosidade da superfície sólida	Física	Atua na formação primária do biofilme por dificultar o arraste de partículas e microrganismos
Constituintes presentes, pH e temperatura do líquido em contato com o biofilme	Química	A composição do substrato seleciona os microrganismos no biofilme. A concentração do substrato pode influenciar na estrutura do biofilme. Maiores concentrações de matéria orgânica tendem a elevar a espessura do biofilme. O pH do líquido altera a ação eletrostática entre os microrganismos e a superfície de contato. Pode controlar o desenvolvimento de espécies predominantes como fungos e bactérias. A temperatura altera a atividade metabólica dos microrganismos influenciando no tempo de crescimento desses.
Condições hidrodinâmicas	Física	Velocidade elevadas: retarda a formação primária do biofilme por tensões tangenciais. Após o estabelecimento do biofilme, elevadas velocidades e turbulências estimulam o crescimento de biomassa em virtude do aumento do fluxo de substrato. Gera biofilmes mais lisos, menos espessos, compactos e com maior porosidade. Velocidades baixas: sob elevadas concentrações o biofilme torna-se espesso, induzindo ao aparecimento de zonas inativas pela dificuldade de transferência de massa. Tal fato favorece o destacamento de parte do biofilme.

Fonte: ALMEIDA, 2007.

A escolha do material suporte para a formação do biofilme é importante, pois a adesão está intimamente ligada a sua composição e rugosidade já que os microrganismos depositam-se nas irregularidades do material. A rugosidade do suporte proporciona abrigos onde a turbulência do fluido é menor, assim torna-se possível aumentar a retenção de microrganismos (MACHADO, 2005). Assim, quanto maior a porosidade ou rugosidade do suporte melhor o biofilme se desenvolverá (PICANÇO *et al.*, 2003).

Os materiais granulares de origem mineral são os mais utilizados nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) em operação, sendo grãos de argila calinada ou xisto expandido da família dos silicatos os mais utilizados na Europa. No Brasil, o enchimento dos reatores, quase exclusivamente, é composto por pedra brita em função do seu custo econômico (GODOY, 2007).

Segundo Vieira (1995) os melhores suportes de adesão são aqueles que os poros apresentam dimensões aproximadas de 4 a 5 vezes o comprimento dos microrganismos presentes.

Já Bergamasco (1996) comenta que é bem difícil a obtenção de resultados conclusivos sobre a rugosidade, principalmente devido à dificuldade de realização de medidas quantitativas. Liu (1994) apud BERGAMASCO (1996), subdividiu a rugosidade superficial em micro rugosidade (baixa rugosidade de superfície) e macrorrugosidade (rugosidade superficial maior que a da camada viscosa de um material polimérico bruto). Dessa forma, em um suporte pouco rugoso as colônias microbianas são expostas a forças de cisalhamento do líquido, ocasionando um desprendimento e à formação de um filme homogêneo e fino.

A estrutura do biofilme é complexa e permite a passagem do efluente através de canais formados durante a formação do biofilme nos espaços existentes no material suporte, podendo criar zonas aeróbias e anaeróbias (Figura 01). Sendo assim, o biofilme pode apresentar uma estratificação criando ambientes propícios para desenvolvimento de diferentes grupos de microrganismos (GODOY, 2007).

A zona mais externa forma um filme aeróbio onde ocorre o processo de nitrificação e a zona mais interna caracteriza-se como um filme anaeróbio onde acontece, por exemplo, a desnitrificação, devido à espessura que vai

aumentando e a difusão de oxigênio torna-se cada vez mais difícil (FLORENCIO, 2009; GODOY, 2007).

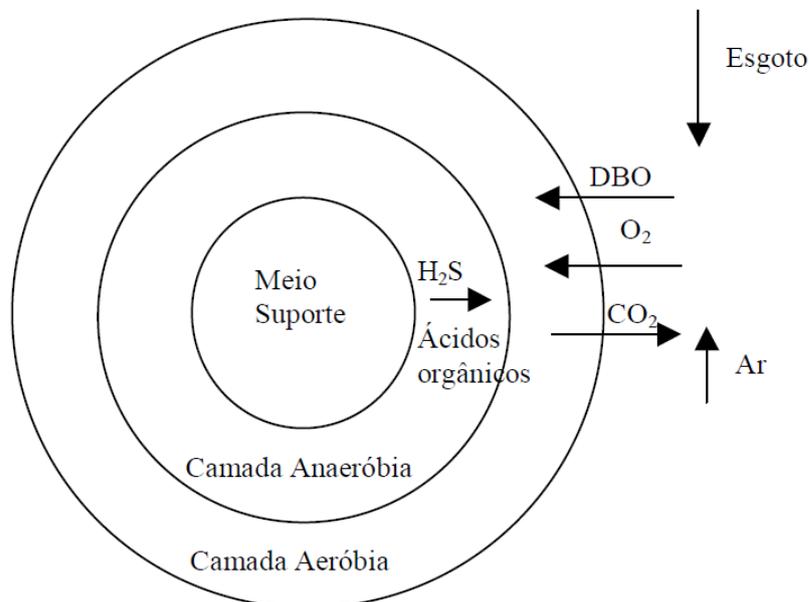


Figura 01: Esquema do biofilme em reatores.
Fonte: Adaptado de Jordão e Pessoa, 2005.

A formação do biofilme (Figura 02) sobre uma superfície ocorre em etapas. Primeiramente há o transporte de células do meio líquido para uma superfície e pelas interações físico-químicas elas se adsorvem ao meio suporte; sendo as condições favoráveis os nutrientes chegam através da interface líquido-biofilme ocasionando o crescimento e a divisão de células fixas; ocorre a fixação de células bacterianas flutuantes (aumento e crescimento do biofilme) e por fim ocorre o desprendimento de material celular de porções do biofilme podendo ser por dois mecanismos a erosão superficial (perda de células individuais) ou descolamento súbito (perda de agregados maiores ou "sloughing off") (XAVIER, 2003; CHAVES, 2004; MAIER *et al.*, 2009; RICKARD *et al.*, 2003).

Segundo Von Sperling (1996) os biofilmes apresentam três estágios dependendo da sua espessura. Caso o biofilme apresente espessura fina o filme apresenta-se fino e frequentemente não cobre toda a superfície do suporte e o crescimento bacteriano se dá segundo uma taxa logarítmica. Se a espessura é intermediária a taxa de crescimento bacteriano torna-se constante, caso o suprimento de matéria orgânica seja limitado, os microrganismos assumem um

metabolismo suficiente apenas para sua manutenção, não havendo crescimento bacteriano. E nos biofilmes com espessura elevada o crescimento microbiano é contraposto pelo próprio decaimento dos organismos, pelo consumo por outros organismos e pela tensão de cisalhamento.

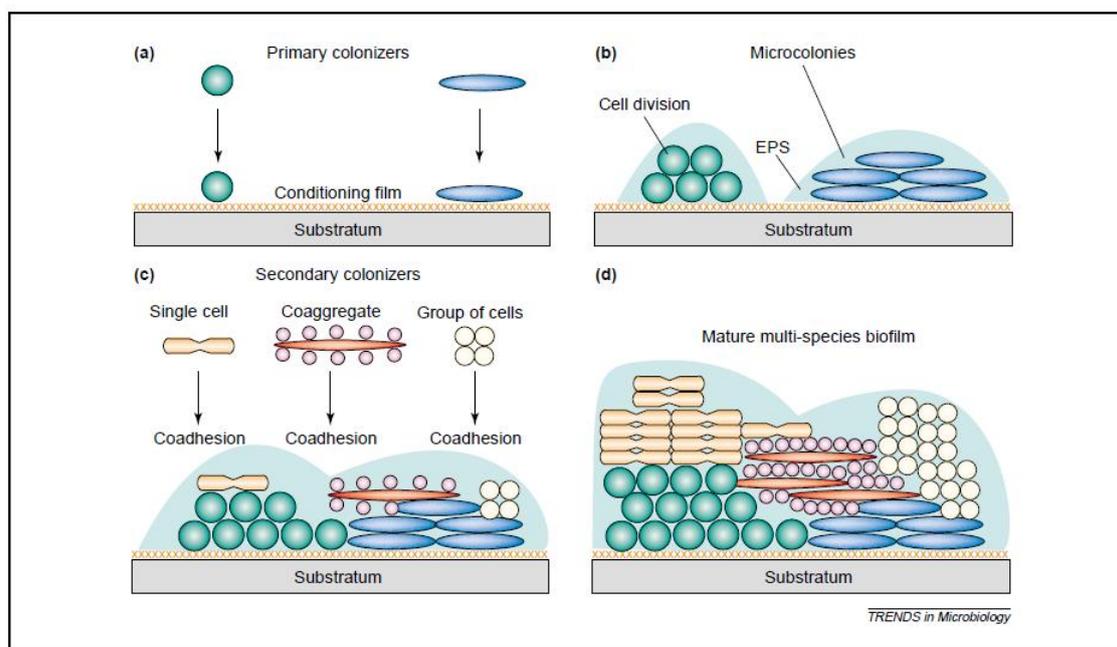


Figura 02: Representação da formação do biofilme. Em (a) Colonização primária do meio suporte, (b) o crescimento e a divisão celular, produção de exopolissacarídeo, (c) adesão de células individuais ou grupos e em (d) a maturação do biofilme.

Fonte: RICKARD *et al.*, 2003.

Em sistemas de tratamento biológico de águas residuárias, Oliveira (2012) destacou que há o crescimento e desenvolvimento de outros microrganismos, como fungos, protozoários e rotíferos além do crescimento bacteriano. Esses microrganismos também reagem aos fatores físico-químicos do meio, dessa maneira a microfauna torna-se indicadora dos parâmetros operacionais e ambientais do sistema.

Em relação aos rotíferos, Salvetti *et al.* (2006) explicaram que quando presentes na biomassa esses podem provocar o desprendimento das células bacterianas, em contra partida, o biofilme oferece condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A fim de desenvolver os objetivos do projeto proposto, foi realizado o acompanhamento da operação de reatores em batelada sequencial (RBS), um contendo como meio suporte para adesão dos microrganismos espuma de poliuretano, um segundo tendo como meio suporte bucha vegetal e um terceiro sem meio suporte para comparação, evidenciando a influência desses na colonização microbiana e evolução do biofilme.

A instalação e as análises foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Londrina/PR.

4.1 COLETA DO EFLUENTE: ESGOTO SANITÁRIO

O esgoto sanitário utilizado para alimentar os reatores foi coletado na estação de tratamento de esgoto (ETE) localizada no Município de Londrina-PR, nas proximidades da Avenida das Maritacas, zona Norte (Figura 03) e refere-se a uma das quatro estações presentes no município.



Figura 03: Localização da ETE-Norte no município de Londrina – PR.
Fonte: Google – maps, 2013.

Segundo o Plano Municipal de Saneamento Básico – Relatório de diagnóstico da situação do saneamento (2008-2009) a ETE – Norte atende, aproximadamente, 47,7% da população de Londrina, e está localizada na sub-bacia do Ribeirão Lindóia.

As coletas foram realizadas em duas etapas em galões de 20L, previamente higienizados, após o tanque desarenador (Figura 04). As coletas realizaram-se após 50 e 73 dias de estiagem, respectivamente. O procedimento de coleta e armazenamento do efluente seguiu a NBR 9898/87



Figura 04: Coleta do esgoto sanitário na ETE -Norte após o tanque desarenador.

Fonte: Autoria própria.

Após a coleta, os galões foram acondicionados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Londrina onde realizou-se a parte experimental.

4.2 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL

A instalação experimental foi composta por três reatores em batelada sequencial (RBS). Cada reator foi confeccionado em policloreto de vinil (PVC) com capacidade para três litros (Figura 05 - a). Para a aeração do sistema foi instalado um difusor de ar (bomba de aquário) da marca Boyu (vazão 3,2 L/min) para injeção de ar. O esvaziamento do reator foi realizado a cada 48

horas, por meio de um registro fecho rápido em PVC instalado no fundo do reator.

A fração de enchimento de cada tipo de suporte foi fixada em 50% do volume total do reator. Uma unidade de reator não foi preenchida com material suporte. No interior do reator ainda foram colocadas lâminas de vidro para possibilitar o monitoramento semanal em microscópio dos microrganismos presentes nos reatores (Figura 05 – b).

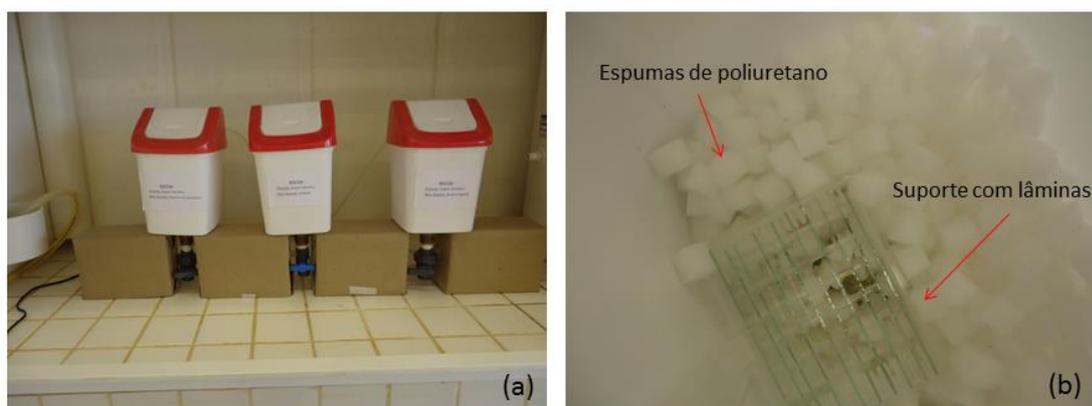


Figura 05: Em (a) conjunto de reatores confeccionados em PVC, em (b) interior do reator contendo espuma de poliuretano e suporte com lâminas de vidro.

Fonte: Autoria própria.

Como meio suporte para o estabelecimento da biomassa foram usadas espuma de poliuretano e bucha vegetal (Figura 06) com aproximadamente 6 cm³ cada. Estes materiais suportes permaneceram em suspensão devido ao menor peso específico em relação ao do efluente e mantiveram-se em movimento pela aeração do meio.

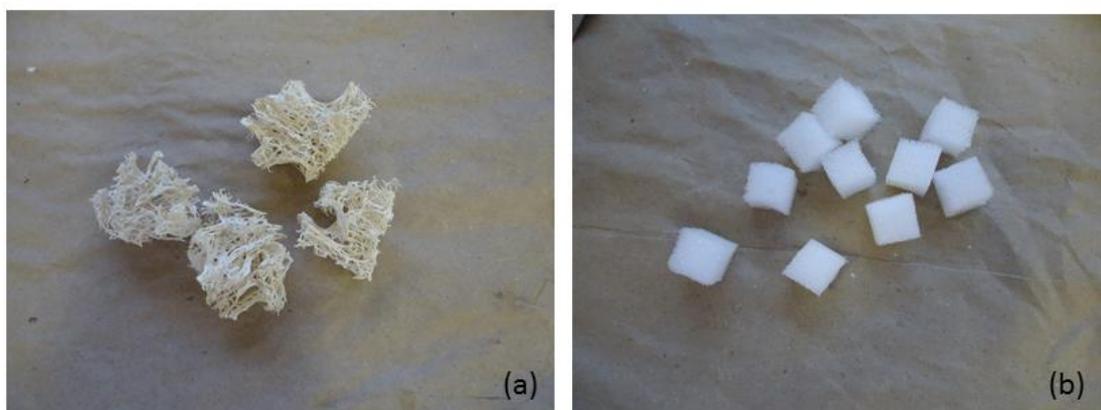


Figura 06: Material suporte utilizado. Em (a) bucha vegetal e em (b) espuma de poliuretano.

Fonte: Autoria própria.

Anteriormente a adição do meio suporte no reator, cada unidade a ser inserida foi pesada em balança analítica de precisão e identificado com um número para facilitar as análises posteriores.

O experimento foi conduzido por 42 dias e os reatores permaneceram sobre a bancada do Laboratório de Microbiologia da UTFPR, ficando expostos as variações de temperaturas do local.

Para simplificar as explicações foi adotada siglas para cada reator. O reator com o meio suporte bucha vegetal foi identificado como RBSB, o com espuma de poliuretano RBSE, e o reator sem meio suporte foi nomeado como RBSS.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Durante o monitoramento do sistema realizou-se a análise dos seguintes parâmetros físico-químicos do efluente: pH, temperatura, nitrogênio amoniacal, nitrato e consumo de oxigênio. A frequência de monitoramento pode ser visualizada na Tabela 03.

Tabela 03: Relação e frequência das análises físico-químicas.

	Parâmetro	Frequência
Efluente	pH	Diária
	Temperatura	Diária
	Nitrogênio Amoniacal	Início e final do processo
	Nitrato	Início e final do processo
	Nitrito	Início e final do processo
	Respirometria	Final do processo

Os valores de pH e temperatura foram medidos pelo pHmetro modelo mPA-210 (MS TECNOPON) diariamente no período matutino. Nos dias de troca de efluente, o pH e temperatura foram medidos no efluente presente no reator antes da troca e no efluente a ser inserido nos reatores. Ao longo do estudo não foi realizada adição de fonte externa de alcalinidade para controle do pH.

O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método de “nitrogênio total Kjeldahl” descrito por APHA (2005). O método baseia-se na digestão da amostra por ácido sulfúrico em presença de um catalisador, a fim de converter o nitrogênio em íon amônio. Após esse processo, a amônia é destilada e titulada. A concentração de nitrogênio amoniacal foi determinada pela equação 1 (eq. 1):

$$N - \text{amoniacal (mg N - NH}_3\text{/L)} = \frac{(A-B) \cdot N_{\text{ácido}} \cdot 1400}{\text{mL amostra}} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde: A é o volume de ácido usado para titular a amostra;

B é o volume de ácido usado para titular o branco;

mL amostra é a quantidade em mililitros de amostra processada.

O nitrato foi quantificado pelo método espectrofotométrico proposto por APHA (2005), onde a concentração da amostra é calculada pela luz absorvida e comparada com a absorvância da solução padrão usada. A equação obtida para o cálculo da concentração de nitrato foi (eq. 2):

$$\text{Concentração de N-nitrato} = 7,997 \cdot (\text{ABS}_{220} - 2 \cdot \text{ABS}_{275}) \cdot \text{fator de diluição} \quad (\text{eq. 2})$$

O nitrito foi determinado segundo a metodologia descrita por APHA (2005) e consiste em um método espectrofotométrico. A equação para o cálculo da concentração de nitrito obtida foi (eq. 3):

$$\text{Concentração de N-nitrito} = (0,249 \cdot \text{ABS}_{543} - 0,007) \cdot \text{fator de diluição} \quad (\text{eq. 3})$$

O teste de taxa de consumo de oxigênio (TCO) ou respirometria considera as variações na taxa de respiração em consequência do tipo de substrato fornecido e da velocidade de degradação da biomassa (ANDREOTTOLA *et al.*, 2005).

Ainda segundo os autores a absorção do oxigênio desenvolve-se em duas fases principais. A primeira consiste na respiração endógena do lodo, ou seja, é a energia necessária para manter as funções das células (fase endógena) e a segunda fase é caracterizada pela degradação do substrato,

onde representa o consumo de oxigênio requerido pelos microrganismos para a degradação dos substratos presentes no líquido (fase exógena).

Nas condições endógenas a respiração comporta-se como uma utilização contínua de utilização do oxigênio a velocidade praticamente constante, inclinação *a-b-c* observada na Figura 07.

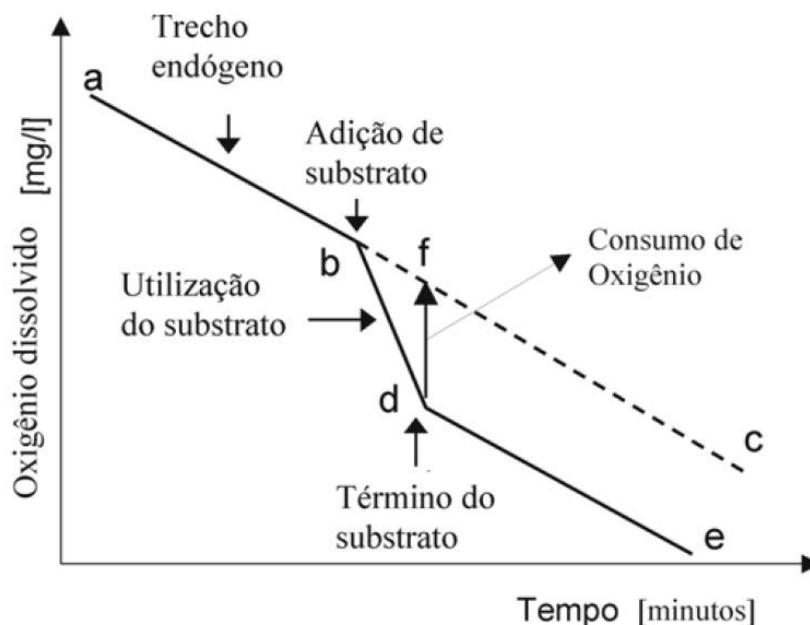


Figura 07: Efeito sobre a concentração de oxigênio dissolvido.
Fonte: Andreottola et al., 2005.

No instante *b* da Figura 07 uma pequena quantidade de substrato solúvel (sem substâncias tóxicas) é adicionada provocando um incremento momentâneo na velocidade de absorção do oxigênio, representado pela distância *b-d*. Posteriormente a degradação completa do substrato, o interior do sistema retorna às condições endógenas iniciais, assumindo após o ponto *d* uma inclinação semelhante a original (distância *d-e*).

Para a determinação das taxas de consumo de oxigênio, usou-se um respirômetro modelo Hach acoplado a um aerador tipo aquário com aeração máxima de 10 L/min para medições de forma semi contínua, ligado a um computador e controlado pelo software de coleta Hiperterminal. Os dados foram registrados e manipulados em arquivos de Excel 2010.

4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas visaram caracterizar qualitativamente e quantitativamente a colonização do biofilme, de forma a observar a evolução da adesão nos meio suporte. Os testes e a frequência com que foram realizados estão contidas na Tabela 04.

Tabela 04: Relação e frequências as análises microbiológicas.

	Parâmetro	Frequência
Quantitativo	Bactérias Heterotróficas	Semanal
	Massa seca da biomassa	Semanal
	Polissacarídeos totais	Semanal
	Bactérias Nitrificantes e desnitrificantes	Início e final do processo
Qualitativo	Análise dos meios suportes	Semanal
	Análise das lâminas de vidro	Semanal
	Bactérias Heterotróficas	Semanal
	Bactérias Nitrificantes e desnitrificantes	Início e final do processo

4.4.1 Ensaio quantitativo de bactérias heterotróficas

O teste quantitativo consistiu em retirar, a cada sete dias, uma unidade de cada material suporte usado do RBS. A espuma de poliuretano e a bucha vegetal foram depositadas em tubos Falcon (50mL) estéril contendo 5g de pérolas de vidro e 10mL de solução de Triton X-100 a 0,1% (Figura 08 – a). Após a inserção da unidade de meio suporte colocou-se mais 5g de pérolas de vidro por cima do meio, e agitou-se em Vortéx por 10 minutos para despreendimento das bactérias do meio suporte (Figura 08 – b).

Após o período de agitação, realizou-se a diluição em série em solução salina 0,85% da suspensão microbiana de cada meio suporte (Figura 08 – c). Retirou-se 0,1mL destas, plaqueou-as em ágar PCA (Plate Count Agar) e incubou por 72 horas a 30°C (Figura 08 – d). O procedimento foi realizado em triplicata para cada diluição usada. Usou-se diluições de 10^{-1} a 10^{-10} e

escolheu-se semanalmente quatro diluições para o plaqueamento conforme o valor de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) da semana anterior.

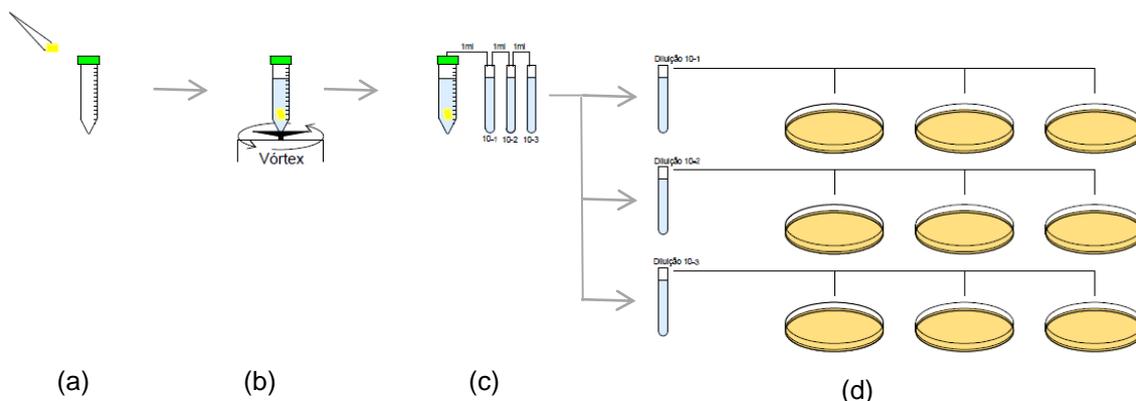


Figura 08: Procedimento de diluição em série e contagem em placa do ensaio quantitativo para bactérias heterotróficas. Em (a): Tubo Falcon com 10g de pérolas de vidro, (b) agitação do tubo contendo o meio suporte em vórtex, (c) preparação da diluição em série e em (d) plaqueamento em triplicata meio PCA das diluições selecionadas.

Fonte: Autoria própria.

Do RBSS foram retirados 10mL do efluente, inseriu em tubo Falcon e procedeu da mesma maneira do procedimento para os meios suportes.

A quantidade de bactérias heterotróficas foi estimada através da contagem do número de UFC/mL das placas inoculadas. O número de colônias contadas foi multiplicado pelo inverso da diluição utilizada da placa correspondente, multiplicado por 10 (fator de correção). A eq. 4 apresenta a fórmula para a estimativa da contagem de UFC:

$$\text{UFC/mL} = \text{N}^{\circ} \text{ de colônias observadas} * \text{denominador da diluição correspondente} * 10 \quad (\text{eq. 4})$$

O meio de cultura utilizado para inoculação (PCA) apesar de ser um meio genérico que permite crescimento de bactérias e fungos, pode não proporcionar o crescimento de todos os microrganismos presentes no esgoto doméstico. Tal fato pode estar associado pelas próprias condições de nutrientes do meio e as condições de incubação. Dessa maneira o procedimento somente considera os microrganismos que são cultivados em laboratório.

4.4.2 Bactérias nitrificantes e desnitrificantes

A estimativa do número mais provável (NMP) de bactérias nitrificantes e desnitrificantes foi realizada seguindo a metodologia utilizada por Mendonça (2002) e Yamamoto (2006). Realizou-se a estimativa no início da operação dos reatores (esgoto sanitário) e no final da operação nos meio suportes usados. No RBSS foi realizada a estimativa no efluente.

Preparação da amostra por diluição em série

A preparação da amostra no início da operação, ou seja, o esgoto sanitário consistiu em deixá-lo em descanso, por 10 minutos, e coletou-se 10 mL do subnatante. O material coletado foi inserido em um frasco estéril, contendo 5 g de pérolas de vidro e agitado manualmente em um ângulo de 45° por 20 minutos. Depois da agitação foi realizada a diluição em série em tubos de ensaio obtendo-se as diluições de 10^{-1} a 10^{-10} .

A amostra no final da operação consistiu no procedimento descrito no item 4.4.1, a fim de quantificar as bactérias nitrificantes e desnitrificantes aderidas no meio suporte.

Número mais provável de bactérias nitrificantes

Para a estimativa do número mais provável de bactérias nitrificantes, realizou-se a inoculação em tubos de ensaio contendo meios de cultura específicos (Tabela 05) para cada grupo de bactéria (oxidadoras de amônia e nitrito). Incubou-se a uma temperatura de 30°C, o tempo de incubação variou conforme o grupo de bactéria trabalhada variando entre 07 e 30 dias, em função da velocidade de crescimento mais lento das bactérias nitrificantes que são autotróficas.

As diluições usadas para inoculação das bactérias oxidadoras de amônia e de nitrito (nitrificantes) foram 10^{-1} a 10^{-5} . Na análise ao final da operação dos reatores as diluições foram realizadas a partir do desprendimento das bactérias aderidas com Triton X-100 a 0,1%. Cada diluição foi feita em

quintuplicata para que seja possível estimar o NMP a partir das combinações dos resultados de tubos positivos com a tabela padrão de probabilidade (APHA, 2005). Incubou-se também 5 tubos contendo apenas o meio de cultura sendo estes adotados como “branco” ou controle.

Tabela 05: Meios de cultura específicos para grupo de bactérias nitrificantes

Composto Químico	Oxidantes de NH_4^+ (mL/L)	Oxidantes de NO_2^- (mL/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10,0	-
KNO_2 OU (NaNO_2)	-	1,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	5,0
Azul de Bromotiomol	5,0	-
K_2HPO_4	-	4,0
KH_2PO_4	7,5	1,0
Ferro Quelado	1,0	1,0
Micronutrientes	1,0	1,0

Após o período de incubação realizou-se teste para a determinação de presença de bactérias nitrificantes através de soluções teste. Retirou em ambiente asséptico, uma pequena alíquota (0,5 mL) de cada tubo separadamente e adicionou para as bactérias oxidadoras de amônia gotas da solução A (0,5g de sulfanilamida em 100 mL de ácido clorídrico (HCl – 2,4N)) e solução B (0,3g de N-naftil-etilenodiaminahidrocloreto em 100 mL de ácido clorídrico (HCl – 0,12N)). Após a adição das duas soluções, a presença de coloração rosa significava presença de nitrito, dessa maneira pode haver presença de bactérias oxidadoras de amônia (resultado positivo). Se não mudar de cor pode ser pelo fato de que o nitrito já tenha sido transformado a nitrato (NO_3^-), deve-se adicionar uma gota da solução C (0,2g de difenilamina em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), se ficar azul o tubo é anotado como positivo, caso contrário é negativo, confirmando que a amônia ainda pode não ter sido transformada em nitrito ou que não tenha a presença deste grupo de bactérias. (Figura 09).

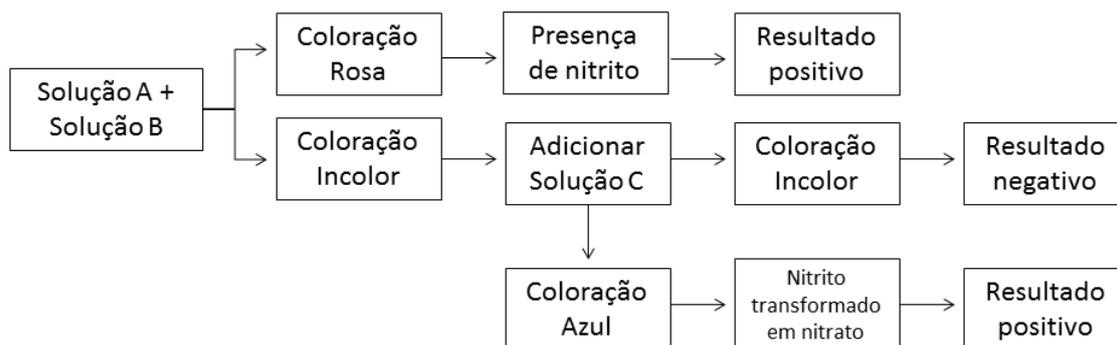


Figura 09: Fluxograma dos procedimentos de análise dos tubos de BOA quanto a produção de nitrito.

Fonte: Autoria própria.

As bactérias oxidadoras de nitrito, após a adição das soluções A e B, se houver ausência de coloração significa que o nitrito foi consumido, dessa maneira pode existir presença de bactérias oxidadoras de nitrito (resultado positivo) e a coloração rosa significa presença de nitrito (resultado negativo) (Figura 10).

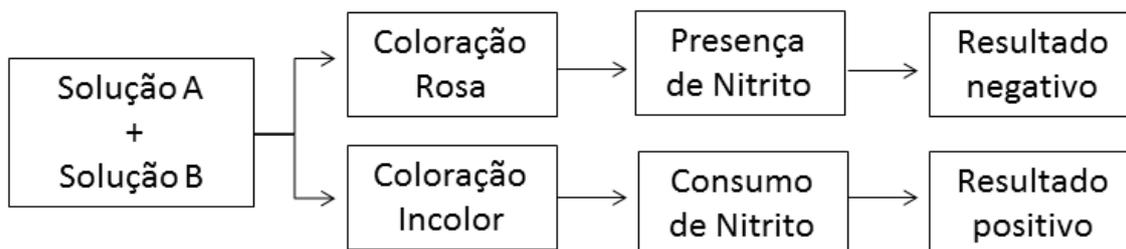


Figura 10: Fluxograma dos procedimentos de análise dos tubos de BON quanto a produção de nitrato.

Fonte: Autoria própria.

A contagem do NMP de bactérias nitrificantes foi realizada através das combinações de respostas positivas dos tubos, utilizando a Tabela Padrão de Probabilidade presente no APHA (2005). A equação 5 demonstra como é feito o cálculo do NMP para cada 100 mL:

$$\text{NMP} = \frac{\text{valor NMP (tabela)} * 10}{\text{maior diluição da combinação de tubos positivos}} \quad (\text{eq. 5})$$

Um exemplo de resultado obtido na técnica do NMP para utilização da Tabela Padrão de Probabilidade (APHA, 2005), pode ser analisado a seguir.

Supondo que os testes com as soluções A, B e C das bactérias oxidadoras de amônia tenha a combinação de respostas como na Tabela 06. Assim temos que a combinação de respostas positivas foi a seguinte 5-2-2; para diluição respectivamente de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

Tabela 06: Exemplo de resposta do teste para BOA.

Diluição	TUBOS				
	1	2	3	4	5
Branco	-	-	-	-	-
-2	+	+	+	+	+
-3	+	+	+	+	+
-4	+	+	-	-	-
-5	+	+	-	-	-
-6	-	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria.

Para essa combinação, o valor obtido na Tabela Padrão de Probabilidade é 94. Aplicando na equação 5, temos:

$$\begin{aligned} \text{NMP} &= (94 \cdot 10) / 10^{-5} \\ \text{NMP} &= 9,4 \cdot 10^5 \text{ (NMP/100mL)} \end{aligned}$$

Número mais provável de bactérias desnitrificantes

Para a estimativa do número mais provável de bactérias desnitrificantes, realizou-se a inoculação em tubos de ensaio contendo meio de cultura específico (Tabela 07). Incubou-se a temperatura de 30°C, o tempo de incubação foi de aproximadamente 7 dias, uma vez que, bactérias desse grupo são heterotróficas sendo seu crescimento mais acelerado.

Neste grupo de bactérias usou-se as diluições 10^{-1} a 10^{-10} , uma vez que há um rápido crescimento das colônias dessas bactérias. Usou-se tubos em quintuplicata, além de 5 tubos contendo somente o meio de cultura (controle).

Tabela 07: Meio de cultura específico para grupo de bactérias desnitrificantes

Composto Químico	Quantidade	(g/L)
Meio Nutriente Broth	8,0	
NaNO ₃	0,4280	

Após o período de incubação foi realizada a determinação de presença de bactérias desnitrificantes através de soluções teste. Retirou em ambiente asséptico, uma pequena alíquota de cada tubo separadamente e adicionou gotas da solução C. Ausência de coloração indicava consumo de nitrato e possível presença de bactérias desnitrificantes (resultado positivo) e, coloração azul indicava que há nitrato remanescente (resultado negativo) (Figura 11).

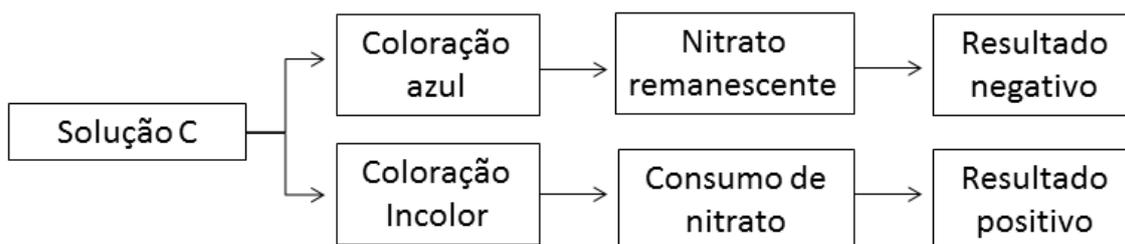


Figura 11: Fluxograma dos procedimentos de resultados dos tubos de desnitrificante.
Fonte: Autoria própria.

A contagem do NMP de bactérias desnitrificantes seguiu o procedimento da equação 5.

4.4.3 Quantificação da biomassa seca aderida

A quantidade de biomassa aderida aos suportes ao longo do estudo foi avaliada verificando a variação da massa seca de biomassa aderida no meio suporte, utilizando a metodologia proposta por Schneider (2010). Esse procedimento é fundamentado na diferença de peso antes e depois da inserção do material.

Uma vez por semana, de cada reator, foram retiradas três unidades de meio suporte (espuma ou bucha vegetal) com ajuda de uma pinça metálica (Figura 12) e transferidas em cadinhos previamente pesados secos em balança analítica. Após a pesagem os cadinhos permaneceram em estufa a 105°C por 12 horas. Posteriormente ao resfriamento realizado dentro do dessecador, pesou-se e o valor foi descontado do meio suporte limpo anteriormente pesado e identificado. Uma vez conhecido o número de meios

de suporte presente no RBS, pode-se ter a estimativa de massa seca de biomassa aderida presente no reator.

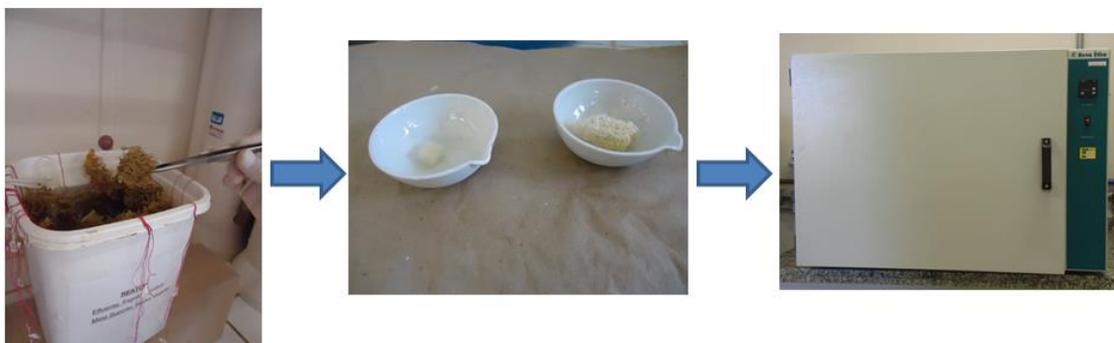


Figura 12: Procedimento para quantificação da biomassa seca. Após a retirada do meio suporte do RBS, esse era colocado em cadinhos, pesados, e secado em estufa por 12 horas a 105°C.

Fonte: Autorial própria.

4.4.4 Concentração de polissacarídeos aderidos

Os polissacarídeos da biomassa aderida foram determinados após a lise completa das células aderidas e estimado pelo método colorimétrico de DUBOIS (1956) apud SCHNEIDER (2010)..

Preparo da amostra:

Para a determinação da concentração foram retiradas do reator 2 unidades do material suporte com biofilme e estes foram imersos em 5 mL de NaOH (1N) em recipiente plástico.

O recipiente seguia então para o banho maria a 100°C por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 70 rpm e posteriormente filtradas com uma membrana de éster celulose (0,22 µm de porosidade) antes da análise.

Solução branco:

O branco foi preparado com 0,5 mL de água deionizada mantido em banho de gelo seguida da adição de 0,5 mL de solução fenol a 5% e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando os tubos vigorosamente. Após a agitação

deixou-os em repouso até a temperatura equivaler com a temperatura ambiente.

A solução fenol a 5% foi preparada, pesando 5 g de fenol (P.A.) em balança analítica e dissolvendo em 100 mL de água destilada.

Curva de calibração:

Foi preparado uma solução padrão de glicose 200 µg/mL. Distribuíram-se alíquotas de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µL desta solução em tubos de ensaio e completou-se o volume para 0,5 mL com água destilada, obtendo as respectivas concentrações 10; 20; 40; 60; 80 e 100 µg/mL, e deixou em banho de gelo. Adicionou 0,5 mL de solução fenol a 5% e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se bem e foi deixado em repouso até entrarem em equilíbrio com a temperatura ambiente. A Tabela 08 apresenta os valores de cada solução para a curva de calibração.

Tabela 08: Preparação das amostras para obtenção da curva de Calibração - Polissacarídeos

TUBO	SOLUÇÃO PADRÃO (µg/ml)	GLICOSE (200 µg/ml)	ÁGUA (µl)	FENOL 5% (µl)	ÁCIDO SULFÚRICO (ml)
1	10	50	450	500	2
2	20	100	400	500	2
3	40	200	300	500	2
4	60	300	200	500	2
5	80	400	100	500	2
6	100	500	0	500	2

Mediu-se a absorvância de cada tubo das amostras para obtenção da curva de calibração em comprimento de onda de 490 nm, utilizando a solução branco como o ajuste para o zero. A amostra também foi medida em 490 nm.

A concentração de polissacarídeos foi determinada a partir da equação obtida (eq. 6):

$$\text{Conc}_{\text{polissacarídeos}} = 0,2498 * (\text{ABS}_{490} * \text{diluição usada}) - 0,2318 \quad (\text{eq. 6})$$

O resultado é expresso em porcentagem de polissacarídeos calculados como glicose por 100 mL.

4.4.5 Ensaio qualitativo da formação de biofilme

O monitoramento qualitativo consistiu na observação ao microscópio óptico das lâminas de vidro inseridas nos reatores uma vez por semana pela técnica à fresco para observar a diversidade dos microrganismos presente nos reatores e utilizando o teste morfotintorial, possibilitando classificá-las quanto a coloração de Gram (Gram positiva ou Gram negativa) e quanto a morfologia (cocos, bacilos e arranjos), possibilitando analisar pequenos organismos vivos independente do cultivo.

Outro teste realizado foi à observação do próprio meio suporte em estereomicroscópio. Neste caso retirou-se uma unidade de cada meio suporte (bucha vegetal e espuma) do reator, apoiou-a imediatamente em uma parte de uma placa de Petri e observou em estereomicroscópio com aumento de até 160 vezes, o exame foi realizado “*in vivo*” assim foi possível observar e quantificar visivelmente comparando com o material limpo a quantidade de material aderido nos poros de cada meio suporte e a comunidade microbiana presente evitando alterações na composição da microfauna. Nessa análise não utilizou conservantes ou corantes químicos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISES FÍSICO- QUÍMICAS

5.1.1 pH

Na Figura 13 é apresentado o comportamento do pH do efluente nos reatores em batelada sequencial (RBS) e do efluente introduzido nos reatores, ao longo do período de experimento.

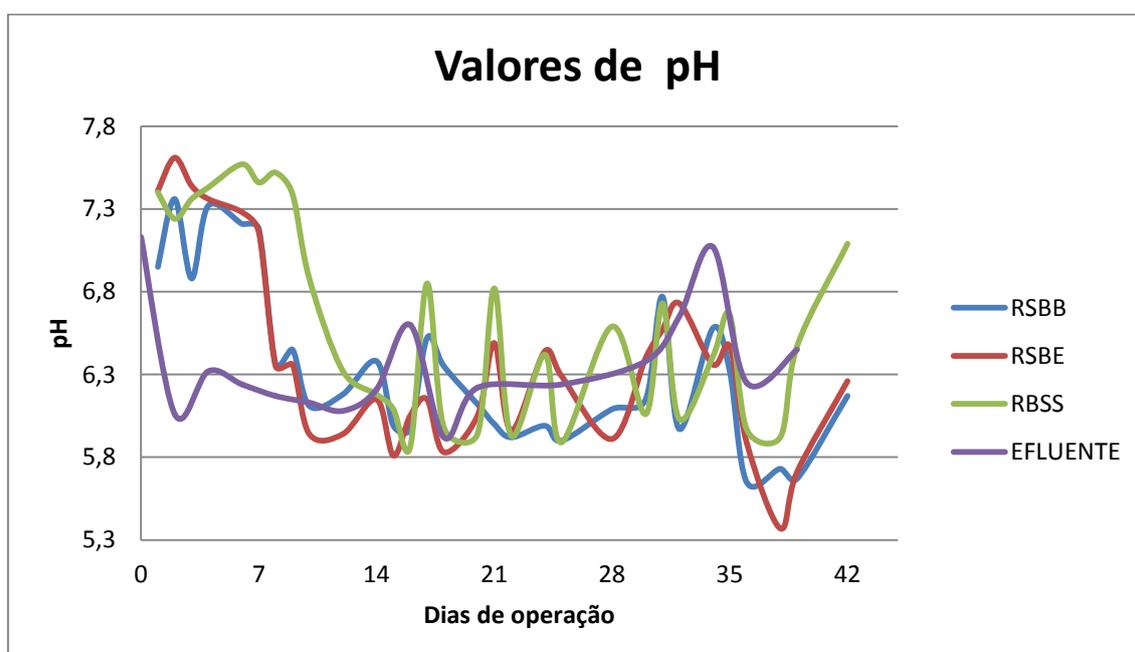


Figura 13: Gráfico do comportamento do pH ao longo do monitoramento dos reatores e efluente.

Fonte: Autoria própria.

O pH do efluente introduzido nos reatores durante este estudo variou de 5,92 a 7,13. Segundo Chernicharo (1997), o pH do esgoto sanitário apresenta-se em uma faixa entre 6,7 – 7,5 e apresenta valor típico de 7,0. O pH médio do efluente utilizado ficou pouco abaixo da faixa descrita por Chernicharo, sendo o valor de 6,36 (Tabela 09).

Por meio da observação da Figura 13 foi possível constatar que o RBSS foi o que mais sofreu com as variações de pH, apresentando picos de elevação

e quedas a cada troca de efluente, por exemplo, no 17º dia (pH 6,82) e 18º dia de operação (pH 5,93), variação de 0,87.

Na Tabela 09 podem-se observar os valores máximos, mínimos e a média dos resultados encontrados nas análises. Valores próximos de pH foram encontrados nos estudos de Lamego Neto e da Costa (2011) usando esgoto doméstico em reator híbrido em batelada sequencial, com valores para o pH do efluente bruto médio de 6,62 e na fase aeróbia uma média 7,30.

Tabela 09: Valores máximo, mínimo e médio do pH encontrado nas análises.

	RBSB	RBSE	RBSS	Efluente
Máximo	7,36	7,61	7,57	7,13
Mínimo	5,65	5,37	5,86	5,92
Média	6,34	6,39	6,62	6,36

Fonte: Autoria própria.

5.1.2 Temperatura

A temperatura do efluente encontrou-se semelhante nos três RBS (Figura 14), permanecendo praticamente em todo o período de análise entre os valores de 16,8 a 28°C. Segundo Jordão e Pessoa (2005) normalmente a temperatura nos esgostos está acima da temperatura do ar, sendo típica a temperatura no efluente de 20 a 25°C. A temperatura ambiente durante a realização do experimento ficou entre 14,1 a 28,2°C (Tabela 10). Os valores médios encontrados no efluente coincidiram com o afirmado por Jordão e Pessoa (2005).

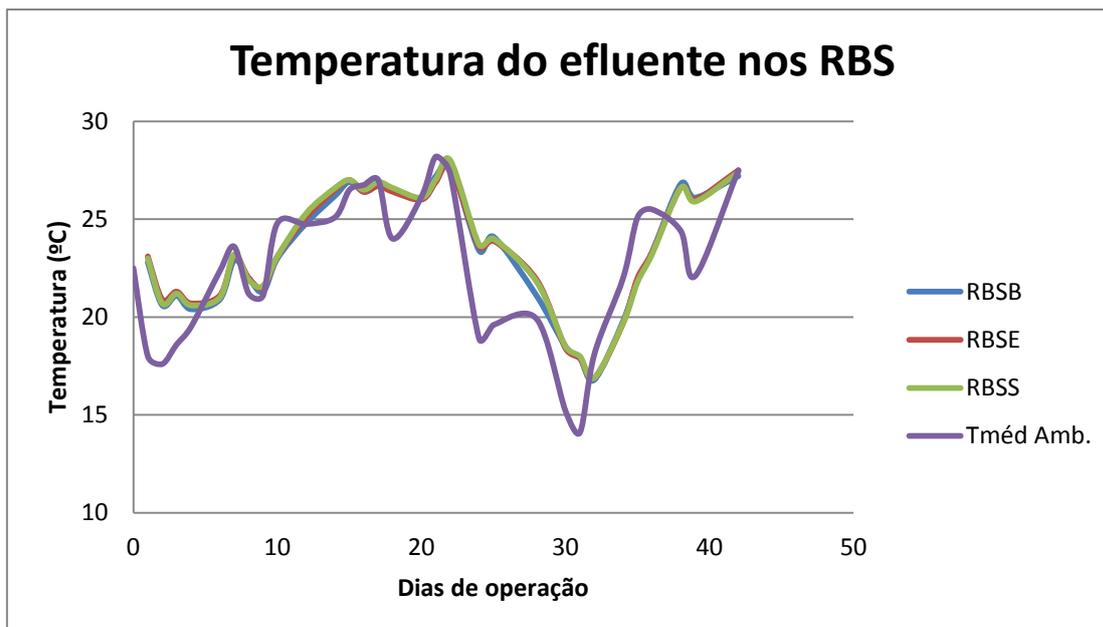


Figura 14: Comportamento da temperatura ao longo do monitoramento dos reatores com diferentes meios suportes.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 10 é possível observar as temperaturas máximas, mínimas e as médias nos RBS e a temperatura ambiente nos dias de operação dos reatores.

Tabela 10: Temperaturas máximas, mínimas e médias dos reatores e a temperatura ambiente ao longo da operação de operações dos reatores.

	RBSB	RBSE	RBSS	Efluente	Ambiente
Máximo	27,8	27,7	28	27,8	28,2
Mínimo	16,8	16,9	16,9	17,8	14,1
Média	23,35	23,44	23,46	23,7	22,5

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar a Figura 14 tem-se que a temperatura média no efluente manteve-se na maior parte do tempo superior a temperatura ambiente.

A queda de temperatura do efluente no interior do reator após o 24º dia acompanhou a queda da temperatura ambiente que aconteceu devido ao término do período de estiagem. Quando a temperatura ambiente voltou a subir, a temperatura nos reatores seguiu a mesma tendência.

A influência da temperatura se manifesta principalmente nas operações de natureza biológica sendo que a velocidade de decomposição da matéria orgânica aumenta com a temperatura, nos processos de transferência de oxigênio onde a solubilidade do oxigênio é menor nas temperaturas mais

elevadas e nas operações que ocorre sedimentação, ou seja, o aumento da temperatura faz diminuir a viscosidade, melhorando as condições de sedimentação (ESTEVES, 1998).

Pierotti (2007) ressalta que a temperatura altera o equilíbrio iônico e a solubilidade dos substratos e na faixa de temperatura entre 20°C e 25°C, a velocidade de utilização de substrato é a metade da alcançada a 35°C.

5.1.3 Nitrogênio

O nitrogênio orgânico presente nos esgotos está na forma de proteína, aminoácidos e ureia. As bactérias são responsáveis pela oxidação do nitrogênio transformando primeiramente em amônia, depois nitritos e posteriormente em nitratos (JORDÃO e PESSÔA, 2005).

A quantidade de nitrogênio amoniacal presente no efluente bruto no início do experimento foi de 73,92 mgN-NH₃/L, valor típico de esgoto. Valor semelhante foi verificado na caracterização do esgoto sanitário usado por Fujii (2011).

Ao término da operação foi verificado a presença de nitrogênio amoniacal nos efluentes de cada reator. Para o reator contendo a bucha vegetal obteve-se o valor de 35,06 mgN-NH₃/L, o operado com espuma 36,63 mgN-NH₃/L, o sem meios suporte apresentou valor de 34,74 mgN-NH₃/L, enquanto no efluente armazenado 77,39 mgN-NH₃/L. Observando a Tabela 11, pode-se verificar que a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal nos três reatores foi da ordem de 50%, não apresentando diferença significativa entre eles.

Tabela 11: Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal em cada um dos RBS.

Nitrogênio Amoniacal		
	(mgN-NH ₃ /L)	Eficiência de Remoção
RBSB	35,06	52,57
RBSE	36,63	50,45
RBSS	34,74	53,03

Fonte: Autoria própria.

No final do processo foi encontrado valor de 42,38 mgN-NO₃/L no RBSB, 10,40 mgN-NO₃/L no RBSE e 52,78 mgN-NO₃/L para o RBSS de nitrato. Em termos de nitrito foi encontrado os valores de 18,63 mgN-NO₂/L para RBSB, 17,25 mgN-NO₂/L no RBSE e 20,60 mgN-NO₂/L (Tabela 12).

Tabela 12: Resumo dos valores encontrados para nitrato e nitrito nos RBS.

	Nitrato (mg/L)	Nitrito (mg/L)
RBSB	42,38	18,63
RBSE	10,39	17,25
RBSS	52,78	20,6

Fonte: A autoria própria.

5.1.4 Respirometria

A respirometria baseia-se na utilização da medida da taxa de consumo de oxigênio (TCO) pela respiração de microrganismos durante o processo de degradação de substratos. Dessa forma, pode-se estimar o tempo de estabilização e avaliar a toxicidade de um efluente, uma vez que, cargas tóxicas resultam numa diminuição da velocidade de consumo de oxigênio (FERNANDES, 2001).

A TCO no final do processo no RBSB foi de 17,64 mg.L⁻¹.h⁻¹ e no RBSE encontrou-se TCO de 14,46 mg.L⁻¹.h⁻¹.

Quando se compara os resultados não é possível identificar uma variação grande entre as TCO's, mas a diferença do consumo pode estar relacionada com a quantidade de microrganismos presente em cada RBS, onde o RBSB apresentou ao longo dos 42 dias de operação um valor de UFC/mL superior ao RBSE.

Em um reator com biomassa em suspensão operado com esgoto sanitário, Bueno (2011) encontrou valor de 10,0 mg.L⁻¹.h⁻¹.

5.2 ENSAIO QUANTITATIVO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS

A análise da Figura 15 e Tabela 13 permite concluir que a bucha usada como meio suporte foi a que proporcionou o maior número UFC/mL seguida pela espuma. No dia 0 de operação os valores de UFC/mL são do efluente, assim pode-se considerar sendo o inóculo do reator.

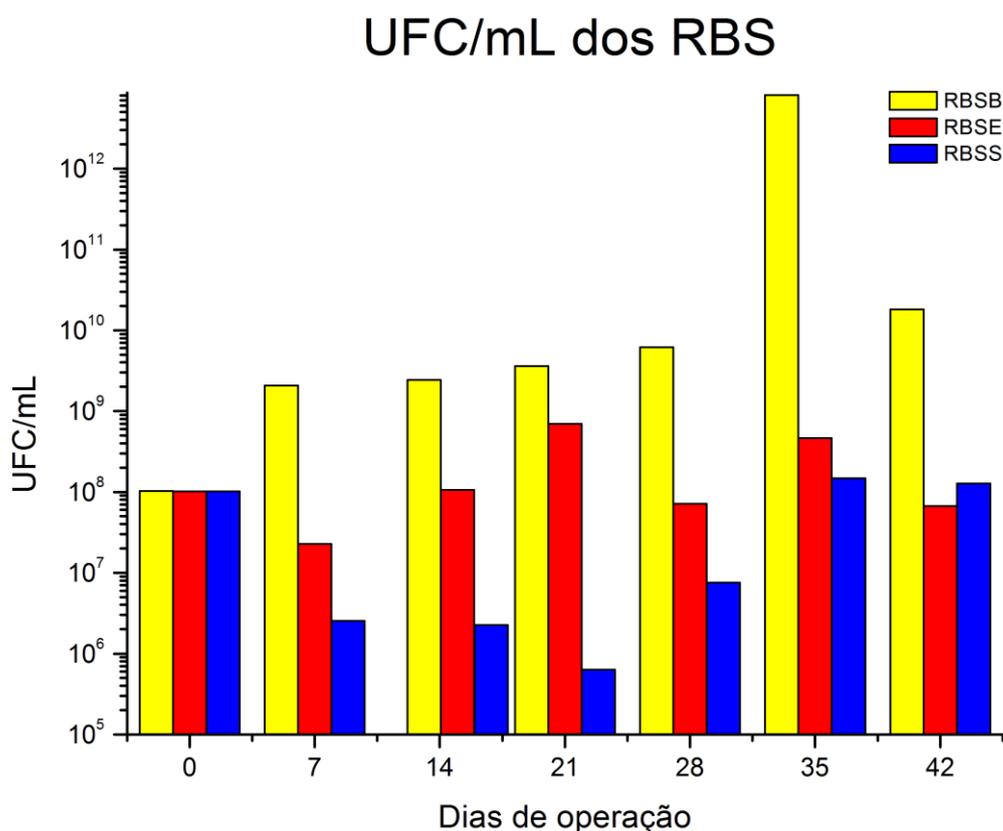


Figura 15: Quantidade de bactérias heterotróficas em RBS com diferentes meios suportes. O dia zero de operação a estimativa foi realizado no efluente bruto, ou seja, no inóculo.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13: Valores de UFC/mL encontrados nos RBS.

Dias de Operação	UFC/mL		
	RBSB	RBSE	RBSS
0	$1,02 \cdot 10^8$	$1,02 \cdot 10^8$	$1,02 \cdot 10^8$
7	$2,08 \cdot 10^9$	$2,28 \cdot 10^7$	$2,53 \cdot 10^6$
15	$2,42 \cdot 10^9$	$1,06 \cdot 10^8$	$2,25 \cdot 10^6$
21	$3,6 \cdot 10^9$	$7,00 \cdot 10^8$	$6,33 \cdot 10^5$
28	$6,17 \cdot 10^9$	$7,17 \cdot 10^7$	$7,53 \cdot 10^6$
35	$8,13 \cdot 10^{12}$	$4,63 \cdot 10^8$	$1,48 \cdot 10^8$
42	$1,81 \cdot 10^{10}$	$6,73 \cdot 10^7$	$1,28 \cdot 10^8$

Fonte: Autoria própria.

O reator sem nenhum meio suporte apresentou os menores valores de UFC/mL, tal fator pode estar associado que em sistemas de crescimento disperso para ocorrer o crescimento microbiano o tempo de ciclo deve ser maior que o tempo necessário para geração de novas células. Caso contrário não haverá tempo para que as células cresçam no reator sendo “lavadas” do sistema (von SPERLING, 1996).

No RBSS percebeu-se uma tendência de queda do número de UFC/mL até o 21º dia e depois um crescimento, provavelmente associado à recarga do reator com efluente da segunda coleta. A queda do 21º dia pode estar associada a um erro de manutenção, onde no esgotamento do efluente acabou tendo um revolvimento dos sólidos decantados sendo eliminados durante o processo de descarte do efluente presente no reator.

Em reatores sem meio suporte, os microrganismos presentes são aqueles que estão no efluente a ser tratado e também aqueles que podem estar presentes no lodo retido no fundo do reator. Considerando o erro ocorrido, pode-se considerar que o UFC/mL no RBSS comportou-se de maneira esperada, onde houve uma queda nos primeiros dias de operação, depois uma possível estabilização e no final da operação um valor mais alto devido a inserção do efluente novo.

No RBSB percebeu-se uma tendência de crescimento até o 35º dia dos microrganismos aderidos ao meio suporte, após há uma redução possivelmente ocasionada pelo desprendimento do biofilme. Esse desprendimento pode ser explicado pelo processo de formação do biofilme onde após a fixação dos microrganismos ocorre o desprendimento do material. Esse processo pode ocorrer por erosão ou abrasão e é conhecido como “*sloughing off*” (MELO, 2003). Pode-se associar também à tensão de cisalhamento que pode ter ocorrido no interior no reator. Acredita-se que o número elevado de UFC/mL no 35º dia também ocorreu devido a alimentação do reator com o efluente da segunda coleta que, provavelmente, estava mais concentrado pelos dias de estiagem.

No RSBE o número de UFC/mL não apresentou grande variação ao longo dos dias de operação, apresentando um comportamento constante, com valores de UFC/mL da ordem de 10^7 e 10^8 . Estes resultados indicam que o

biofilme deve ter ficado mais fino, possivelmente em função das condições ambientais presentes no reator (pH e temperatura).

5.3 BACTÉRIAS NITRIFICANTES E DESNITRIFICANTES

Foi realizado a quantificação dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes pela técnica o NMP do efluente doméstico no início da operação e no final da operação nos meios suportes e no reator sem a presença desses.

Analisando os resultados da Figura 16 e Tabela 14, verifica-se que o número de bactérias oxidadoras de amônia esteve maior em relação as bactérias oxidadoras de nitrito em todos os reatores, inclusive no efluente no início do tratamento e o número de bactérias desnitrificantes foi maior em todos os casos, exceto no efluente.

No processo de desnitrificação, os óxidos de nitrogênio são catabolizados por uma enzima específica, como o óxido de nitrogênio redutase (nitrito redutase, nitrato redutase e, nitroso redutase entre outros). Na fase de redução as formas oxidadas do nitrogênio são usadas na respiração como acceptor de elétrons (MADIGAN; MARTINKO, 2010). Dessa forma, as desnitrificantes podem utilizar o nitrito e o nitrato oxidados por outras espécies de bactérias, como fonte de energia e realizam o processo de transformação dos subprodutos em produto final (N_2). Esse fator pode explicar o número superior das bactérias desnitrificantes ao das nitrificantes nos reatores estudados.

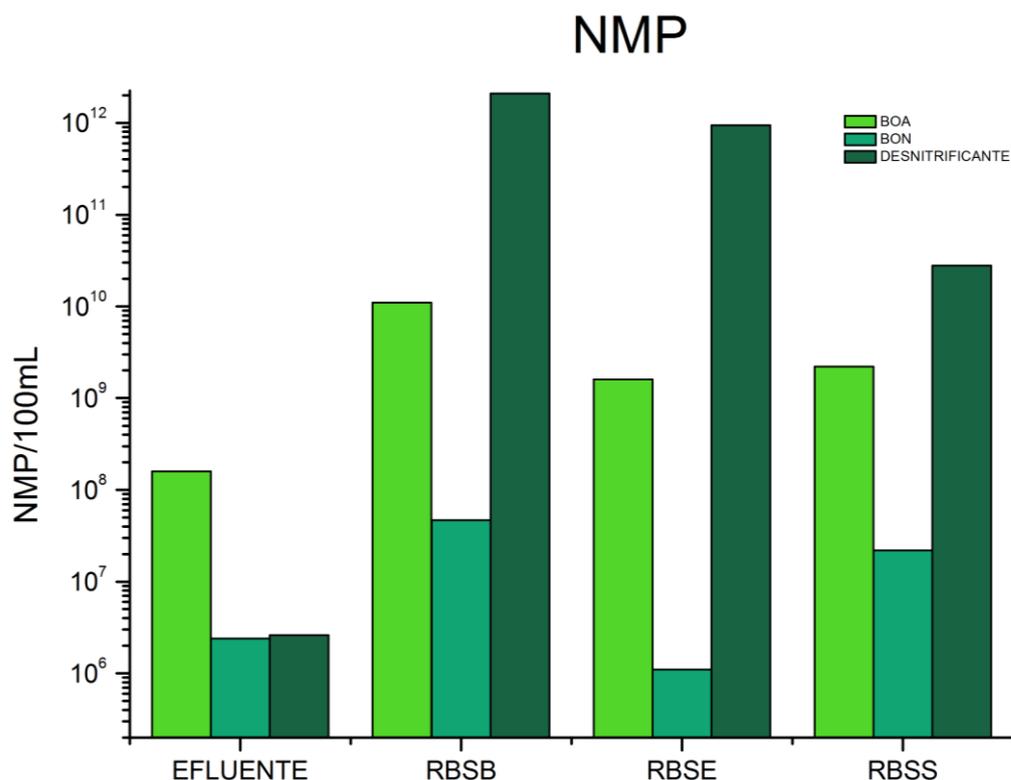


Figura 16: Valores apresentados de bactérias nitrificantes e desnitrificantes.
Fonte: Autoria própria.

Tabela 14: Valores do NMP/100 mL em cada reator estudado.

	EFLUENTE INÍCIO	RBSB	RBSE	RBSS
BOA	$1,6 \cdot 10^8$	$1,60 \cdot 10^{10}$	$1,10 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^9$
BON	$2,4 \cdot 10^6$	$4,70 \cdot 10^7$	$1,10 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^7$
Desnitrificante	$2,6 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^{12}$	$9,4 \cdot 10^{11}$	$2,8 \cdot 10^{10}$

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar os resultados do NMP/100mL e os físico-químico acredita-se que no RBSE a biomassa presente que utiliza nitrito foi favorecida no sistema, pois o NMP/100mL de BON é inferior a BOA e o físico-químico comprova essa redução. Dessa forma, o nitrogênio amoniacal pode ter sido transformado em nitrito, e este estar sendo diretamente utilizado pelas bactérias desnitrificante, sendo uma pequena taxa do nitrito utilizada pelas BOA.

Comparando o RBSB e RBSE verifica-se que o processo de nitrificação é mais eficiente utilizando meio suporte de bucha vegetal, pois o NMP/100mL de microrganismos aderidos ao meio suporte foi maior em relação a espuma de poliuretano.

De acordo com EPA (1993) o processo de nitrificação ocorre com temperatura entre 4 – 45°C, sendo ótimo para *Nitrosomonas* em torno de 35°C e para as *Nitrobacter* 35 a 42°C, o que pode explicar o número menor dessas bactérias nos reatores, uma vez que, a temperatura nesses ficou na maior parte do experimento entre 20 e 27°C não atingindo em nenhum dia temperatura superior a 30°C. A desnitrificação ocorre preferencialmente em temperaturas entre 10 e 30°C (EPA, 1993). A temperatura média ao longo do processo ficou em torno de 23°C, o que pode ter favorecido o maior número de desnitrificantes bem como esse tipo de bactéria ser heterotrófica.

De acordo com Dinçer e Kargi (2000), a nitrificação ocorre com um pH ótimo que deve estar entre 7,5 e 8,5, em valores inferiores à 6,5 a nitrificação praticamente não ocorre por escassez de amônia livre e elevação da concentração de ácido nitroso. Na Figura 13, foi possível observar que o pH na grande maioria dos dias de operação variou entre 6,0 e 6,5, mesmo esse fator não sendo favorável houve o processo de nitrificação em todos os reatores. O pH no RBSB apresentou valores superiores ao RBSE e RBSS o que pode ter favorecido o número de BOA e BON maior entre os reatores.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA SECA ADERIDA

A estimativa de biomassa seca aderida nas unidades de meio suporte nos RBS encontra-se representada na Figura 17 e Tabela 15

Observou-se que ao longo do tempo de operação o meio suporte bucha vegetal teve uma tendência de crescimento da biomassa aderida, indicando boa formação de biofilme e depois apresentou uma tendência de redução. Acredita-se que essa redução possa estar associada a biodegradação da bucha, visivelmente perceptível a partir do 21º dia de operação, onde a retirada de uma unidade inteira do interior do reator tornou-se complicada, uma vez que, ao pinçar ela desagregava.

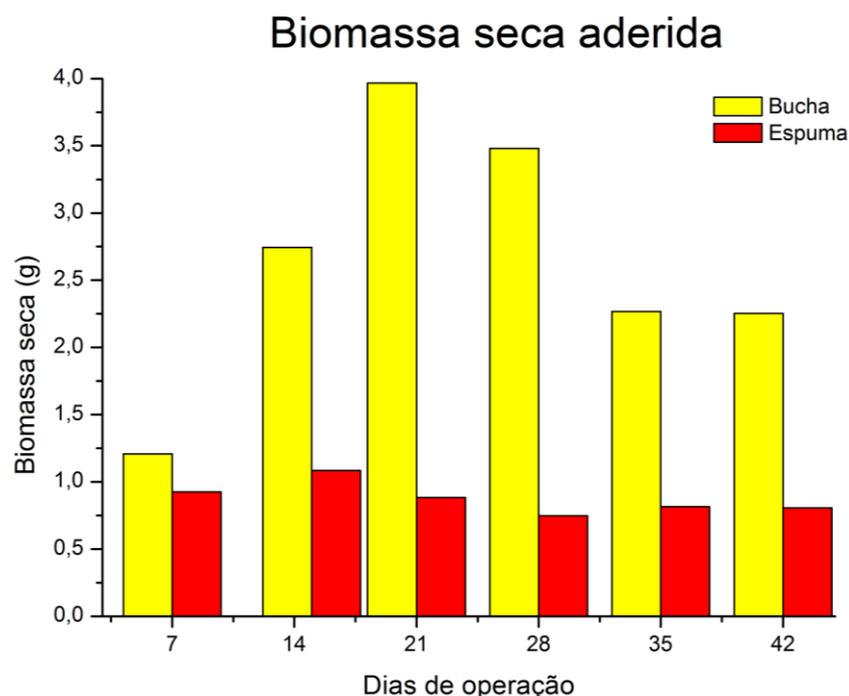


Figura 17: Perfil de concentração de biomassa seca aderida ao meio suporte em RBS.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 15: Concentração em gramas da biomassa seca aderida ao meio suporte.

Quantidade de biomassa seca aderida (g)		
Dias de Operação	Bucha	Espuma
7	1,209	0,926
15	2,743	1,084
21	3,968	0,882
28	3,480	0,747
35	2,268	0,815
42	2,254	0,805

Fonte: Autoria própria.

O meio suporte espuma manteve a concentração de biomassa seca praticamente constante (valor médio de 0,88g), com valores bem abaixo da bucha vegetal.

O comportamento da biomassa seca aderida pode estar relacionado com a espessura do biofilme. Acredita-se que na bucha vegetal o biofilme era espesso, assim há um elevado crescimento microbiano e na espuma de poliuretano uma espessura intermediária. Segundo Von Sperling (1996) a taxa de crescimento bacteriano torna-se constante, sendo o suprimento de matéria

orgânica limitado, os microrganismos assumem um metabolismo apenas para sua manutenção.

Segundo Schneider (2010), a atividade do biofilme não é proporcional a quantidade de biomassa fixa, entretanto aumenta com a espessura do biofilme até um determinado nível. Após esse nível o consumo de substrato ao longo do biofilme pode privar estes nas camadas mais internas, diminuindo assim sua atividade.

5.5 CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

A estrutura dos biofilmes é composta de micro colônias de células envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas (EPS), onde os canais hidrodinâmicos que separam as micro colônias proporcionam a difusão de nutrientes, oxigênio e detritos (COHN *et al*, 2010).

Os EPS são os principais componentes da matriz do biofilme, sendo uma mistura complexa de biopolímeros, sendo seu principal componente os polissacarídeos (KOKARE *et al.*, 2009 e COHN *et al.*, 2010).

A concentração de polissacarídeos presente na bucha vegetal (Figura 18 e Tabela 16) apresentou-se condizente com os valores de UFC/mL encontrados, excluindo o 28^o dia de operação, que apresentou uma pequena queda diferente do observado em relação às UFC/mL que apresentou-se com valores próximos ao do 21^o dia. Pode-se observar que no 35^o dia de operação a concentração de polissacarídeos apresentou valor mais alto e logo depois houve uma queda da concentração, bem como observado nos resultados de UFC/mL.

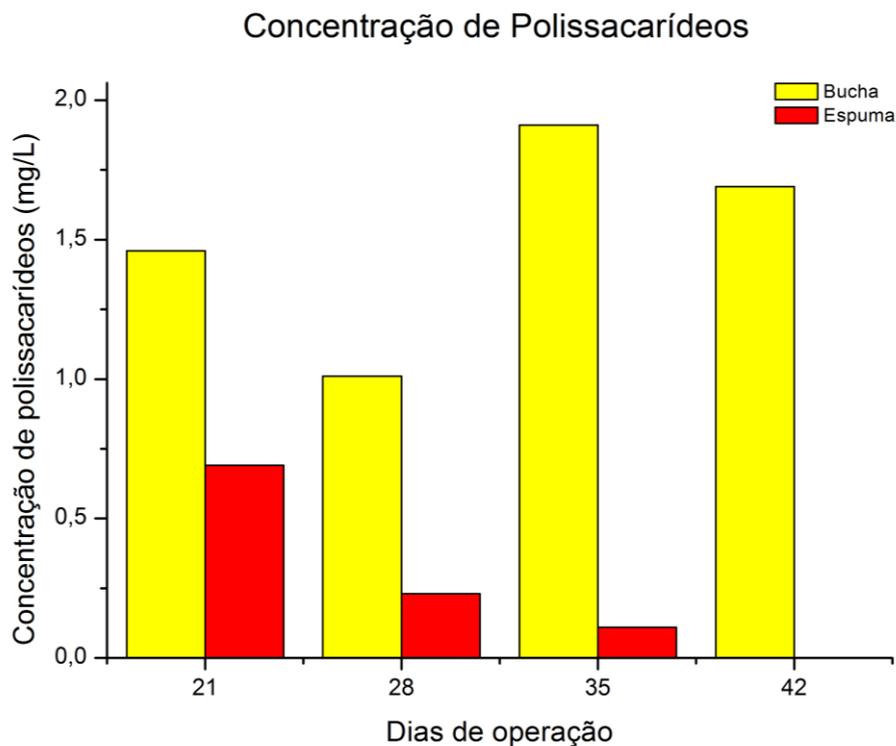


Figura 18: Comportamento do percentual da concentração de polissacarídeos nos meios suportes.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 16: Concentração de polissacarídeos encontrados no RBSB.

Concentração de Polissacarídeos (mg.L ⁻¹)		
Dias de Operação	Bucha	Espuma
21	1,46	0,69
28	1,01	0,23
35	1,91	0,11
42	1,69	-

Fonte: autoria própria.

A concentração de polissacarídeos presentes na espuma de poliuretano revelou um comportamento diferente em relação ao UFC/mL, onde a concentração a partir do 21º dia apresentou uma tendência de decaimento, enquanto nos resultados de UFC/mL se manteve praticamente constante. No 42º dia de operação houve um erro de manipulação e leitura das amostras provenientes da espuma de poliuretano.

5.6 ENSAIOS QUALITATIVOS

5.6.1 Análises em estereomicroscópio

A análise do meio suporte diretamente ao estereomicroscópio revelou uma tendência de maior aderência ao longo dos dias de operação na bucha e nas espumas de poliuretano com exceção no 28º dia de operação. As porcentagens de cobertura estão contempladas na Tabela 17.

Tabela 17: Superfície coberta dos meios suporte nos RBS.

Dias de Operação	% Aderida	
	Bucha	Espuma
07	15	15
15	35	30
21	55	60
28	60	50
35	70	80
42	95	85

Fonte: Autoria própria.

A Figura 19 apresenta o comportamento de superfície aderida na bucha vegetal nas fotos comparativas para quatro semanas de análises. Na bucha vegetal e na espuma era possível visualizar uma camada de biofilme até mesmo a olho nu.

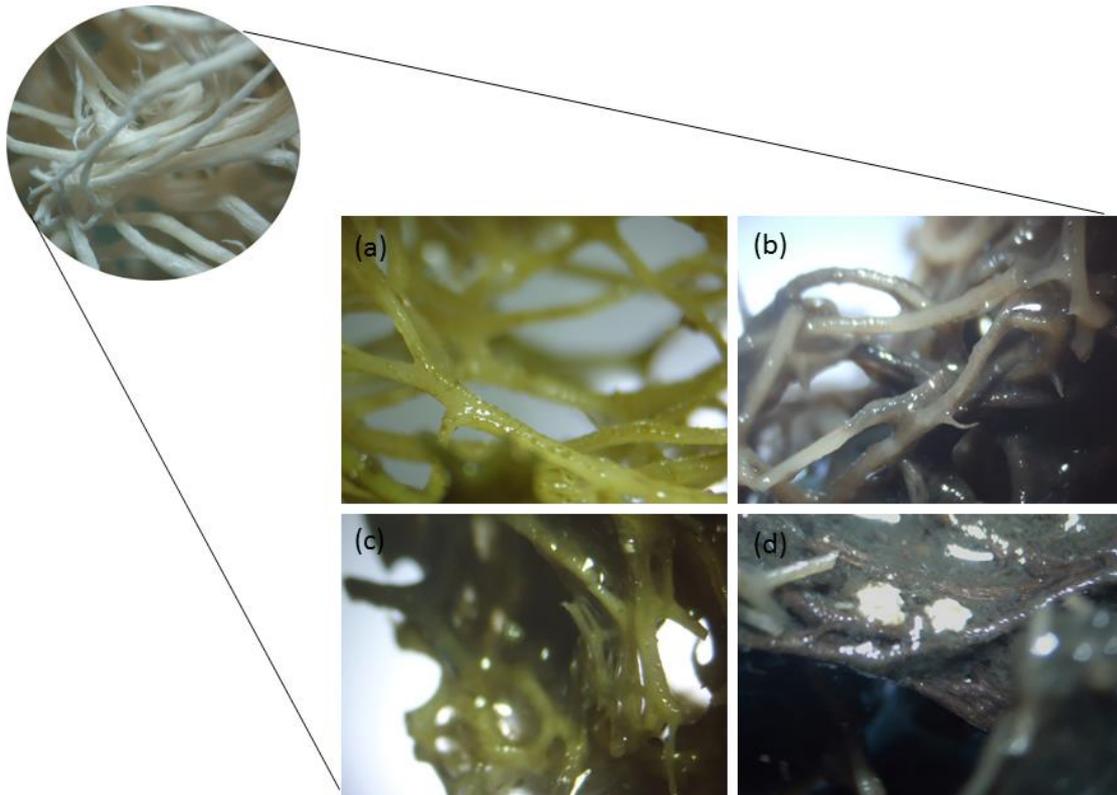


Figura 19: Fotos do meio suporte-bucha vegetal observadas em estereomicroscópio. Em (a) 7 dias de operação; (b) 14 dias de operação; (c) 21 dias de operação e em (d) 28 dias de operação. Aumento de 20x.

Fonte: Autoria própria.

A presença de protozoários foi identificada em 80% das observações, em apenas uma análise foi encontrado um organismo semelhante ao ácaro (Figura 20).

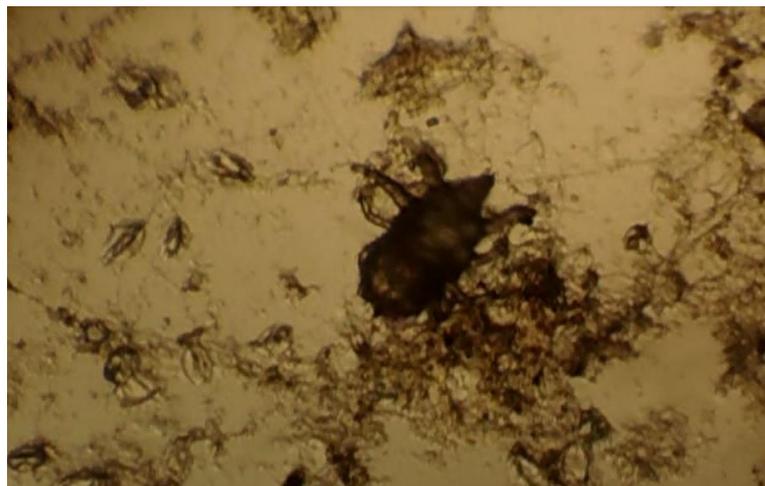
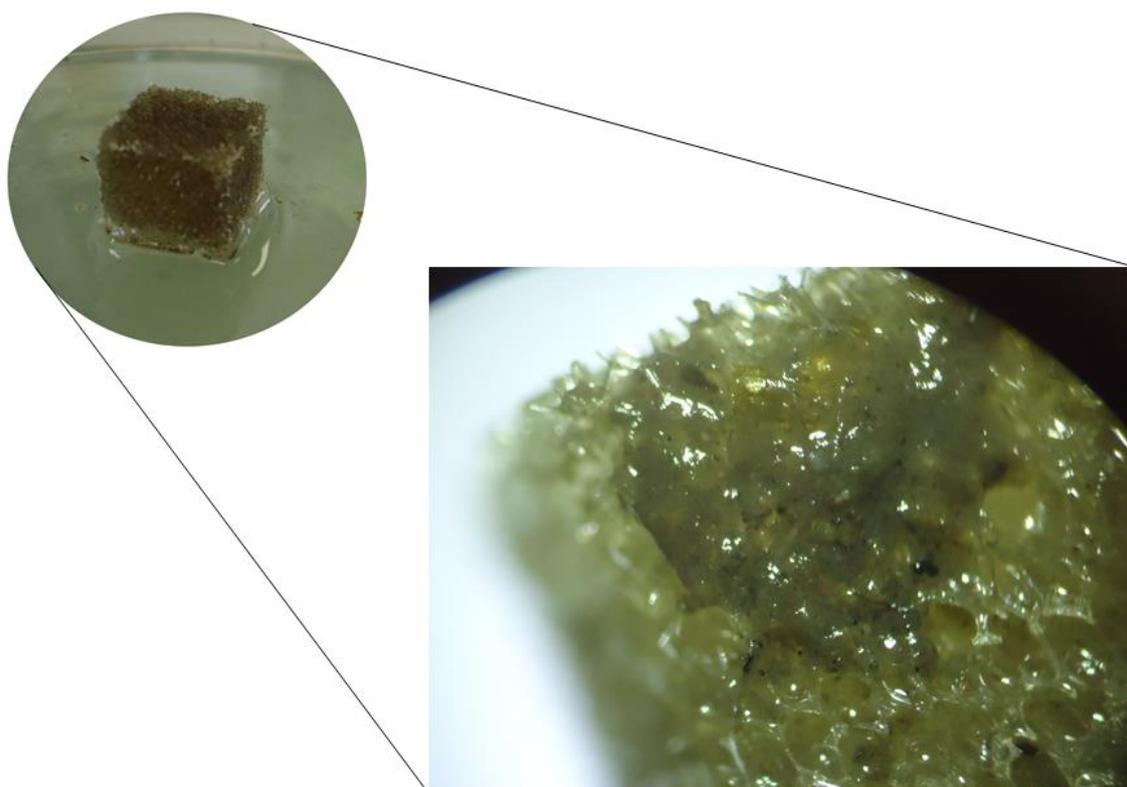


Figura 20: Microrganismo semelhante ao ácaro, aumento de 20x.
Fonte: Autoria própria.

Foi possível perceber que no início da operação o material ficava aderido mais superficialmente nos poros da espuma e conforme decorria o tempo de detenção percebia-se material mais no interior da amostra (Figura 21). Também se identificou protozoários e na última semana foram encontradas algumas larvas de inseto nas paredes do reator.



**Figura 21: Material aderido a espuma de poliuretano, aumento de 20x.
Fonte: Autoria própria.**

5.6.2 Análises em microscópio

As análises microscópicas auxiliam na identificação da tendência de funcionamento do reator, podendo demonstrar a eficiência da remoção de matéria orgânica, indicar a adequação da aeração empregada e revelar a ocorrência de sobrecargas orgânicas (VAZOLLER, 1989).

A observação à fresco em microscópio óptico do efluente assim que foi coletado revelou a presença de protozoários da classe rotíferos e flagelados (Figura 22).

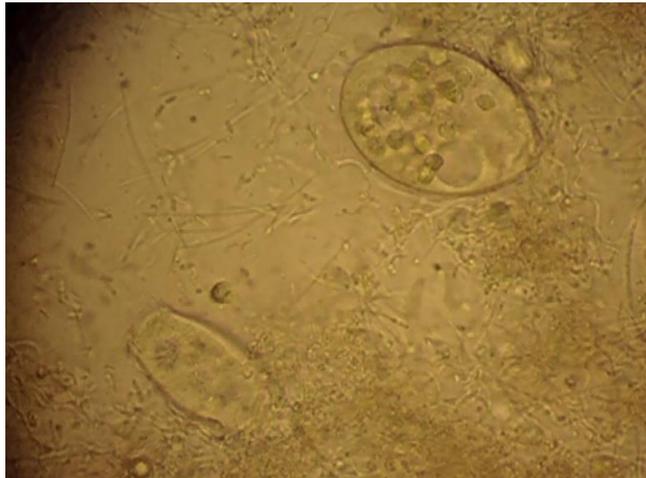


Figura 22: Protozoários presente no esgoto sanitário.
Fonte: Autoria própria.

Em reatores biológicos, os rotíferos têm papel no topo da cadeia trófica, cuja presença indica uma boa eficiência do processo de depuração biológica, uma vez que são muito eficientes no consumo de bactérias dispersas ou aderidas ao floco, e pequenas partículas de matéria orgânica (VAZOLLER, 1989).

A microscopia a fresco do esgoto sanitário em todos os RBS mostrou a presença de alguns rotíferos e também a presença de alguns ciliados fixos como *Vorticellas* (Figura 23) que indica boas condições de tratamento referente à oxigenação do meio líquido e quanto a capacidade de depuração da matéria carbonácea (CANLER et al., 1999 apud AGRA, 2009).

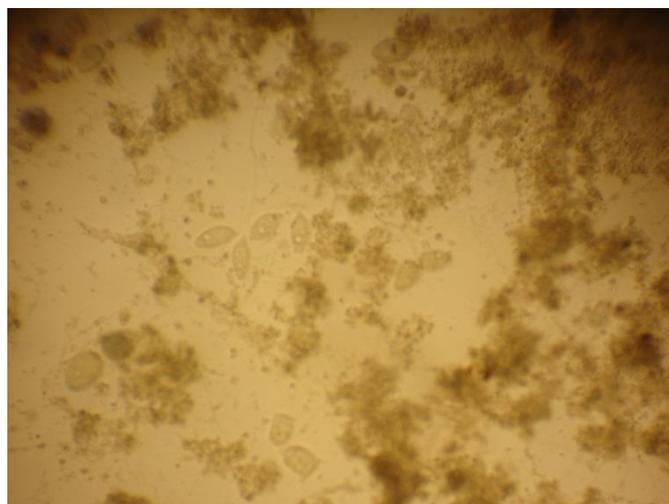


Figura 23: Presença de *Vorticellas*.
Fonte: Autoria própria.

A microscopia das lâminas presente no interior do reator para observação dos microrganismos independente de cultivo com coloração de Gram revelou uma porcentagem de aderência maior nas lâminas do RBSS. O resultado é esperado, pois os microrganismos utilizaram a lâmina para a adesão. De maneira geral, as lâminas do RBSE e RBSB comportaram-se semelhante aos UFC/mL respectivos.

Foi possível observar uma grande diversidade de microrganismos (Figura 24) entre eles: cocos Gram positivos e negativos sendo a maioria positivos, bacilos Gram positivo e negativos, estreptococos e estreptobacilos Gram positivos e negativos, vibriões e bactérias filamentosas.

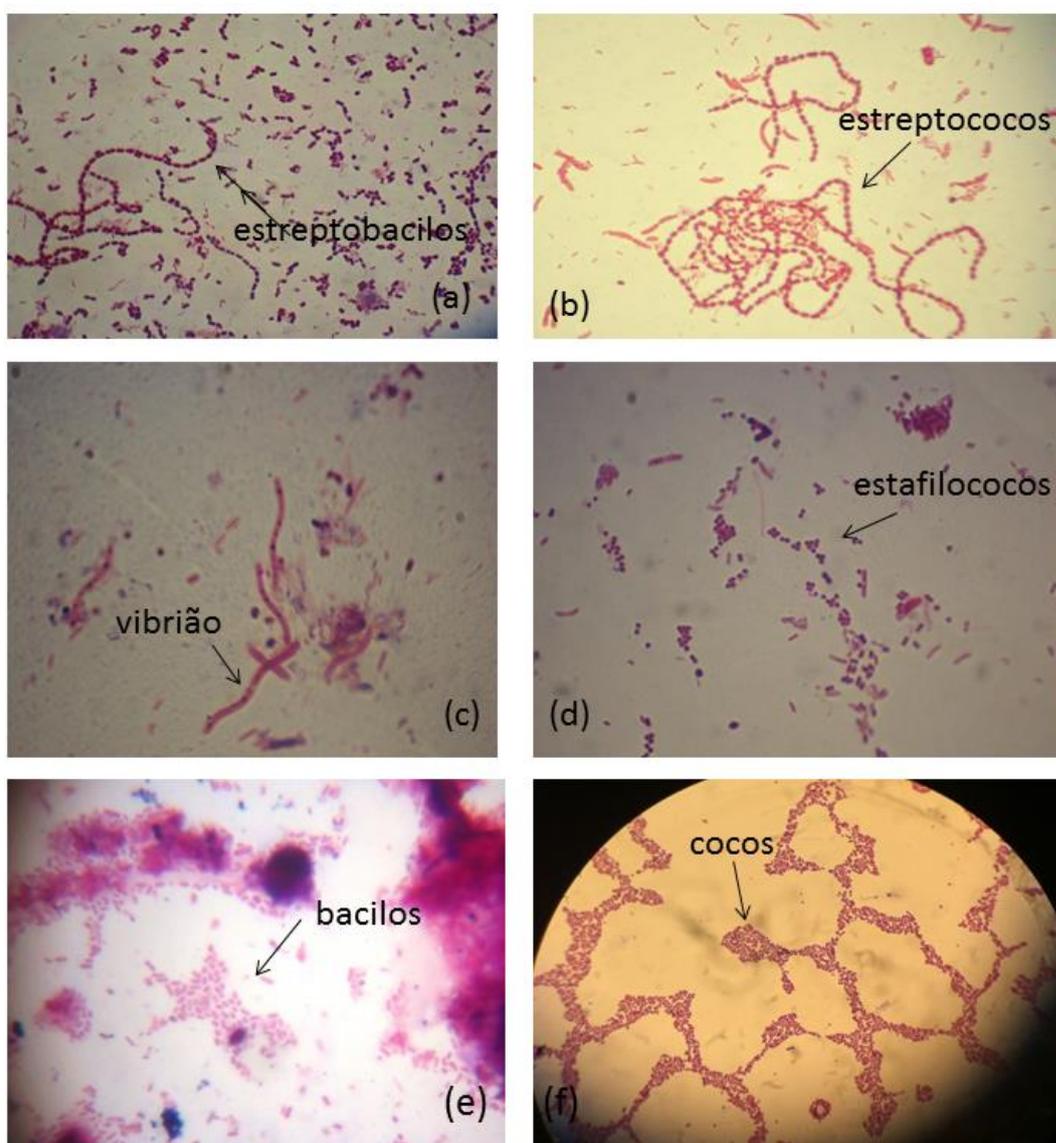
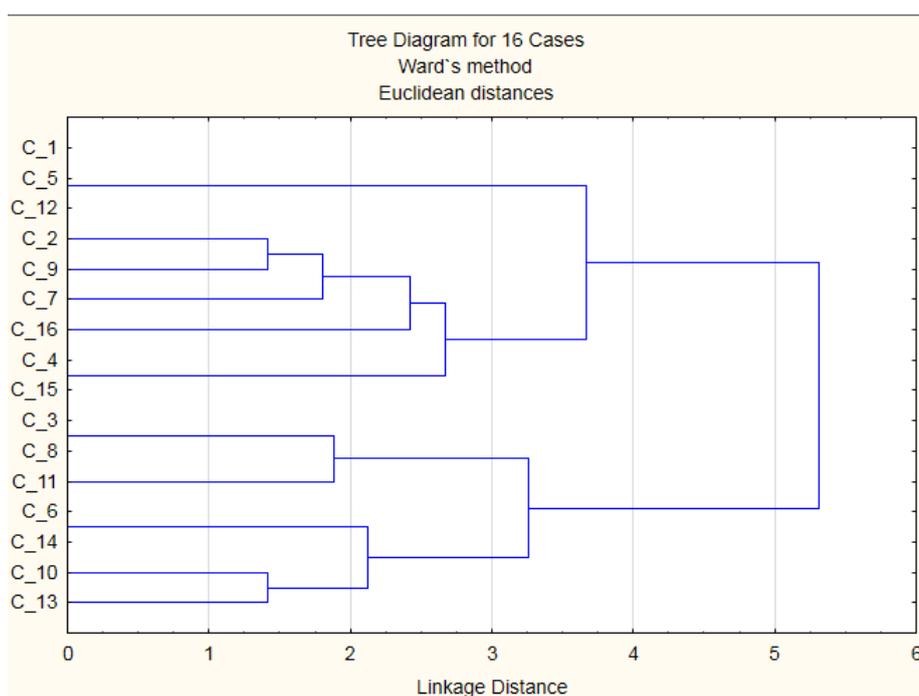


Figura 24: Diversidade microbiológica encontrada nas lâminas de vidro inseridas nos reatores. Em (a) estreptobacilos, (b) estreptococos, (c) vibrião, (d) estafilococos, (e) bacilos e em (f) cocos. Objetiva de 100x.
Fonte: Autoria própria.

Após a caracterização das colônias isoladas de bactérias heterotróficas, obteve-se dezesseis colônias visualmente diferentes, seguindo o esquema de caracterização de colônias bacterianas de Rodina (1972). Dentre elas, percebeu o crescimento de algumas apenas nos primeiros dias de operação, as demais apresentaram-se em todas as análises. Chamou a atenção uma colônia com coloração roxa que apareceu apenas uma vez nas análises. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido a adaptação e o meio favorecer seu desenvolvimento.

Analisando o dendograma (Figura 25) feito com base na caracterização de colônias percebe-se que algumas colônias apresentam as mesmas características entre si como, por exemplo, a colônia 1 e colônia 5. O dendograma é um recurso importante no auxílio da avaliação da diversidade de espécies nos reatores estudados.



**Figura 25: Dendograma as colônias caracterizadas segundo Rodina (1972).
Fonte: Autoria própria.**

6. CONCLUSÕES

Após a execução do trabalho foi possível concluir que:

- A temperatura não influenciou na formação de biofilme nos reatores e o pH foi fator que pode ter influenciado nas reações que ocorreram nos RBS;
- Os reatores apresentaram valores de eficiência semelhantes na remoção de amoniacal, sendo que apresentou melhor remoção de amoniacal foi o sem meio suporte, seguido pelo com bucha vegetal e por último, com espuma de poliuretano;
- O reator com bucha vegetal apresentou uma TCO maior que o reator com espuma devido ao número de microrganismos presente no reator;
- A estimativa de bactérias heterotróficas foi na ordem de 10^8 a 10^{12} no RBSB, 10^7 a 10^8 para o RBSE e 10^5 a 10^8 para o RBSS. Apesar da diferença de UFC/mL os três reatores apresentaram favoráveis ao desenvolvimento destas bactérias;
- O NMP das bactérias envolvidas na remoção de nitrogênio indicou que as condições ambientais e operacionais influenciaram no desenvolvimento destas. Os microrganismos presente no RBSE foram mais eficientes na conversão do nitrogênio.
- Ao longo da análise foi analisado uma grande diversidade de microrganismos nos três reatores, incluindo protozoários e bactérias (cocos, bacilos e arranjos);
- O reator com material suporte utilizado para formação do biofilme na bucha vegetal (RBSB) mostrou melhor desempenho, proporcionando condições adequadas para a aderência e crescimento de microrganismos capazes de metabolizar compostos orgânicos;
- O reator com espuma de poliuretano não apresentou condições favoráveis ao estabelecimento do biofilme comportando-se muito similarmente ao reator sem a presença de meio suporte

REFERENCIAS

AGRA, C. de A. **Tratamento de águas residuárias domésticas em reatores de biomassa dispersa e biomassa aderida**. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado).

ALMEIDA, P. G. S.. **Efeito de diferentes tipos de meio suporte no desempenho de filtros biológicos percoladores aplicados ao pós-tratamento de efluentes de reatores UASB, com ênfase na nitrificação**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 156p. Tese (mestrado).

ANDREOTTOLA, G.; OLIVEIRA, E. L.de; FALADORI, P.; DALLAGO, L.; PETERLINI, R.; CADONNA, M. Método respirométrico para o monitoramento de processos biológicos. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**. V.10, n.1 jan/mar, p. 14-23, 2005.

APHA, AWWA, WEF (2005). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 edition, American Public Health Association, Washington, D.C.CLIPPING.

ARTAN, N.; ORHON, D. **Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal**. IWA Publishing, 2005. 99p. Disponível em:<http://books.google.com.br/books?id=0MEuNR99O1AC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em 26 de abril de 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9898**: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro: ABNT, 1987. 22p.

AZEVEDO, J. L. de; MELO, I. S. de. **Ecologia microbiana**. Jaquatiúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

BARROS, M. V. F. et al. **Atlas Ambiental da Cidade Londrina 2008**. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/atlasambiental/AMBIENTAL/CONDICAO.htm>>. Acesso em: 13 de abril 2012.

BERGAMASCO, R. **O uso de partículas poliméricas para adesão microbiana em tratamento biológico de resíduos**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 1996. 166p. Tese (doutorado).

BITTON, G.. **Wastewater Microbiology**. 3ªed. Department of Environmental Engineering Sciences. University of Florida, Gainesville, Florida. Copyright by John Wiley & Sons, Inc. 2005.

BRASIL. Lei 11.445 de 5 de janeiro de 2007. Estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/l11445.htm>. Acesso em 13 de maio de 2013.

BRASIL. Lei 9.433 de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/l9433.htm>. Acesso em 13 de maio de 2013.

BUENO, R. F. **Nitrificação e desnitrificação simultânea em reator com biomassa em suspensão e fluxo contínuo de esgoto**. Universidade de São Paulo – Faculdade de saúde pública. São Paulo, 2011, 143p. Tese (Mestrado).

CAMPOS, R. H. de. **Estudo da remoção de carbono e nitrogênio de efluentes urbanos em um reator de leito fluidizado operado em bateladas sequenciais**. Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2006. 215p. Tese (Doutorado).

CHAVES, L. da C. D.. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfície em Contacto com Água Potável**. Universidade do Minho – Escola de Engenharia – Departamento de Engenharia Biológica, 2004. 186p. Tese (Mestrado).

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol.5. Belo Horizonte: Departamento de eng. Sanitária e Ambiental (DESA), UFMG, 1997. 246 p.

COHN, Sebastian; HAYES, Alysia; RENAULT Kristin. **The Effect of Substrate Variation on Biofilm Growth for Use in Wastewater Treatment**. 2010. 113f. Projeto (Bacharelado em Ciências) - WORCESTER POLYTECHNIC INSTITUTE, 2010. Disponível em: < <http://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-040810-131800/unrestricted/SCohnAHayesKRenaultMQP.pdf>>. Acesso em 17 de agosto de 2013.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos recursos hídricos e padrões de lançamento de efluentes. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 7 de agosto de 2013.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em 7 de agosto de 2013.

COSTA, T. B. **Desempenho de reator em batelada seqüencial (RBS) com enchimento escalonado no tratamento de esgoto sanitário doméstico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

- CULLER, H. F. **Formação de Biofilme por *Escherichia coli* enteropatôgena atípica.** Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo: USP, 2010. 32 p. Tese (Mestrado).
- DE LUCCA, S.J.; FACCIN, M. Avaliação preliminar de reator sequencial de batelada. XVI Congresso Brasileiro Engenharia Sanitária e Ambiental, Anais.ABES. Goiânia, GO, v. 2, tomo I , p.113-128, 1991.
- DINÇER, A.R. and KARGI, F. Kinetics of Sequential Nitrification and Denitrification Process. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 27, p. 37 – 42, 2000.
- EPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Manual Nitrogen Control. Technology Transfer.** Cincinnati, 1993, 311p.
- ESTEVEZ, F.de A. **Fundamentos da Limnologia.** 2ª ed. – Rio de Janeiro : Interciência, 1998.
- FERNANDES, J. G. S; HAANDEL, A. Van; CAVALCANTI, P.F.F.; COURA, L.R.. Utilização da respirometria no controle operacional de sistemas aeróbios de tratamento de águas residuárias – A experiência da Cetrel. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.** V.6, n.3 jul/set e n.4 out/dez, 2001.
- FLORENCIO, L.; ALMEIDA, P. G. S., MENDONÇA, N. M.; VOLSAHM Jr, I.; ANDRADE NETO, C. O.; PIVELI, R. P.; CHERNICHARO, C. A. L... Nitrificação em Reatores Aeróbios com Biomassa Aderia. In: MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção.** Rio de Janeiro: ABES, 2009. Projeto PROSAB.
- FREITAS, B. de O.. **Remoção de nitrogênio de lixiviado de resíduos sólidos urbanos por meio do processo nitrificação/desnitrificação via nítrito em reator em bateladas seqüenciais.** Universidade de Brasília Faculdade Tecnologia - Departamento de engenharia civil e ambiental. Brasília, 2009. 95p. Tese (Mestrado).
- FUJII, Fábio. Y. **Análise Comparativa entre o processo de lodo ativado e o reator de biofilme de leito móvel na remoção de nitrogênio de esgoto sanitário.** Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011. 109 f. Tese (Mestrado).
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Saneamento.** 3. Ed.rev. – Brasília: Fundação Nacional de saúde, 2006. 408 p.
- GERALDI, M. H. (Org.). **Wastewater Biology: The life Processes.** Alexandria: Copyright, 1994. 184p.
- GODOY, T. G. **Biofiltro aerado submerso aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator UASB, sob condições hidráulicas desfavoráveis –**

estudo em escala real. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007. 177p. Tese (Mestrado).

GONÇALVES, R.F.; CHERNICARO, C.A.L.; ANDRADE NETO, C.O.; SOBRINHO, P.A.; KATO, M.T.; COSTA, R.H.R.; AISSE, M.M; ZAIAT, M. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Capítulo 4 – Pós-Tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. **PROSAB 2**, p.171-278, 2001.

IAMAMOTO, Cristina Yuriko. **Remoção de nitrogênio de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal em reator contendo biomassa em suspensão operado em batelada seqüenciais e sob aeração intermitente.** Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006 119p. Tese (Doutorado).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – 2010.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/PNSB_2008.pdf>. Acesso em 18 de junho de 2011.

ISOLDI, L. A.; KOETZ, P. R. Tratamento biológico de matéria carbonada e nitrogenada. **Revista eletrônica Mestr. Educ. Ambient.** V. 12, janeiro a junho de 2004.

JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGE, G. T.. **Manual on the causes and control of active sludge bulking, foaming, and other solids separation problems.** 3rd Edition. Iwa Publishing, 2003. 177p.

JORDÃO, E. D.; PESSÔA, C. A.. **Tratamento de Esgotos Domésticos.** 4^a Edição. Rio de Janeiro, 2005. 932 p.

KOKARE, C. R. et al. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology.** v. 8, p. 159-168, abr. 2009.

LAMEGO NETO, L. G. **Tratamento de esgoto urbano em reator hídríbo operado em batelada sequenciais (RHBS) submetido a variações de cargas.** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC. 2008. 224p. Dissertação (Mestrado).

LAMEGO NETO, L. G.; DA COSTA, R. H. R. Tratamento de esgoto sanitário em reator hídríco em batelada sequenciais: eficiência e estabilidade na remoção de matéria orgânica e nutrientes (N, P). **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.** Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Vol. 16, n. 4, out/dez. Rio de Janeiro: ABES, 2011. p. 411- 420.

LEME, E. J. A. **Manual prático de tratamento de águas residuárias.** São Carlos: EdUFSCar, 2010.

MACHADO, S. M. de O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle de formação de biofilme indesejável.**

Universidade do Minho – Escola de Engenharia – Departamento de Engenharia Biológica, 2005. 114p. Tese (Mestrado).

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; **Microbiologia de Brock**. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**. Elsevier, 2009. 598p.

MELO, L. F. Biofilm formation and its role in fixed film processes. In: HORAN, Ningel; MARA, Duncan. **Water and Wastewater Microbiology**. p. 337 – 340, 2003. Disponível em: < http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=T6biHTO4E3kC&oi=fnd&pg=PA337&dq=related:RNIVL_Hjb0iOXM:scholar.google.com/&ots=hRYe4RuZ49&sig=2ZlanAsIP9k52fd9Dn5jGmG422Q#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 08 de junho de 2013.

MENDONÇA, L.C. **Microbiologia e cinética de sistemas de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2002. 184p. Tese (Doutorado).

MÚRIAS DOS SANTOS, M. O. R. **O impacto da cobrança pelo uso da água no comportamento do usuário**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002. Disponível em:< <http://pt.scribd.com/doc/51240592/25/Caracteristicas-dos-efluentes-domesticos-e-urbanos>>. Acesso em 27 jun de 2013.

OLIVEIRA, A. C. DEL G.. **Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel**. Universidade Estadual de Londrina, 2012. 130p. Tese (mestrado).

PICANÇO, A. P. et al. **Avaliação da atividade biológica do biofilme formado em materiais suportes de filtros anaeróbios de fluxo ascendente**. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2003.

PIEROTTI, S. M. **Avaliação da partida de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), em escala real, sob condições hidráulicas desfavoráveis**. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007. 177p. Tese (Mestrado).

PREFEITURA MUNICIPAL DE LONDRINA-PARANÁ. **Plano municipal de saneamento básico de Londrina-PR: Diagnostico 2008-2009**. Disponível em:< http://www.londrina.pr.gov.br/dados/images/stories/Storage/gabinete/PMSB/diagnostico_londrina_completo_corrigido29out09.pdf>. Acesso em 08 de junho de 2013.

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY P. S.. Bacterial coaggregation: an integral process in the

development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**. Vol. 11, n.2, February 2003.

RODINA, A. G. **Methods in aquatic microbiology**. Baltimore. University Park Press. 1972.

RODRIGUES, I. V. e SILVA, M. G. e. Dinâmica populacional e rede coletora de esgoto. In: **Atlas de Saneamento 2011**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm>. Acesso em: 20 abril 2012.

ROUSE, J.D., BURICA, O. STRAZAR, M.. A pilot-plant study of a moving-bed biofilm reactor system using PVA gel as a biocarrier for removals of organic carbon and nitrogen. **Water Science and Technology**, v. 55, n. 8-9, pp. 135 - 141. 2007.

RUBINO, F.F.; ARAÚJO, O. Q. F.; COELHO, M. A. Z.. **Remoção biológica de nutrientes em reator batelada sequencial**. 2º Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás. 2003. Disponível em:< <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/2/6178.pdf>>. Acesso em 28 de junho de 2013.

SALVETTI, R., Azzellino, A., Canziani, R. and Bonomo, L. Effects of temperature on tertiary nitrification in moving-bed biofilm reactors. **Water Reserch**.v.40 , p. 2981– 2993, 2006a.

SANEPAR. **Em Londrina coleta de esgoto subirá de 87% para 93%**. Site Sanepar, 08 de abril de 2011. Disponível em:< <http://site.sanepar.com.br/noticias/em-londrina-coleta-de-esgoto-subira-de-87-para-93>>. Acesso em 12 de agosto de 2013.

SANT'ANNA JR, G. L. **Tratamento Biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2010. 398p

SCHNEIDER, E. E. **Avaliação de um reator de leito móvel com biofilme para tratamento de efluente da indústria do petróleo, com posterior ozonização acoplada a carvão ativado granular com biofilme**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010. 191p. Dissertação (Mestrado).

SOARES, L. V. **Pós tratamento de esgoto sanitário em reator anaeróbio compartimentado utilizando biofiltro aerado submerso**. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003. 181p. Dissertação (Mestrado).

SOUZA e FORESTI. Avaliação de reator sequencial em batelada no pós-tratamento de efluente de reator UASB. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**. ABES-RJ, vol. 6, números 1 e 2, pg 9-16, 2001.

TAVARES, C. R. G. **Tratamento aeróbio d efluentes em bio-reatores de leito fluizado trifásico**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1992. Tese (Doutorado).

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. Trad. Atual por Roberta Marchiori Martins. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

VAZOLLÉR, Rosana Filomena; et al. **Microbiologia de lodos ativados**. São Paulo: CETESB, 1989. 23pg.

VIEIRA, M. J. **Estudo da formação de biofilme biológico por *Pseudomonas fluorescens* e dos efeitos associados à transferência de massa interna e a incorporação de partículas de caulino**. Universidade do Minho – Escola de Engenharia – Departamento de Engenharia Biológica, 1995. 216p. Tese (Doutorado).

Von SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; 1996.

VON SPERLING; M. **Introdução a Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos** – Vol.1. Belo Horizonte, 3ª ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; UFMG, 2005. 452p.

XAVIER, J. B. et al. **Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes**. Boletim de Biotecnologia. nº 76, 1-12. Ano 2003.