

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

CAMILA ZOE CORREA

**USO DE MICRO-ORGANISMOS EFICIENTES (EM's) NA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM ESPUMA DE POLIURETANO NO
TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**LONDRINA
2014**

CAMILA ZOE CORREA

**USO DE MICRO-ORGANISMOS EFICIENTES (EM's) NA FORMAÇÃO
DE BIOFILMES EM ESPUMA DE POLIURETANO NO TRATAMENTO DE
ESGOTO SANITÁRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão
de Curso 2, do Curso Superior de Engenharia
Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná, Campus Londrina.

Orientador: Prof^a. Dr. Kátia Valeria Marques
Cardoso Prates

Co-orientador: Prof. Bruno de Oliveira Freitas

LONDRINA

2014



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



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Monografia

Uso de micro-organismos eficientes (EM's) na formação de biofilmes em
espuma de poliuretano no tratamento de esgoto sanitário

por

Camila Zoe Correa

Monografia apresentada no dia 21 de Janeiro de 2014 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)

Prof^a. Dra. Joseane Debora Peruço Theodoro
(UTFPR)

Prof^a. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates
(UTFPR)
Orientadora

Prof^a. Dra. Joseane Debora Peruço Theodoro
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

Ao papai do céu que me concedeu saúde, confiança e sabedoria no decorrer deste trabalho.

E ao meu espelho e minha inspiração, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Nem se eu escrevesse um livro não conseguiria agradecer a todas as pessoas que me ajudaram de maneira direta e indireta na realização e conclusão de mais esta fase da minha vida.

Mas primeiramente e como em tudo, quero agradecer ao Papai do céu que me concedeu tudo que conquistei por me dar força e colocar em minha vida pessoas maravilhosas.

De todas as pessoas que me ajudaram direta e indiretamente gostaria de agradecer algumas em especial. Primeiramente a minha família pela paciência que tiveram comigo durante todo o trabalho, especialmente a minha mamãe que por muitas vezes me deu colo quando eu precisei.

Ao meu irmão e minha cunhada que me acolheram em sua casa durante toda a minha graduação.

A Danielle Hirome Nakagawa e Luiz Fernando Demetrio pela amizade e ajuda concedida na realização das amostragens deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial Thais Cristina Fernandes e Lucas Vital pelo carinho e paciência a mim concedidos durante todos os momentos em que eu mais precisei.

Ao meu co-orientador, Prof. Bruno de Oliveira Freitas, pela ajuda crucial no desenvolvimento e operação do sistema trabalhado neste experimento.

E em especial a duas pessoas: A minha orientadora Prof^a. Dr^a Katia Valéria Marques Cardoso Prates pela sua dedicação e orientação, me ensinando e me ajudando a crescer e a minha querida Prof^a. Dr^a Tatiane Cristina Dal Bosco, pelo carinho expresso na forma de um abraço que me deu força para continuar minha caminhada até aqui.

Aqui vai o meu MUITO OBRIGADA, vocês são pessoas maravilhosas que o papai do céu colocou na minha vida, jamais esquecerei cada um de vocês.

“As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas, mas o seu eco é infindável” (Madre Teresa de Calcuta).

RESUMO

CORREA, Camila Zoe. Uso de micro-organismos eficientes (EM's) na formação de biofilmes em espuma de poliuretano no tratamento de esgoto sanitário 2013. 93 f. Monografia (Graduação) – Curso Superior em Bacharelado de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2013.

Neste presente estudo buscou-se verificar qual a influência que a inserção dos Micro-organismos eficientes (EM's) pode exercer na formação de um biofilme em um sistema de tratamento de esgoto sanitário. Para atingir este objetivo foi montado um sistema de tratamento biológico composto por dois Reatores em Bateladas Sequenciais aerados (RBS) idênticos, com inserção de EM's (RBS1) e sem inserção de EM's (RBS2), tendo como meio suporte espuma de poliuretano para imobilização da biomassa, ambos alimentados com esgoto sanitário. Estes reatores operaram com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8 horas, sendo que em cada batelada, no RBS1 eram inseridos 6,5 mL de solução de EM's. Foi realizada a caracterização quali-quantitativa inicial dos EM's inseridos no RBS1, bem como caracterização de EM's presentes no esgoto sanitário em cada coleta realizada no Serviço Autônomo Municipal de Água e Esgoto (SAMAE). A caracterização dos EM's foi realizada por meio da determinação da Unidade Formadora de Colônia/mL (UFC/mL) de três grupos de EM's: bactérias fermentadoras de ácido lático, leveduras e actinomicetos além das bactérias heterotróficas. Análises de pH e DQO_T foram realizadas no esgoto coletado e na saída de ambos os reatores. Também foi realizada análise de Sólidos Totais Aderidos (STA) e Sólidos Totais Voláteis Aderidos (STVA) no meio suporte. Quanto às análises microbiológicas foram realizadas a quantificação da UFC/mL dos EM's e bactérias heterotróficas aderidas à espuma de poliuretano dos reatores, bem como a caracterização microscópica da diversidade dos micro-organismos aderidos e presentes no efluente por meio de exame a fresco e análise morfotintorial à coloração de Gram. Foi realizada a caracterização macroscópica das colônias de EM's e das bactérias heterotróficas cultivadas. Os resultados mostraram que a concentração final de EM's no RBS1 foi praticamente a mesma do RBS2, indicando que não houve diferença em termos de UFC/mL de EM's e bactérias heterotróficas em ambos os reatores. Nas primeiras horas de operação dos reatores constatou-se um aumento na quantidade de biomassa imobilizada de todos os organismos, sendo que em 16 horas de operação todos os do grupo dos EM's já haviam atingido sua maior concentração, sendo que as bactérias fermentadoras de lactose passaram de 10⁴ a 10⁷ UFC/mL, as leveduras de 10⁶ a 10⁹ UFC/mL e os actinomicetos de 10⁷ a 10⁹ UFC/mL. Quanto às bactérias heterotróficas apenas após 224 horas de operação é que foi obtido o pico em UFC/mL, partindo de 10⁸ a 10¹⁰. A análise para STA e STVA indicaram que houve aumento de matéria aderida no meio suporte dos 2 reatores. Quanto a microfauna não foi observado diferença entre os organismos observados no RBS1 e RBS2, e estes indicaram que o sistema estava funcionando de maneira eficiente. A coloração de Gram indicou predominância de estreptococos e estreptobacilos ambos Gram negativos. E a caracterização macroscópica indicou uma grande variedade de organismos para ambos os grupos analisados. De modo geral, conclui-se que a concentração de EM's inserida

no RBS1 não foi suficiente para proporcionar diferença na formação do biofilme nos reatores.

Palavras-chave: EM's, biofilme, esgoto sanitário e Reator em Bateladas Sequenciais aerado.

ABSTRACT

CORREA, Camila Zoe. **Efficient use of micro-organisms (EM's) in biofilm formation in polyurethane foam in sewage treatment.** 2013. 93 f. Monography (Graduation) - Bachelors Degree in Environmental Engineering. Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2013.

In this study we sought to verify what influence the efficient integration of Micro - organisms (EM 's) can play in biofilm formation in a system of sewage treatment . To achieve this goal it set up a biological treatment system consists of two reactors in Batch Sequential aerated (RBS) identical , with insertion of EM's (RBS1) and without inclusion of EM's (RBS2), with the support means polyurethane foam for immobilization of biomass, both fed with sewage . These reactors operated with a hydraulic retention time (TDH) of 8 hours , and in each batch , RBS1 were inserted in 6.5 L of EM's. Initial qualitative and quantitative characterization of EM's inserted into RBS1 was performed, as well as characterization of EM 's present in sewage in each collection held at SAMAE. The characterization of the EM's was performed by determining the colony forming unit / mL (UFC/mL) of three groups of EM's: fermenting lactic acid bacteria, yeasts and actinomycetes addition to heterotrophic bacteria. pH analyzes were performed in DQOT and sewage collected and output of both reactors . Total Solids Adhered analysis (STA) and Total Volatile Solids Adhered (STVA) was also performed in support medium. Regarding microbiological analyzes to quantify the UFC/mL of EM's and heterotrophic bacteria attached to the polyurethane reactors foam were performed, and microscopic characterization of the diversity of attached and present micro - organisms in the effluent by fresh examination and morphotypes analysis the Gram stain . Macroscopic characterization of colonies of EM's and cultivated heterotrophic bacteria was performed . The results showed that the final concentration of EM's in RBS1 was almost identical to the RBS2, indicating no difference in UFC/mL of EM's and heterotrophic bacteria in both reactors. From the first hours of operation of the reactors there was an increase in biomass immobilized in all organisms , where 16 hours of operation all the group of EM's already had reached its highest concentration , and the fermenters of lactose increased from 10^4 to 10^7 UFC/mL , yeast 10^6 for 10^9 UFC/mL and actinomycetes 10^7 for 10^9 UFC/m . As for heterotrophic bacteria only after 224 hours of operation is that the peak was obtained in UFC/mL , starting 10^8 for 10^{10} . The analysis for STA and STVA indicated an increase of matter adhered in the middle of bracket 2 reactors. As for microfauna was no difference between the organisms observed in RBS1 and RBS2 observed, and these indicated that the system was run efficiently. The Gram stain showed predominantly streptococci and Gram negative streptobacilos both. And the macroscopic characterization indicated a wide variety of organisms examined for both groups. In general, it concludes that the EM 's concentration inserted into the RBS1 was not sufficient to provide the difference in biofilm formation in the reactor .

Keywords: EM's, biofilm, sanitary sewer and Sequential Batch Reactor in aerated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de formação de um biofilme.	20
Figura 2 - Transformação e síntese dos materiais em um biofilme.	26
Figura 3 - Fases de operação de um reator em batelada sequencial.	30
Figura 4 - Representação do sistema utilizado no experimento.	36
Figura 5 - Sistema completo utilizado para realização dos experimentos.	37
Figura 6 – Espuma de poliuretano e boby utilizados como meio suporte.	38
Figura 7 - Suporte de plástico para acomodação das lâminas de vidro no interior dos reatores.	38
Figura 8- Localização da mata onde foi realizada a captura dos micro-organismos eficientes.	39
Figura 9 - Procedimentos de caracterização dos EM's – diluição em série e contagem em placa.	41
Figura 10 – Perfil temporal após 344 horas de operação dos reatores.	53
Figura 11 - Imagem dos poros da espuma em estereoscópio (Aumento de 100x).	55
Figura 12 - Resultado da quantificação dos micro-organismos presente na espuma de poliuretano em escala logarítmica do grupo dos EM's (Bactérias fermentadoras de Lactose e Leveduras) dos reatores.	57
Figura 13 - Resultado da quantificação dos micro-organismos presente na espuma de poliuretano em escala logarítmica do grupo dos EM's (Actinomicetos) e bactérias heterotróficas dos reatores.	58
Figura 14 - Organismos presentes nas espumas de poliuretano de ambos os reatores observados em microscópio ótico (Aumento de 1000x).	67
Figura 15 - Organismos presentes nas laminas de vidro situadas no fundo de ambos os reatores observados em microscópio ótico (Aumento de 100x, exceto para n que foi 10x).	68
Figura 16 - Curva das populações de micro-organismos em relação ao tempo de aeração e a estabilização da matéria orgânica.	70

Figura 17 - Dinâmica de colonização de lodos ativados em estações de tratamento biológico de águas residuais desde o início do seu funcionamento.	71
Figura 18 - Diversidade de morfológica encontrada nas lâminas com coloração de Gram (objetiva de 1000x).	72
Figura 19 - Imagem de algumas das diferentes colônias de bactérias fermentadoras encontradas.	73
Figura 20 - Imagem de duas das colônias escolhidas para realização da coloração de Gram e suas respectivas morfologias.	74
Figura 21 - Morfologia das colônias observadas na caracterização das leveduras para o grupo dos EM's inseridos no Reator.	75
Figura 22 - Imagem de algumas das diferentes colônias de leveduras em meio YPD...	76
Figura 23 - Imagem de 3 das 6 colônias escolhidas para realização da coloração com azul de metileno das colônias de leveduras em meio YPD.	77
Figura 24 - Colônias de actinomicetos predominantes nas placas inoculadas com EM's provenientes da amostra que foi inoculado no RBS1.	78
Figura 25 - Algumas das colônias de actinomicetos observadas.	79
Figura 26 - Imagem de algumas das colônias de bactérias heterotróficas em meio PCA.	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 BIOFILMES	16
3.1.1 Formação dos Biofilmes	19
3.1.2 Fatores que afetam a formação de um biofilme	22
3.1.3 Uso de biomassa imobilizada (biofilme) em reatores	24
3.1.4 Uso de espuma de poliuretano como material suporte	27
3.2 REATORES EM BATELADA SEQUENCIAL (RBS)	29
3.3 MICRO-ORGANISMOS EFICIENTES (EM's)	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE TRATAMENTO UTILIZADO – RBS AERÓBIO	35
4.1.1 Fases operacionais do Reator.....	38
4.1.2 Coleta dos EM's e quantificação inicial para inserção nos reatores	39
4.1.2.1 Caracterização quantitativa dos EM's e do esgoto sanitário utilizado	40
4.2 ANÁLISES DOS PARÂMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS	41
4.2.1 Sólidos aderidos à espuma	42
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	43
4.3.1 Análise quantitativa dos micro-organismos presentes nas espumas de poliuretano	44
4.3.2 Caracterização da diversidade dos micro-organismos aderidos e presentes no efluente	45
4.3.3 Caracterização macroscópica das colônias de EM's e das bactérias heterotróficas	46
4.3.4 Prova da Catalase	46

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DOS EM'S E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS INSERIDO NO RBS1, PRESENTES NO ESGOTO SANITÁRIO E EM CADA BATELADA	48
5.2 PARÂMETROS FÍSICO –QUÍMICOS	49
5.2.1 Esgoto sanitário bruto e na saída dos reatores	49
5.2.2 Sólidos totais aderidos na espuma.....	54
5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	56
5.3.1 Quantificação dos EM's aderidos ao meio suporte (Leveduras, Actinomicetos e Bactérias fermentadoras de lactose) e bactérias heterotróficas.....	56
5.3.2 Microscopia: Análise dos organismos presentes no material suporte e nas lâminas de vidro	65
5.3.2.1 Exame a fresco	65
5.3.2.2 Coloração de Gram	71
5.3.3 Caracterização dos EM's e bactérias heterotróficas: Análises das características macroscópicas (culturais) e microscópicas (morfológicas)	72
5.3.3.1 Bactérias Fermentadoras de lactose	72
5.3.3.2 Leveduras.....	74
5.3.3.3 Actinomicetos	77
5.3.3.4 Bactérias heterotróficas.....	79
6 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A poluição de corpos hídricos superficiais é um dos grandes problemas ambientais em todo o mundo, causando efeitos negativos para a saúde ambiental e prejudicando a manutenção das condições básicas de qualidade d'água para seus diversos usos. Dentre as fontes de poluição das águas superficiais, os esgotos sanitários e industriais são os principais responsáveis pela degradação da qualidade dos cursos d'água (LEITE, 2004, p. 01).

O lançamento de efluentes sem tratamento nos recursos hídricos resulta, além de vários problemas socioambientais, em impactos significativos sobre a vida aquática e o meio ambiente como um todo (PIMENTA et al., 2002, p. 02).

Um dos motivos encontrados para o despejo destes efluentes sem tratamento prévio nos corpos hídricos deve-se ao fato das técnicas tradicionais para tratamento de esgoto serem muitas vezes de alto custo, tanto de implantação como manutenção. Desse modo, métodos alternativos viáveis e mais econômicos que garantam semelhantes desempenhos do sistema e características do efluente tratado são de grande interesse para o setor público e privado (ARAUJO; PASQUALETO, 2005, p. 01).

Buscando soluções alternativas para este tipo de caso, tem-se desenvolvido novas tecnologias seguindo o princípio da sustentabilidade. Alguns destes mecanismos são: a utilização dos EM's e utilização de biomassa imobilizada – biofilmes.

Inicialmente o uso da tecnologia EM foi desenvolvida como uma alternativa para fertilizantes sintéticos e pesticidas (HIGA; WOOD, 2013, p. 03), porém nos últimos tempos a utilização do mesmo vem sendo estendida para tratamentos de águas, efluentes e controle de maus odores, obtendo com tal uso vantagens como o aumento da porcentagem da remoção de matéria orgânica presente no efluente.

Quanto ao uso dos biofilmes algumas vantagens da sua utilização são conhecidas. Segundo O'Reilly; Rodgers e Zhan (2008, p. 1861) os sistemas de tratamento de efluentes baseados em biofilmes obtém mais vantagens em relação aos sistemas tradicionais, como: baixo requerimento de energia, operação simples e

com menor manutenção; unidades compactas devido ao uso da alta área superficial do biofilme; taxa volumétrica de carregamento maiores, entre outros.

Visto os benefícios trazidos pelo uso do biofilme no tratamento de efluentes e os benefícios constatados pelo uso dos EM's, surgiu como proposta a união dos dois sistemas num mesmo processo de tratamento, com o objetivo de avaliar qual a influência do uso deste grupo de organismos na formação do biofilme, pois os dois apresentam-se como alternativas viáveis ao sistema de tratamento biológico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a formação de biofilme em espuma de poliuretano em Reatores em Bateladas Sequenciais Aerados (RBS's) com e sem a adição de EM's operado com esgoto sanitário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os resultados das análises microbiológicas com os parâmetros físico-químicos e as condições de operação do sistema.
- Quantificar a biomassa aderida (EM's e bactérias heterotróficas) ao meio suporte – espuma de poliuretano, submetido ao tratamento com e sem inserção de EM's;
- Observar se existe diferença entre a diversidade dos organismos, presentes tanto na espuma de poliuretano de ambos os reatores – Reator em Batelada Sequencial aerado 1 (RBS1) e – Reator em Batelada Sequencial aerado 2 (RBS2), quanto aderido em lâminas de vidro em contato com o lodo.
- Utilizar os organismos (protozoários, rotíferos e bactérias) observados nas lâminas de vidro como indicativo da eficiência do tratamento.
- Analisar a diversidade morfológica dos EMs e bactérias heterotróficas presentes na solução de EMs utilizada para alimentar o RBS1, no esgoto sanitário e no material suporte presente nos dois reatores (espuma de poliuretano).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOFILMES

Difícilmente na natureza os micro-organismos vivem em colônias isoladas, sendo que muitos destes vivem em comunidades microbianas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999, p. 01; DREESZEN, 2003, p. 02; VU et al., 2009, p. 2536) na forma de agregados, limosos, denominados como biofilmes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, p. 774).

Os biofilmes são estruturas ou sistemas biológicos extremamente organizados, formados naturalmente em superfícies sólidas abióticas ou bióticas (RAMOS, 2008, p. 13; BOARI et al., 2009, p. 886) em contato com fluídos não esterilizados sendo definidos como comunidades de micro-organismos imóveis, conjuntos em uma matriz de substâncias poliméricas (“Extracellular Polymeric Substances” - EPS) de origem microbiana (SPÍNOLA, 2009, p. 23; PEREIRA, 2001, p. 33; XAVIER et al., 2005, p. 01).

Os biofilmes também são conhecidos como “filmes microbianos”, “depósito biológicos”, “películas microbianas” ou “limo”, constituídos tipicamente por: água, micro-organismos, EPS, partículas retidas e substâncias adsorvidas (PEREIRA, 2001, p. 10; SPÍNOLA, 2009, p.05).

Segundo Dorlan (2002, p. 881) podem ser entendidos também como um conjunto de células microbianas irreversivelmente associadas (não removidos por lavagem suave) a uma superfície e colocados em uma estrutura de EPS.

A composição de cada biofilme pode variar dependendo dos organismos presentes, de sua situação fisiológica, da natureza do ambiente de crescimento, do tipo de material suporte e das condições físicas prevalentes (MISSAGIA, 2010, p. 36; DORLAN, 2002, p. 882).

Constitui-se por uma grande porção de água, possuindo cerca de 80 a 95% desta em sua estrutura, visto como um meio muito adsorvente e poroso, com os micro-organismos representando apenas uma parte da massa do biofilme que, frequentemente, é menor que 10% (MACHADO, 2005, p. 05, CHAVES, 2004, p. 25).

A estrutura interna dos biofilmes é caracterizada por uma elevada heterogeneidade, onde as células encontram-se reunidas em aglomerados contendo a rede de polímeros por elas excretados, e entre estes aglomerados (“*clusters*”) há canais e poros com o líquido onde a película está imersa (MACHADO, 2005, p. 06; MELO, 2005, p. 77; MELO, 2003, p. 339).

Estes aglomerados heterogêneos e estáveis possuem diferentes tipos celulares (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999, p. 1338; MADIGAN et al., 2010, p. 678, KOKARE et al., 2005, p. 159; RAMOS, 2008, p. 13, DORLAN, 2002, p. 881) como bactérias, protozoários, fungos, algas, entre outros (OLIVEIRA, 2012, p. 23; VU et al., 2009, p. 2536; COHN, HAYES e RENAULT, 2010, p. 22) e destes, frequentemente são as bactérias o grupo predominante (MACHADO, 2005, p. 6; RAMOS, 2008, p. 13).

O desenvolvimento destes diferentes organismos conduz ao surgimento de micro consórcios, ou seja, estruturas ordenadas, sendo que a forma com que estes encontram-se dispostos nestes aglomerados permite a formação de gradientes de nutrientes, gases, aceptores de elétrons, subprodutos metabólicos e pH (MISSAGIA, 2010, p. 36; MELO, 2003, p. 337).

Quanto à espessura destes biofilmes, segundo Chaves (2004, p. 26) a mesma também varia com as condições do meio, composição química e hidrodinâmica, podendo encontrar-se biofilmes com películas muito finas de 5 a 10 μm (DREESZEN, 2003, p. 09), em sistemas de águas purificadas, até biofilmes com espessuras de 5 a 10 mm, como nos circuitos de “águas brancas” da indústria de papel e de pasta de papel.

Mains (2008, p. 01) e Dreeszen (2003, p. 09) trazem que a espessura dos biofilmes podem variar de 50 a 100 micros e que à medida que a espessura do biofilme vai aumentando pedaços do mesmo podem ser desprendidos, permitindo a colonização de secções a jusante do sistema.

A estrutura dos biofilmes variam, mas certas características estruturais são comuns entre todos, pois todos são compostos de micro colônias de células embebidas numa matriz de EPS, sendo que os canais hidrodinâmicos que separam estas micro colônias, proporcionam meios de comunicação entre as células bacterianas e permitir a difusão de nutrientes, oxigênio e detritos (COHN; HAYES; RENAULT, 2010, p.22).

Os EPS são os principais componentes da matriz do biofilme, sendo uma mistura complexa de biopolímeros (KOKARE et al., 2009, p. 159), que compreende cerca de 50% a 90% do carbono orgânico total deste, sendo seu principal componente os polissacarídeos (COHN; HAYES; RENAULT, 2010, p.23; KOKARE et al., 2009, p. 159).

O EPS é formado também por proteínas, ácidos nucleicos, (MADIGAN et al., 2010, p. 678), lipídios e substâncias húmicas, compondo o espaço intercelular de agregados microbianos e formando a estrutura e arquitetura da matriz do biofilme (VU et al., 2009, p.2535).

A matriz do EPS confere não somente estrutura ao biofilme, como também facilita o arranjo espacial das diferentes espécies que o compõem (LUCCHESI, 2012, p. 27).

Segundo Simões (1995, p. 16) uma das características frequentemente atribuídas ao EPS é a de proteção dos organismos aderidos ao biofilme contra as condições adversas do meio. Sendo assim fica fácil entender muitos dos benefícios atribuídos aos organismos aderidos a este.

Dentre estes benefícios podemos destacar alguns como:

- Abrigo dos fatores ambientais agressivos, como variações de pH, concentração de sais, desidratação, substâncias químicas agressivas, agentes bactericidas, predadores e antibióticos (MACHADO, 2005, p. 14; KOKARE et al., 2009, p. 160; DREESZEN, 2003. p. 08; SIMÕES, 1995, p. 17; MAH; O'TOOLE, 2001, p. 34; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, p. 774; MADIGAN et al., 2010, p. 678; CHAVES, 2004, p.06);
- Disponibilidade de nutrientes, permitindo que os micro-organismos fiquem situados em superfícies ricas destes (KOKARE et al., 2009, p. 160; DREESZEN, 2003. p. 07; CHAVES, 2004, p.06). Além da vantagem de que a matriz polimérica favorece a adsorção de nutrientes (MACHADO, 2005, p. 14);
- Possibilidade de troca de material genético devido ao longo tempo de agregação dos organismos (MACHADO, 2005, p. 14; MADIGAN et al., 2010, p. 680; KOKARE et al., 2009, p. 160; CHAVES, 2004, p.06);
- Simplicidade para o desenvolvimento de micro consórcios que oportunizam as relações de simbiose assim como a utilização de substratos de difícil degradação (MACHADO, 2005, p. 14; SIMÕES, 1995, p. 17).

A adesão microbiana acaba então sendo vista como um fenômeno que ocorre naturalmente, consistindo em uma estratégia desenvolvida pelos micro-organismos para proteção contra fatores ambientais hostis (LUCCHESI, 2012, p. 32; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999, p. 1318). Porém como tudo no meio ambiente os micro-organismos encontram algumas desvantagens no desenvolvimento em biofilmes que segundo Machado (2005, p. 14) são os seguintes:

- Formação de resistências adicionais ao transporte de substâncias e metabólitos resultantes da atividade celular;
- Desvio do substrato para a produção dos EPS em detrimento a produção de células.

Esses prejuízos podem acarretar numa redução da taxa específica de crescimento dos micro-organismos inseridos no biofilme, relativamente à dos mesmos em suspensão.

3.1.1 Formação dos Biofilmes

Os biofilmes podem se formar em diferentes superfícies como plásticos, metais, vidro, partículas sólidas, madeira entre outros materiais (KOKARE et al., 2009, p. 159), sendo um processo natural, resultado de um balanço entre processos físicos, químicos e biológicos (PEREIRA, 2001, p. 13; MACHADO, 2005, p. 09; XAVIER et al., 2005, p. 03).

O processo de formação de um biofilme ocorre segundo Madigan et al. (2010, p. 678) com a adesão reversível de uma célula a uma superfície, sendo este um sinal para o início da formação da matriz do biofilme.

Após a adesão das células livres (bactérias pioneiras) (Figura 1) reversivelmente do meio líquido para a superfície sólida - sendo este um evento aleatório influenciado pela energia livre de superfície e proximidade das células bacterianas (1) -, ocorre então o processo de adesão irreversível destas mesmas células, com posterior crescimento celular e produção de polissacarídeos, resultando

na colonização da superfície (2) o que proporciona uma maior adesão celular e acumulação.

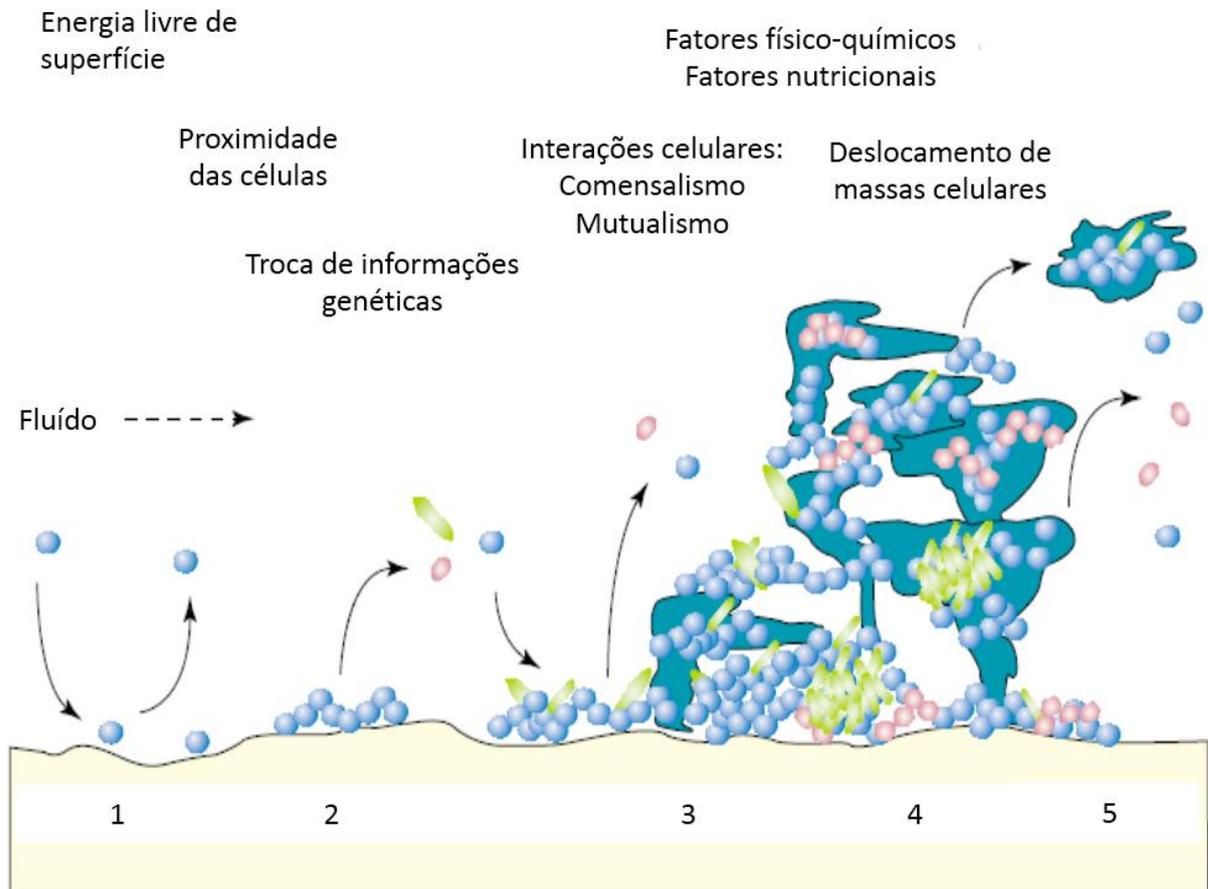


Figura 1 - Processo de formação de um biofilme.

Fonte: Adaptado de JENKINSON; LAPPIN-SCOTT (2001, p. 10).

Legenda:

- 1. Adesão dos micro-organismos;**
- 2. Colonização;**
- 3. Acumulação**
- 4. Comunidade Clímax formada;**
- 5. Processo de dispersão.**

Após este desenvolvimento ocorre a fixação de células bacterianas flutuantes e outras partículas (colonizadores secundários) contribuindo para a acumulação do biofilme, resultando em um 'filme' sobre a qual uma comunidade clímax é gerada (3-4).

No processo final de formação do biofilme o mesmo acaba sendo visto como uma entidade dinâmica onde as células continuamente entram ou saem da comunidade, promovendo a diversificação ou dispersão, servindo de alimento para protozoários.

Por fim acontece o desprendimento de células para o meio, num processo de erosão superficial ou destacamento de agregados maiores o que acaba proporcionando a remodelação da sua estrutura (5) (XAVIER et al., 2005, p. 03; MADIGAN 2010, p. 158; MACHADO, 2005, p. 09; OLIVEIRA, 2012, p. 24; SIMOES, 1995, p. 10; DREESZEN, 2003, p. 05; JENKINSON; LAPPIN-SCOTT, 2001, p. 10).

Após a fixação inicial de células microbianas, o resultado dos processos seguintes (crescimento e divisão celular, fixação de células flutuantes e liberação de material celular agregado) vem a definir tanto a estrutura como a atividade do biofilme. Estes processos incluem todos os fatores físicos envolvidos no desenvolvimento de biofilmes e alguns fatores biológicos, tais como crescimento e divisão celular e produção e excreção de EPS.

Porém, além destes fatores existe um conjunto de fatores biológicos mais complexos como o processo de comunicação célula-célula ou "*quorum sensing*". Segundo Madigan et al. (2010, p. 158) e Tortora; Funke e Case (2005, p. 774) no processo de formação do biofilme a comunicação intercelular é um fenômeno considerado fundamental para o desenvolvimento e a manutenção deste, pois permite que as bactérias coordenem suas atividades e agrupem-se formando comunidades.

Sintetizando a formação do biofilme acontece em três fases: transporte das células, adesão e desprendimento de organismos.

O processo de transporte das bactérias até a superfície, conhecido como inicial para a formação do biofilme, pode acontecer de diversas formas: por difusão, convecção ou locomoção natural dos micro-organismos, através dos flagelos (RAMOS, 2008, p. 03).

Já a fase que compreende a adesão dos micro-organismos a meios abióticos pode ocorrer em decorrência de interações inespecíficas, como por exemplo, as hidrofóbicas, e a adesão a meios bióticos ocorrem devido a mecanismos moleculares específicos (RAMOS, 2008, p. 04).

Após a adesão primária dos organismos as células que encontram-se estabilizadas produzem EPS, que acabam interagindo com os materiais da superfície, aumentando a complexidade do mesmo (RAMOS, 2008, p. 04).

Por fim ocorre então o desprendimento dos organismos, proporcionando a diminuição de células presentes neste. Este processo pode ocorrer por erosão ou

abrasão, sendo estes conhecidos como processos contínuos ao desenvolvimento do biofilme e “*sloughing off*”, como um evento esporádico, sendo outro acontecimento que contribui para a diminuição no número de células agregadas as biofilme (MELO, 2003, p. 340).

Nos estágios iniciais de formação do biofilme a ligação das células bacterianas a superfície estimula os genes responsáveis pela produção de EPS da superfície celular, sendo que à medida que são sintetizados facilitam a adesão de novas células (MADIGAN et al., 2010, p. 158).

3.1.2 Fatores que afetam a formação de um biofilme

Inúmeros fatores podem vir a afetar o desenvolvimento de um biofilme, entre eles podemos citar (PEREIRA, 2001, p. 18; FUJII, 2011, p. 33):

- pH, temperatura, força iônica do meio, velocidade de escoamento do fluído, quantidade e concentração de nutrientes do meio líquido ao qual o biofilme está inserido, características dos micro-organismos, material de aderência e rugosidade de sua superfície, presença de material particulado, presença de micronutrientes como: magnésio, potássio, cálcio, sódio entre outros e presença de agentes antimicrobianos.

Estes fatores podem ser divididos em biológicos, físicos e químicos e entre estes neste trabalho vamos dar ênfase a alguns mais citados na literatura.

1. Fatores Biológicos de composição do fluído

Espécie e fisiologia microbiana: alguns micro-organismos produzem maior quantidade de polímeros extracelulares, facilitando a sua aderência a superfícies sólidas. Além da possível compatibilidade hidrofílica ou hidrofóbica de alguns microrganismo com a superfície sólida (ALMEIDA, 2010, p. 08; MACHADO, 2005, p. 12). Outra característica que pode favorecer o processo de aderência dos micro-organismos as superfícies é a presença de pelos e fímbrias, que podem ser responsáveis pela capacidade adesiva das bactérias a outras bactérias entre outros organismos ou partículas presentes no meio (CHAVES, 2004, p. 31).

2. Fatores Físicos de composição do fluído

Características do material de adesão como porosidade e rugosidade da superfície sólida: estudos efetuados permitiram concluir que a rugosidade e porosidade do suporte condicionam a adesão celular (MACHADO, 2005, p. 12; RAMOS, 2008, p. 07).

A rugosidade atua na formação primária do biofilme por dificultar o arraste de partículas e micro-organismos (ALMEIDA, 2010, p. 08). Segundo Simões (1995, p. 11) normalmente a ligação entre os micro-organismos e a superfície ocorrerá mais facilmente em superfícies que são mais áspera e mais hidrofóbicas.

A presença de poros pode aumentar a adesão celular, pois estes protegem as células da turbulência do fluido (LUCCHESI, 2012, p.34).

Condições hidrodinâmicas (velocidades e turbulências): a velocidade do fluido e sua turbulência em contato com a superfície sólida interfere nos processos de adesão, transporte de nutrientes e do desprendimento dos micro-organismos da superfície (PEREIRA, 2001, p. 19).

As velocidades elevadas acabam retardando 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, gerando biofilmes mais lisos, menos espessos, compactos e com maior porosidade. Quando ocorre a presença de velocidades baixas, sob elevadas concentrações de substrato, o biofilme torna-se espesso induzindo ao aparecimento de zonas inativas pela dificuldade de transferência de massa. Tal fato favorece o destacamento de parte destes (ALMEIDA, 2007, p. 09).

3. Fatores Químicos de composição do fluido

pH: os micro-organismos possuem limites de sobrevivência e valores de pH ótimos de crescimento, podendo controlar o desenvolvimento de espécies predominantes como fungos e bactérias (ALMEIDA, 2007, p. 09)

O pH do fluido altera também a ação eletrostática entre os micro-organismos e a superfície de contato, podendo aumentar ou diminuir a repulsão eletrostática entre as duas entidades e, deste modo, interferir com o processo de adesão dos micro-organismos às superfícies. (ALMEIDA, 2007, p. 09, CHAVES, 2004, p. 12; PEREIRA, 2001, p. 18; LUCCHESI, 2012, p. 34).

A maioria dos biofilmes naturais crescem em valores de pH próximos da neutralidade (PEREIRA, 2001, p. 18).

Temperatura do fluido em contato com o biofilme: a temperatura é um dos parâmetros chave no desenvolvimento celular e conseqüentemente na formação, constituição e evolução do biofilme. Quando o meio de desenvolvimento dos micro-organismos atinge valores elevados de temperatura, pode ocorrer a desnaturação das proteínas constituintes das células se estes organismos não possuírem características metabólicas para suportar tal fator, o que acaba levando a uma rápida redução da taxa de crescimento celular. Por outro lado, com a diminuição da temperatura pode propiciar um retardamento da taxa de crescimento dos micro-organismos, até um dado valor a partir do qual para completamente (RAMOS, 2008, p. 06).

Assim a temperatura altera a atividade metabólica dos micro-organismos, influenciando no seu tempo de crescimento (ALMEIDA, 2007, p. 09).

Constituintes presentes no fluido: a concentração do substrato pode influenciar na estrutura do biofilme, sendo que maiores concentrações de matéria orgânica tendem a elevar sua espessura (ALMEIDA, 2007, p. 09).

Outros fatores podem vir a interferir na formação do biofilme, dentre estes destacam-se que os eventos de perda de biofilme causados por erosão, abrasão e destacamento completo de parte da matriz gelatinosa formada. No entanto, em biofilmes contendo consórcios de bactérias nitrificantes e desnitrificantes os gases resultantes da redução do nitrato a nitrogênio gasoso podem promover a desagregação de parte da estrutura da biomassa em função dos gases gerados no interior (MELO, 2003, p. 340).

3.1.3 Uso de biomassa imobilizada (biofilme) em reatores

Os reatores que possuem suporte físico facilitam a imobilização e formação dos biofilmes responsáveis pela degradação de compostos orgânicos e inorgânicos presente nos efluentes.

A principal característica atribuída a este é aumentar a concentração de micro-organismos e conseqüentemente possibilitar um maior contato entre os constituintes presentes no efluente e os micro-organismos no reator, alcançando

uma maior capacidade de tratamento, devido ao aumento da velocidade global de conversão de substrato (OLIVEIRA, 2012, p.22).

As condições hidrodinâmicas, o fornecimento de nutrientes e a estrutura do biofilme tem um papel fundamental no resultado do tratamento do efluente. Em um biofilme, independentemente de seu meio suporte, em camadas mais externas ocorre à oxidação aeróbia (onde existe a maior concentração de oxigênio), formando-se gás carbônico (CO_2) como subproduto, que acaba permanecendo em solução e desprendendo-se para a atmosfera, e em condições anóxicas, permite o processo de redução de nitratos. Já na camada mais profunda, conhecida como anaeróbia, ocorre à formação de ácidos orgânicos tais como ácido nítrico (HNO_3) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) (VON SPERLING, 1996, p. 32).

Esta característica de promover regiões aeróbias/anóxicas/anaeróbias é benéfica em relação à formação de biofilmes no que tange ao tratamento de efluentes ricos em matéria orgânica (OLIVEIRA, 2010, p.09; FUJII, 2011, p. 32).

As transformações e síntese de materiais acontecem internamente ao biofilme. O transporte de substratos ocorre por meio de processos de difusão, primariamente através do filme líquido na interface líquido/biofilme e posteriormente através do próprio biofilme (Figura 2) (AGRA, 2009, p. 27). Os produtos das reações de oxirredução são transportados no sentido inverso, ao exterior do biofilme. Tanto o substrato doador quanto o receptor de elétrons devem adentrar ao biofilme para que a reação bioquímica aconteça (GONÇALVES et al., 2013, p. 03).

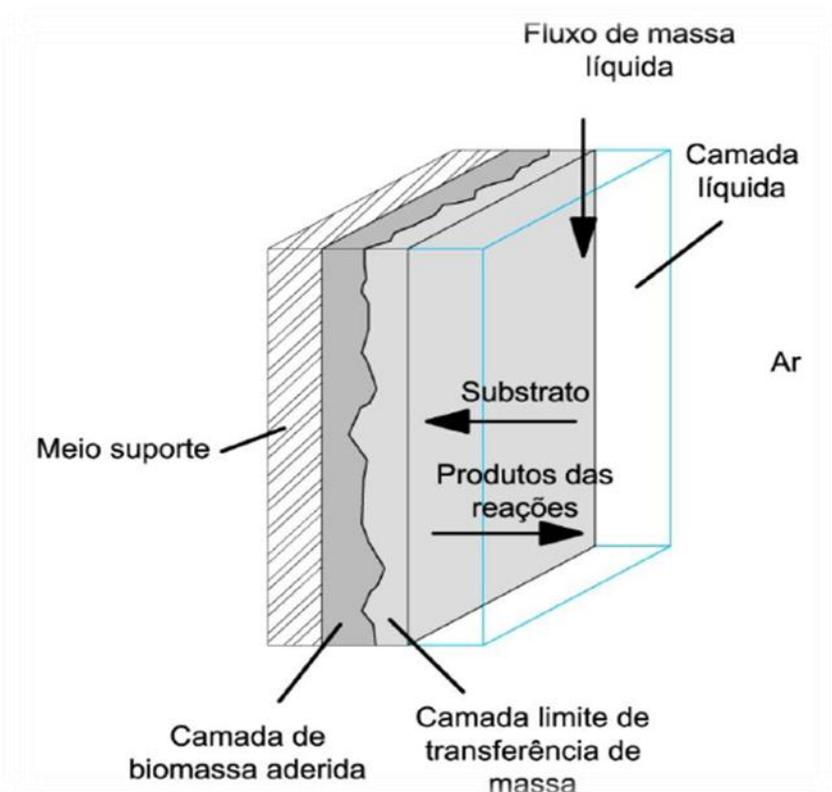


Figura 2 - Transformação e síntese dos materiais em um biofilme.
 Fonte: FUJII (2011, p. 34).

Muitos trabalhos na literatura utilizam biomassa imobilizada ao invés da suspensão. Silva (2005) avaliou o processo de redução de sulfato de águas residuárias sintéticas com diferentes relações de Demanda Bioquímica de Oxigênio/íon sulfato (DBO/SO_4^{2-}) em reatores anaeróbicos contendo biomassa imobilizada em suportes inertes, operados em bateladas sequenciais (ASBBR) como um dos seus principais objetivos.

Sarti; Sakamoto e Varesche (2006, p. 81) avaliando o desempenho de dois reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais ($1,2\text{ m}^3$) diferenciados pelo tipo de imobilização de biomassa, na forma de suporte inerte e de biomassa granular no tratamento de esgoto sanitário do Campus da Universidade de São Paulo –USP, de São Carlos, demonstrou que os reatores apresentaram em reduzido tempo de operação (10 a 20 dias) valores de eficiência média de remoção de matéria orgânica superior a 60% nos valores de Demanda Química de Oxigênio (DQO)_{Bruta} no efluente.

Os autores relacionaram este fato, provavelmente, com a remoção física de sólidos na espuma de poliuretano no caso do reator que continha esta, enquanto

que, para o reator que continha carvão, aliou-se ao fato do mesmo ter sido inoculado com lodo granular anaeróbio.

Provavelmente estes autores utilizaram biomassa aderida devido as vantagens obtidas pelo uso da mesma. Von Sperling (1996, p. 34) e Melo (1996, p. 1682), trazem algumas destas vantagens em relação a utilização do biofilme em sistemas de tratamento, como a diminuição do tempo de detenção hidráulica do reator em comparação com um reator operado com biomassa suspensa; a questão da biomassa ativa, onde a mesma pode-se apresentar em valores superiores em relação a outros sistemas; a alta concentração celular e conseqüentemente alta taxa de remoção volumétrica além da boa estabilidade na operação do sistema.

Fujii (2011, p. 105) trabalhando com dois reatores, um com biomassa imobilizada e outro com biomassa suspensa constatou que o primeiro alcançou um desempenho maior em termos de eficiência e estabilidade operacional.

Esses sistemas de tratamento são muito mais eficientes, pois proporcionam micro-habitat que facilitam o desenvolvimento de organismos mais sensíveis, além de que os micro-organismos são constantemente reutilizados (VON SPERLING, 1996, p. 35).

3.1.4 Uso de espuma de poliuretano como material suporte

As superfícies porosas como as espumas de poliuretano, são mais propícias do que outras a formação de biofilmes, devido ao seu número de poros e o tamanho destes. Segundo Alves et al. (1999, p. 215) estas são características que influenciam na retenção celular na superfície do material.

Picanço et al. (2001a, p. 06), trabalhando com materiais porosos (espuma e cerâmica porosa) e não porosas (PVC e tijolo refratário), constatou que os primeiros retiveram maior quantidade de biomassa que os não porosos.

Silva (2005, p. 149) avaliando a adesão microbiana em quatro diferentes suportes inertes: espuma de poliuretano, carvão vegetal, cerâmica e poliuretano de baixa densidade reciclado, com o intuito de selecionar entre estes dois meios suportes com a maior capacidade para retenção de bactérias redutoras de sulfato,

para posterior estudos no processo de biossulfatação, concluiu que o suporte de espuma de poliuretano e o carvão mineral apresentaram a maior adesão específica da biomassa o que acaba por sua vez favorecendo o tratamento biológico.

Garcia (2005, p. 61) testando três meios suportes diferentes: espuma de poliuretano, carvão vegetal e polietileno de baixa densidade, em reator anaeróbico operando em bateladas sequenciais, aplicando o tratamento com esgoto sanitário, apresentou com base em suas análises de desempenho, cinética e avaliação microbiológica que o melhor desempenho global foi obtido com o uso da espuma de poliuretano como meio suporte. Concluindo que este tipo de material possui características adequadas a adesão e crescimento de biomassa anaeróbica.

Picanço et al. (2001b, p. 197), estudando sobre a influência da porosidade de diferentes matérias sobre a adesão de biomassa anaeróbica, utilizou quatro diferentes matrizes inertes: espuma de poliuretano, PVC, tijolo refratário e cerâmicas especiais. O desenvolvimento de biofilme foi realizado num reator anaeróbico de leito fixo que contém todos os materiais de suporte e alimentado com um efluente sintético contendo proteínas, lipídios e hidratos de carbono.

Os dados obtidos a partir da análise microscópica e ensaios cinéticos indicaram que o material de porosidade tem uma importância crucial para a manutenção da biomassa anaeróbica. As partículas de espuma de poliuretano e as cerâmicas especiais foram os meios suportes que apresentam as melhores propriedades de retenção.

Picanço et al. (2001b, p. 197) ainda trazem que a grande área de superfície específica, diretamente relacionada com a porosidade do material, é fundamental para proporcionar uma grande quantidade de biomassa fixa.

Fynn e Whitmore (1984, p. 85) averiguando a colonização de culturas enriquecidas com arqueas metanogênicas em espuma de poliuretano diversificando a porosidade destas, em um reator de mistura alimentado com formiato de sódio, como única fonte de carbono, constataram que a colonização da espuma é diretamente proporcional ao número de poros presentes nestas.

Varesche et al.¹ (1997 apud MIQUELETO, 2003, p.10) traz que os micro-organismos fixam-se com firmeza as matrizes de poliuretano, e que este fator ocorre

¹VARESCHE, M.B. ZAIAT, M., VIEIRA, L. G. T., VAZOLLER, R.F., FARESTI, E. Microbial Colonization of polyurethane Foam Matrices in horizontal – flow Anaerobic Imobilized-sludge Reactor. Appl. **Microbiol. Biotechnol**, p. 534-536. 1997.

provavelmente devido a formação de algum tipo de ligação, sendo estas possivelmente relacionadas com forças de dupla camada eletrônica entre as células e o suporte inerte, forças de van der Waals e ligações químicas. Demonstrando que o biofilme fica agregado nos poros da espuma de poliuretano de forma mecânica ou física.

3.2 REATORES EM BATELADA SEQUENCIAL (RBS)

O reator em batelada sequencial (RBS) pode ser entendido como um reator operado em etapas sequenciais, sendo que seu processo e operação são realizados em um tanque único, com reações Sequenciais no tempo e não unidades separadas como ocorrem nos reatores contínuos.

Os RBS's são operados em regime de ciclos, sendo cada um composto por quatro fases distintas (IAMAMOTO, 2006, p. 15; ZENATTI, 2007, p. 35):

1. Enchimento: Nesta etapa ocorre a adição da água residuária a ser tratada no reator. Frequentemente o volume a ser colocado neste é o mesmo a ser descartado na etapa final. Este enchimento pode ser estático, com mistura ou reação.
2. Reação: Na reação o objetivo principal é complementar as reações iniciais durante o enchimento, sendo que neste processo pode haver mistura, aeração ou ambas. O tempo destinado a reação vai depender das características físico-químicas do afluente.
3. Sedimentação: Nesta fase ocorre a separação sólido-líquido, onde a mistura e aeração são interrompidas para permitir a clarificação do líquido.
4. Esvaziamento: Ponto que ocorre o descarte do lodo presente no reator.

A Figura 03 ilustra as fases de operação do RBS (Figura 3).

IMAGEM					
FASE DO CICLO	ENCHIMENTO	REAÇÃO	SEDIMENTAÇÃO	DESCARTE	REPOUSO
OBJETIVO DA FASE	INTRODUÇÃO DO SUBSTRATO	BIODEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO	CLARIFICAÇÃO DO EFLUENTE TRATADO	DESCARTE DO EFLUENTE TRATADO	RESERVA DE TEMPO A TRANSFERIR PARA OUTRA FASE, SE NECESSÁRIO

Figura 3 - Fases de operação de um reator em batelada sequencial.

Fonte: Adaptado de SANTOS; FILHO; GIORDANO (2006, p. 154).

Os RBS's tem se mostrado uma alternativa eficiente para tratamento de efluentes com cargas orgânicas variadas e descontínuas (SOUZA et al., 2010, p. 09). Daniel (2005, p. 94) trabalhando com um reator de leito fixo, preenchido com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano, operado em bateladas sequenciais, alimentado com substrato sintético com concentração de nitrogênio amoniacal, constatou ser possível obter um processo estável de remoção de nitrogênio neste tipo de reator, submetido a etapas de aeração e não aeração em um mesmo ciclo. Esse modo de operação permitiu o estabelecimento do processo de nitrificação parcial a nitrito nas etapas aeradas e desnitrificação nas etapas anóxicas.

Cybis; Santos e Gehling (2004, p 264) com o objetivo de avaliar a eficiência e a estabilidade do RBS na remoção de nitrogênio no tratamento de esgoto sanitário com baixa DQO, utilizou em seu experimento um reator com volume de trabalho de 600 L e tratou 1200 L/d de esgoto bruto em três bateladas de oito horas. Após o período de análise os referidos autores chegaram à conclusão de que é possível utilizar RBS para o tratamento de esgoto sanitário com matéria orgânica reduzida sem comprometer a qualidade do efluente, a remoção de nitrogênio e a estabilidade operacional do sistema.

Antoniolli e Monteggia (1997, p. 775) em sua pesquisa trabalhando com o uso de RBS, no tratamento de efluente líquido de indústria de beneficiamento de tripas, comparativamente ao sistema de Lagoa Aerada, empregado na referida atividade, avaliando os parâmetros biocinéticos do processo biológico operado em batelada, referentes à remoção de matéria orgânica, produção de biossólidos e consumo de oxigênio, os quais são ainda desconhecidos para o efluente em estudo,

observou que RBS foi eficiente para o tratamento biológico de rejeitos da água industrial. Sendo considerado simples e produzindo uma alta taxa de remoção de DBO e DQO no tratamento deste tipo de água.

Diferentes sistemas podem ser trabalhados com um reator operado em batelada sequencial, Lamego Neto e Costa (2011, p. 411), estudando o comportamento de um reator híbrido, operado em bateladas sequenciais, na remoção conjunta de matéria carbonácea, nitrogênio e fósforo de esgoto sanitário, contendo em seu interior um suporte fixo com rede de nylon, constatou que o reator funcionou como um sistema estável e apresentou boas condições de depuração. A remoção da matéria carbonácea mostrou-se elevada, com eficiências médias de 92% de DBO₅ e 80% de DQO. A remoção de nutrientes variou entre 59% e 71% para nitrogênio total e entre 45% e 67% para fósforo total.

Dos trabalhos acima é perceptível que os RBS são utilizados, principalmente com o uso acoplado a biomassa imobilizada, pois este recurso traz a estes benefícios ainda maiores.

3.3 MICRO-ORGANISMOS EFICIENTES (EM's)

O EM é uma combinação de vários organismos benéficos, que ocorrem naturalmente no ambiente. Estes micro-organismos eficazes secretam substâncias benéficas como vitaminas, ácidos orgânicos, minerais quelatados e antioxidantes quando em contato com matéria orgânica (IN-SITU..., 2003, p. 06), o que acaba acelerando o processo de degradação da mesma, e como em efluentes domésticos a quantidade de matéria orgânica a ser estabilizada é elevada, o uso deste grupo de organismos pode acabar acelerando o processo de estabilização.

A maioria dos organismos que compõem o grupo dos EM's são facultativos, o que permite estender seus benefícios a ambientes anaeróbios e aeróbios (HIGA, 2013, p. 02).

O grupo dos EM's utilizados normalmente contém espécies selecionadas de micro-organismos incluindo predominantemente as populações de bactérias lácticas e leveduras, e números menores de bactérias fotossintéticas, actinomicetos e outros

tipos de organismos. Todos estes são mutuamente compatíveis uns com os outros e podem coexistir em cultura líquida (HIGA e PARR, 1994, p. 04; IN-SITU..., 2003, p. 06).

Segundo Bonfim et. al. (2011, p. 11), o grupo dos EM's é composto de quatro grupos de micro-organismos: leveduras, actinomicetos, bactérias produtoras de ácido láctico e bactérias fotossintéticas.

Cada grupo possui uma característica peculiar em sua ação, como por exemplo: os actinomicetos podem controlar fungos e bactérias patogênicas no meio em que atuam, as bactérias produtoras de ácido láctico produzem ácido láctico que podem controlar alguns micro-organismos nocivos (patogênicos) e as bactérias fotossintéticas aumentam as populações de outros micro-organismos eficazes, como os fixadores de nitrogênio (Bonfim et al., 2011, p. 11).

No ambiente, os EM's têm sido utilizados para limpar águas poluídas de lagoas, lagos, barragens, e praias, incluindo na limpeza de derramamentos de petróleo; reciclagem de água de instalações de esgoto e na reciclagem de resíduos orgânicos (HIGA e WOOD, 2013, p. 03).

O uso dos EM's no tratamento de efluentes tem sido reportado como bem sucedido em diversos países, possibilitando resolver problemas como o custo elevado de um tratamento biológico, pois com a utilização destes micro-organismos em muitos casos pode-se proceder o reuso de um efluente tratado sem necessidade de tratamentos sofisticados.

Segundo Bonfim et al. (2011, p. 19) os EM's amenizam os impactos ambientais das indústrias porque atuam na decomposição dos resíduos e efluentes. Sendo que com a utilização destes é possível: controlar maus odores nas instalações; eliminar o mau cheiro dos resíduos, diminuir a produção de gases nocivos como Sulfeto de Hidrogênio (H_2S) e metano (CH_4).

No meio rural famílias agrícola utilizam os EM's no tratamento dos esgotos e nas fossas, para redução do mau cheiro (Bonfim et al., 2011, p. 19). Segundo Higa (2013, p. 02) assim como nos processos de fermentação conhecidos, os EM's aceleram a quebra de compostos como as proteínas, açúcares, gorduras e fibras, promovendo a rápida decomposição da matéria orgânica.

Ainda segundo Higa (2013, p. 02) estes organismos além de ajudarem no processo de degradação, ainda trabalham em duas vias primárias: por exclusão

competitiva de outros micro-organismos que são nocivos, e pela produção de subprodutos benéficos que promovem a saúde do meio ambiente como enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, hormônios e antioxidantes.

Dhamnaskar (2012, p.02) utilizando EM's para o tratamento de águas residuais de curtume, indicou diminuição observável nos valores de pH, sólidos totais, sólidos totais dissolvidos e em suspensão e cloretos, sendo que estes valores aproximaram-se aos toleráveis a norma ambiental, recomendando a técnica de inserção deste grupo de organismos para o tratamento de uma variedade de efluentes líquidos.

Szymanski e Patterson (2003, p.350,) no tratamento de águas residuais utilizando os EM's também observou redução nos mesmos parâmetros constatados por Dhamnaskar (2012, p.02), o que salienta a eficácia destes organismos no tratamento biológico.

Siripornadulsil e Labteephanao (2008, p. 34) investigando o potencial de EM para reduzir o teor de lipídios de efluentes ricos em detritos de alimentos, verificou que existe grande eficiência de remoção destes em um tratamento biológico em relação a um tratamento convencional.

Meireles e Bandeira (2013, p. 6), avaliaram durante um período de 6 meses, os efeitos da implantação de micro-organismos benéficos (EM•1® - Tecnologia EM™) em uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) mista Digestor Anaeróbio de Fluxo Ascendente (DAFA) e Lodo Ativado) com capacidade instalada de 21 L/s. Neste período foi adicionado ao sistema concentrações elevadas de EM's. Os dados obtidos neste período foram então comparados com os obtidos no mesmo período do ano anterior.

Os resultados demonstraram uma notável melhoria no desempenho, na eficiência e estabilidade da ETE com a redução dos maus odores do sistema, redução de 94,12% coliformes totais, alcançando nível de balneabilidade satisfatória, redução de DBO₅ em 50,08%, redução de Sólidos em Suspensão em 46,14% e Sólidos Sedimentáveis em 80%. Notavelmente, durante o período de avaliação, a ETE operou com uma vazão 26,71% superior a sua capacidade instalada.

Os resultados obtidos indicam que a Tecnologia EM™ não só melhorou expressivamente todo o sistema, como também propiciou a obtenção de um efluente final sem odores e com baixíssimos níveis de coliformes totais, o que definitivamente

compreende uma alternativa muito interessante para se obter eficiência, estabilidade e principalmente para objetivos de reuso do efluente tratado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises físico-químicas e microbiológicas deste trabalho foram realizadas nos laboratórios de Saneamento e Microbiologia respectivamente, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, *Campus Londrina*.

Para realização deste experimento foram utilizados dois Reatores em Bateladas Sequenciais aerados - RBS's, um com adição de EM's – RBS1 e outro sem – RBS2.

Estes reatores foram alimentados com esgoto sanitário bruto (coletado antes da grade), proveniente do Serviço Autônomo Municipal de Água e Esgoto (SAMAE), situada na cidade de Ibiporã – Paraná.

No decorrer do experimento foram realizadas 4 coletas de esgoto sanitário na SAMAE, com intervalos semanais (7 dias), sendo que após cada coleta foram realizadas análises para conhecimento das características de pH e Demanda Química de Oxigênio Total (DQO_T) do efluente, além de determinações qualitativas (Caracterização morfológica das colônias) e quantitativas (Determinação da UFC/mL) dos EM's e bactérias heterotróficas presentes naturalmente neste.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE TRATAMENTO UTILIZADO – RBS AERÓBIO

O experimento, em escala piloto, foi realizado utilizando 2 reatores cilíndricos idênticos de polipropileno (RBS1 e RBS2), com altura total de 64 cm, diâmetro 24,5 cm e volume útil de 10 litros, sendo que destes 50% foram ocupados pelo material suporte e 20% por lodo. Como o meio suporte utilizado era poroso, o volume útil a ser tratado de efluente em cada reator foi de 6,5 Litros.

Cada unidade experimental que formava o sistema foi composta por: material suporte para formação do biofilme (espuma de poliuretano), suporte para lâminas de vidro, um termostato (Marca H-606, sendo este responsável por manter a temperatura do esgoto constante a 25⁰C (±1⁰C), sistema de aeração (Bomba modelo

big Air A-420, com vazão de 4,5 L/min, sendo a distribuição do oxigênio realizada no fundo do reator por meio de quatro pedras porosas), uma bomba para o processo de alimentação e uma bomba para o processo de descarte de efluente (Marca: Robertshaw de 127 60Hz 34w).

Os reatores foram operados por sistema automatizado programado em um painel de controle e automação, com a função de controle do tempo de descarte e enchimento dos reatores além do período destinado a aeração.

A representação esquemática do reator e a foto destacando o sistema utilizado são mostrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

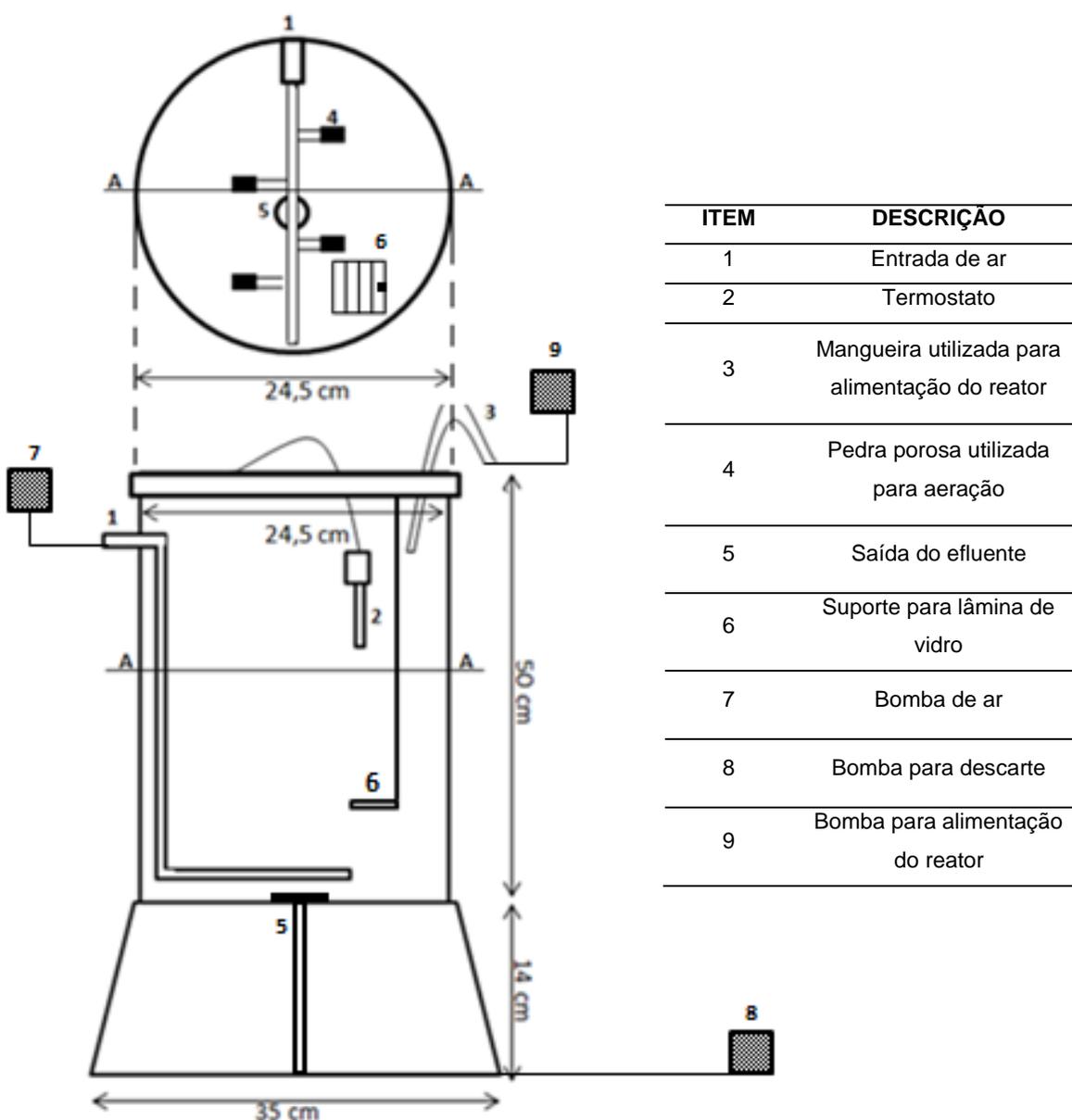


Figura 4 - Representação do sistema utilizado no experimento.

Fonte: Autoria própria.



Figura 5 - Sistema completo utilizado para realização dos experimentos.

Fonte: Autoria própria.

Legenda:

A: Painel de controle e automação;

B: Bombas de ar

C: RBS1

D: RBS2

E: Reservatório de Alimentação;

F: Reservatório de descarte.

O meio suporte utilizado era composto por espuma de poliuretano de aproximadamente 1 cm de espessura e 6 cm de comprimento, envolta por material plástico (*boby*) de 3 cm de diâmetro, para proporcionar um formato mais propício ao estabelecimento do biofilme, pois a existência do material plástico, permite que o efluente passe pelos dois lados do suporte (Figura 6).

Silva et al (2006) utilizando o mesmo tipo de material suporte empregado neste trabalho, levantou as seguintes características do mesmo: diâmetro equivalente 0,6 cm, densidade aparente de 23 g/L, porosidade 92 % e área de superfície de 43,8 m²/g.

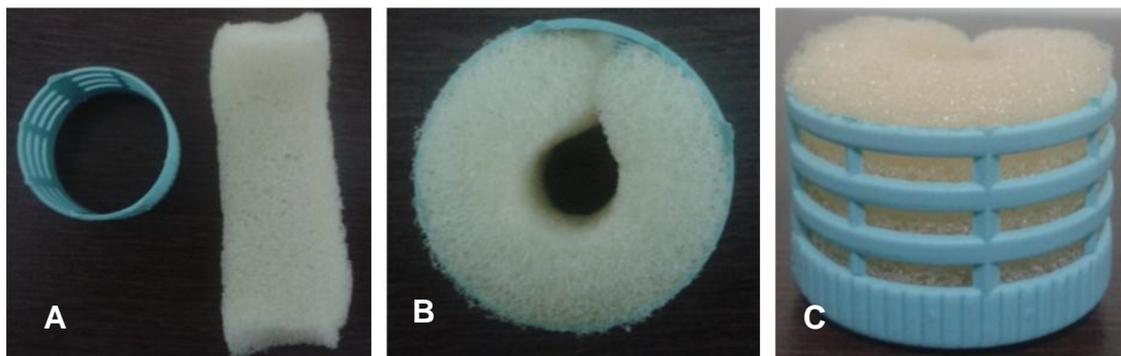


Figura 6 – Espuma de poliuretano e boby utilizados como meio suporte.

Fonte: Autoria própria.

Legenda:

A: Bobby + espuma de poliuretano cortada;

B: Meio suporte pronto para ser utilizado - vista superior;

C: Meio suporte pronto para ser utilizado - vista lateral;

O suporte para acomodar as lâminas de vidro que ficaram no fundo dos reatores, em contato com o lodo biológico era de material plástico e possuía 7 cm de largura e 8,5 de comprimento (Figura 7). Este ficou suspenso por uma linha de náilon presa na parte de fora do reator, para facilitar a retirada do mesmo (Figura 07).



Figura 7 - Suporte de plástico para acomodação das lâminas de vidro no interior dos reatores.

Fonte: Autoria própria.

4.1.1 Fases operacionais do Reator

O experimento foi conduzido por 76 ciclos, sendo estes de 8 horas cada, totalizando 25 dias de operação e 608 horas. No início de cada ciclo de operação, os reatores eram alimentados com 6,5 litros de esgoto sanitário cada um, sendo que no RBS1 foi adicionado mais 6,5 mL de EM's (1/1000) baseado no trabalho Namsivayan; Narendrakumar e Kumar (2011, p.30) (Fase de enchimento – 5 minutos).

A fase de reação aeróbia teve duração de 6,85 horas e a fase de sedimentação 1 hora. Ao termino de cada ciclo, o efluente era descartado (Fase de descarte – 4 minutos).

4.1.2 Coleta dos EM's e quantificação inicial para inserção nos reatores

Para capturar e ativar os EM's foi utilizado o método descrito no Caderno dos Micro-organismos Eficientes (EM) (BONFIM et al., 2011, p. 14).

O local utilizado para coleta dos micro-organismos como sugerido por Bonfim et al. (2011, p. 14) devia ser um ambiente de mata virgem, com este objetivo o local escolhido para captura foi uma mata nativa, situada em uma propriedade rural a 5 km do Distrito da Warta – PR, com acesso na rodovia PR-545 a $23^{\circ}10'56''S$ e $51^{\circ}12'46''O$ (Figura 8).



Figura 8- Localização da mata onde foi realizada a captura dos micro-organismos eficientes.

Fonte: Google Earth (2013).

4.1.2.1 Caracterização quantitativa dos EM's e do esgoto sanitário utilizado

A análise para caracterização inicial dos EM's ativados a ser utilizado, foi realizada antes na partida dos reatores com o objetivo de quantificar os EM's que seriam inoculados no RBS1.

Após a coleta do esgoto sanitário na SAMAE também foram realizadas estas mesmas análises, a fim de se verificar a quantidade destes micro-organismos presentes naturalmente no esgoto sanitário.

Para a caracterização foi realizada a diluição em série em solução salina (0,80%), até a diluição 10^{-6} . Com auxílio de uma pipeta automática alíquotas de 0,1 mL das diluições: 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} , foram retiradas e espalhadas, com uso de swab estéril, em placas de Petri contendo meio específico para contagem dos micro-organismos – estes meios foram incubados em temperaturas adequadas para cada tipo de micro-organismo. Cada placa foi feita em duplicata e para cada tipo de meio foram incubadas duas placas sem inóculo, sendo estas utilizadas como branco (controle de esterilidade do meio).

Os meios específicos utilizados foram:

- Meio Yeast Peptone Dextrose (YPD): Isolamento de Leveduras ($28^{\circ}\text{C}\pm 1$);
- Meio sólido Amido Caseína (AC): Isolamento de Actinomicetos ($36^{\circ}\text{C}\pm 1$);
- Meio Agar MRS: Isolamento de bactérias fermentadoras de lactose ($36^{\circ}\text{C}\pm 1$).

Na amostra coletada realizou-se também a quantificação de bactérias heterotróficas existentes utilizando meio Plate Count Agar (PCA) ($36^{\circ}\text{C}\pm 1$).

Após o período de incubação para cada grupo de organismos, foi realizada a contagem para posteriormente estimativa da Unidade Formadora de Colônia/ mL (UFC/mL).

O esquema da metodologia utilizada é mostrado na Figura 9.

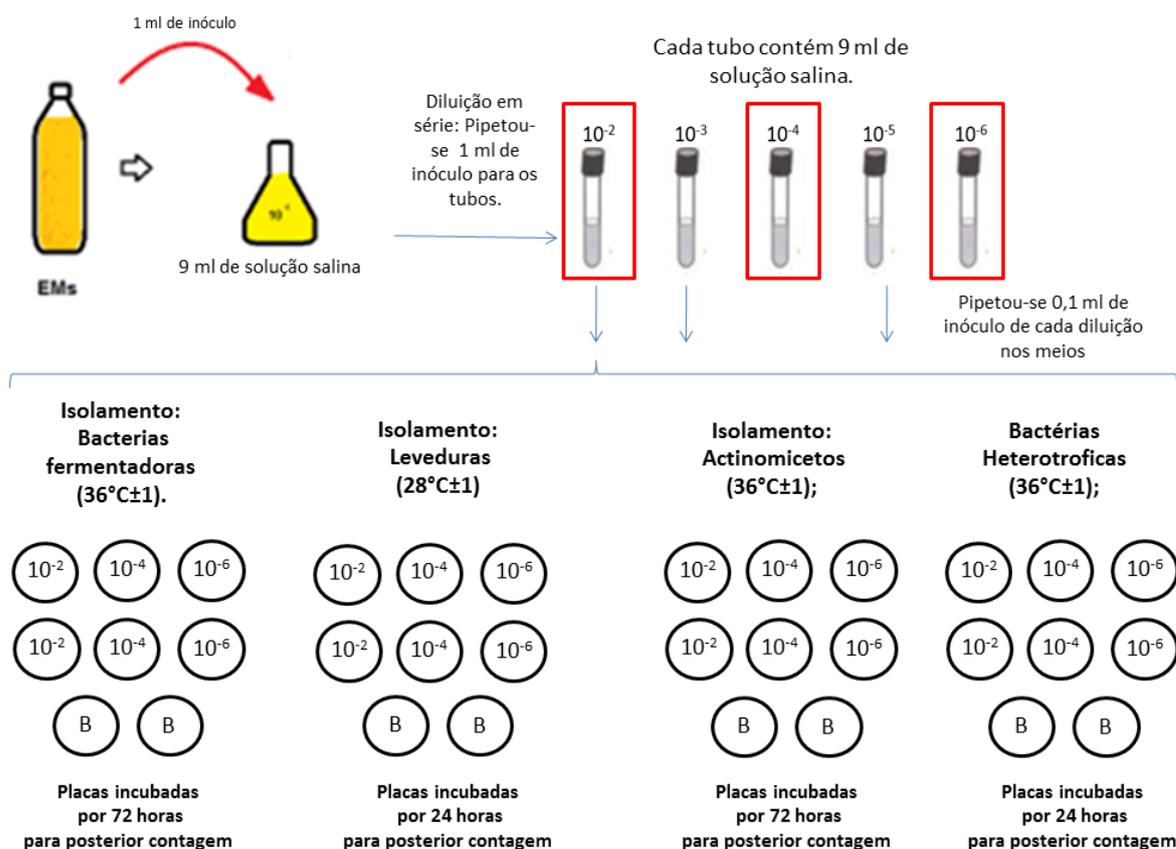


Figura 9 - Procedimentos de caracterização dos EM's – diluição em série e contagem em placa.
 Fonte: Autoria própria.

Também foram realizados testes morfo-tintoriais dos EM's para identificação e confirmação se realmente os organismos que cresceram nas placas pertenciam aos grupos analisados.

4.2 ANÁLISES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

As análises físico-químicas foram realizadas pela discente Danielle Hirome Nakagawa, graduanda do curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, que estava desenvolvendo o Trabalho de Conclusão de Curso paralelo a este.

No efluente doméstico coletado na saída dos reatores foram realizadas análises de DQO_T e pH (Quadro 01).

Quadro 01 - Tempos de amostragem para as análises físico-químicas.

Ciclo	Ensaio	Horário	Tempo de Operação Total dos Reatores (horas)
1 ^o	E1	09:00	8
4 ^o	E4	09:00	32
7 ^o	E6	09:00	56
10 ^o	E7	09:00	80
13 ^o	E8	09:00	104
16 ^o	E9	09:00	128
22 ^o	E10	09:00	176
28 ^o	E11	09:00	224
34 ^o	E12	09:00	272
40 ^o	E13	09:00	320
49 ^o	E14	09:00	392
58 ^o	E15	09:00	464
76 ^o	E16	09:00	608

Fonte: Autoria própria.

A metodologia empregada para cada parâmetro físico-químico analisado, estão apresentadas no Quadro 02:

Os métodos trabalhados para definição dos parâmetros do quadro 02 foram os determinados por APHA (2012).

Quadro 02 - Parâmetros físico-químicos analisados no efluente.

Parâmetro	Método
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg/L)	5220 D – método colorimétrico por refluxo fechado
pH	4500-H ⁺ B- Método eletrométrico

Fonte: Autoria própria.

4.2.1 Sólidos aderidos à espuma

A quantificação dos sólidos aderidos à espuma foi realizado pela primeira vez após um período de funcionamento de 368 horas, ou seja, aproximadamente 15 dias (46^o ciclo). Após esta primeira análise foram realizadas mais 2, no ciclo 61^o e 76^o.

A quantificação dos sólidos aderidos na espuma foi baseada na metodologia trabalhada por Vela (2006) e Daniel (2005). A espuma foi retirada do sistema, cortada e inserida em um tubo Falcon de 50 mL com 25 g de perola de vidro. Após este procedimento a mesma foi submetida à agitação constante no Vortex sendo lavada com água destilada a fim de desprender toda a biomassa aderida.

A espuma foi lavada até a aparente limpeza total, utilizando cerca de 200 mL de água destilada. A água de lavagem da espuma foi colocada em cadinho de porcelana e realizou-se a análise de Sólidos Totais (STA) e Sólidos Totais Voláteis (STVA), de acordo com procedimentos descritos por APHA (2012).

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram realizadas 16 análises microbiológicas no período de operação dos reatores. No Quadro 03 são apresentados o número de ensaios realizados e seus respectivos tempos.

Quadro 03 - Tempos de amostragem para as análises microbiológicas.

Ciclo	Ensaio	Horário	Tempo de Operação Total dos Reatores
1 ^o	E1	09:00	8
2 ^o	E2	13:00	12
2 ^o	E3	17:00	16
4 ^o	E4	09:00	32
6 ^o	E5	21:00	44
7 ^o	E6	09:00	56
10 ^o	E7	09:00	80
13 ^o	E8	09:00	104
16 ^o	E9	09:00	128
22 ^o	E10	09:00	176
28 ^o	E11	09:00	224
34 ^o	E12	09:00	272
40 ^o	E13	09:00	320
49 ^o	E14	09:00	392
58 ^o	E15	09:00	464
76 ^o	E16	09:00	608

Fonte: Autoria própria.

4.3.1 Análise quantitativa dos micro-organismos presentes nas espumas de poliuretano

A quantificação da biomassa aderida à espuma de poliuretano foi realizada por meio da contagem dos EM's e de bactérias heterotróficas aderidos a espuma.

Após a retirada de uma espuma nos tempos de coleta para realização das análises microbiológicas (Quadro 03), esta era adicionada em um tubo Falcon com 5g de pérolas de vidro e 10 mL de solução Tween 1%, depois colocava-se mais 5g de pérolas de vidro, e agitava-se o tubo durante um minuto para promover a separação dos micro-organismos da espuma, sendo este considerado como a primeira diluição. Posteriormente era realizada a diluição seriada e o plaqueamento das amostras seguindo procedimento semelhante ao descrito no item 4.1.2.1.

4.3.2 Caracterização da diversidade dos micro-organismos aderidos e presentes no efluente

4.3.2.1 Microscopia: Análise dos organismos presentes independentes de cultivo

Para a caracterização dos micro-organismos aderidos a espuma de poliuretano, um dos métodos utilizados foi o exame de material a fresco com o objetivo de avaliar a presença ou ausência de protozoários.

Estas análises foram realizadas em todos os tempos de amostragens expostos no Quadro 03, sendo esta realizada da seguinte forma: após os procedimentos realizados para a separação dos micro-organismos da espuma de poliuretano (item 4.3.1), uma agulha estéril era inserida no tubo contendo a diluição 10^{-1} , para retirada de 1 mL de amostra.

A amostra coletada era depositada no centro de uma lâmina de vidro (aproximadamente 0,1 mL) e coberta com lamínula, sendo posteriormente realizada a observação em microscópio ótico até o aumento de 1000x.

O outro método utilizado para caracterização da diversidade dos micro-organismos foi à análise morfo-tintorial à coloração de Gram, sendo esta realizada de acordo com a metodologia proposta por Okura (2008).

A coleta da amostra utilizada para a coloração de Gram foi à mesma da preparação a fresco, sendo utilizados os mesmos tempos de coleta.

O exame a fresco também foi realizado nas lâminas que ficaram acondicionadas no fundo do reator, com os mesmos objetivos dos micro-organismos aderidos na espuma, sendo que 1 lâmina foi retirada de cada reator nos tempos de análises expostos no Quadro 04:

Quadro 04 - Tempos de retirada das lâminas de vidro do fundo dos reatores para análise a fresco.

Ciclo	Ensaio	Horário	Tempo de Operação Total dos Reatores
1 ^o	E1	09:00	8
19 ^o	-	09:00	152
46 ^o	-	09:00	368
76 ^o	E16	09:00	608

Fonte: Autoria própria.

4.3.3 Caracterização macroscópica das colônias de EM's e das bactérias heterotróficas

Foi realizada a caracterização macroscópica das colônias cultivadas em placa de Petri de cada grupo dos EM's em estudo (actinomicetos, leveduras e bactérias fermentadoras de lactose), e bactérias heterotróficas presentes no esgoto sanitário, EM's inoculados no RBS1 e material suporte, tomando como base para tal, trabalhos na literatura que já haviam trabalhado com cada grupo de organismos presente nos EM's.

Quanto às bactérias heterotróficas a caracterização destas foi realizada segundo Rodina (1972).

4.3.4 Prova da Catalase

Foi realizada a prova de catalase nas colônias de bactérias fermentadoras de ácido láctico cultivadas, a fim de verificar se as mesmas pertenciam a este grupo ou não. A metodologia adotada para tal foi a de Andreoli (2009, p. 56) adaptada, sendo que a modificação aplicada a esta foi que ao invés de se utilizar o gotejamento de peróxido de hidrogênio no tubo de ágar, este foi gotejado sobre uma lâmina de vidro contendo uma pequena amostra da colônia escolhida.

As colônias que apresentaram formação de bolhas após o gotejamento eram consideradas catalase positiva, pois segundo Andreoli (2009, p. 56) "a efervescência

indica que o cultivo possui a enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio”.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DOS EM'S E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS INSERIDO NO RBS1, PRESENTES NO ESGOTO SANITÁRIO E EM CADA BATELADA

Na Tabela 01 são apresentados os valores da UFC/mL: dos EM's e bactérias heterotróficas presente na solução EM inserida no RBS1, presentes naturalmente no esgoto sanitário e a quantidade final de EM's e bactérias heterotróficas obtido no início de cada batelada (Tabela 01).

Tabela 01 – Quantificação de EM e bactérias heterotróficas presentes na solução EM inserida no RBS1, presente naturalmente no esgoto sanitário e em ambos os reatores no início de cada batelada.

	UFC/mL			
	Bactérias fermentadoras	Leveduras	Actinomicetos	Heterotróficas
EM's e bactérias heterotróficas inoculado no RBS1	$6,0 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^8$	$1,15 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^7$
Concentração de EM's e bactérias heterotróficas presentes naturalmente no esgoto sanitário	$2,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^8$
Concentração Total RBS1 (Início de cada batelada)	$6,2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^8$
Concentração Total RBS2 (Início de cada batelada)	$2,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^8$

Fonte: Autoria própria.

Observando os dados apresentados na Tabela 01, nota-se que a concentração final de bactérias heterotróficas e actinomicetos foram às mesmas nos dois reatores, quanto as leveduras, no RBS1 a concentração destas foi cerca de 50% maior que no RBS2 e para as bactérias fermentadoras de lactose a concentração final destas no RBS1 foi 31 vezes maior que no RBS2.

Mesmo com estas diferenças nos valores obtidos para os EM's e bactérias heterotróficas no esgoto sanitário, o comportamento de ambos os reatores ao longo do tempo de experimento foi muito próximo, indicando que esta diferença não foi significativa, como será mostrado nos próximos itens.

5.2 PARÂMETROS FÍSICO –QUÍMICOS

5.2.1 Esgoto sanitário bruto e na saída dos reatores

Na Tabela 02 são apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas no esgoto sanitário bruto na entrada dos reatores.

Tabela 02 - Resultados das análises físico-químicas realizadas no esgoto sanitário bruto na entrada dos reatores.

Parâmetro	pH	DQO _T (mg/L)
Mínimo	6,9	376
Máximo	7,2	576
Médio	7,2	464
Número de amostras	4	4

Fonte: Dados fornecidos pela Graduanda Danielle Hirome Nakagawa, 2013.

O pH é um dos parâmetros químicos importante a ser analisado devido à sua relação com o tratamento de efluentes, e deve ser monitorado pois influencia os processos químicos coagulantes, oxidantes e microbiológicos, sendo que os seus valores fornecem um indicativo da condição do efluente em relação a sua condição de acidez ($\text{pH} < 7$), neutralidade ($\text{pH} = 7$) e alcalinidade ($\text{pH} > 7$) (VON SPERLING, 1996, p. 30).

A DQO representa de forma indireta, o teor de matéria orgânica nos efluentes, sendo utilizado como um indicador do potencial do consumo de oxigênio dissolvido (VON SPERLING, 1996, p. 40). Observando o valor de DQO_T médio

obtido e comparando com a concentração média fornecida por Von Sperling (1996, p. 112), que fornece uma faixa de 450-800 mg/L, com valores típicos de 600 mg/L, conclui-se que o efluente em questão não possuía carga orgânica muito elevada.

De acordo com a Resolução CONAMA nº 430 de 2011, art. 22 o lançamento de esgotos sanitários por meio de emissários submarinos deve atender aos padrões da classe do corpo receptor, após o limite da zona de mistura e ao padrão de balneabilidade, de acordo com as normas e legislação vigentes e da CONAMA nº 357 de 2005 temos os valores estabelecidos de pH e DBO para casa classe.

Observando os valores de pH constantes na norma e os encontrados no esgoto sanitário alimentado nos reatores, o efluente em questão enquadra-se dentro de todas as classes, porém os valores de DQO_T encontram-se bem elevados.

Levando em consideração os valores apresentados na norma, este esgoto sanitário se fosse lançado em um corpo receptor sem tratamento poderia ocasionar problemas, como diminuição instantânea do oxigênio dissolvido (OD) e com isso prejuízos à fauna aquática.

Na Tabela 03 são apresentados os valores de DQO_T e pH na saída de ambos os reatores.

Tabela 03 – Resultados de DQO_T obtidos nas saídas dos Reatores

Ciclo	Ensaio	RBS1		RBS2	
		DQO _T (mg/L)	pH	DQO _T (mg/L)	pH
1 ^o	E1	138	8,25	131	7,90
4 ^o	E4	188	8,05	164	7,90
7 ^o	E6	145	8,36	95	8,20
10 ^o	E7	96	8,22	169	8,20
13 ^o	E8	155	8,05	179	7,70
16 ^o	E9	166	7,92	164	7,80
22 ^o	E10	147	8,07	129	7,80
28 ^o	E11	101	7,97	91	8,00
34 ^o	E12	97	7,92	104	7,90
40 ^o	E13	71	7,89	68	8,10
49 ^o	E14	73	8,02	50	8,70
58 ^o	E15	66	7,83	55	8,00
76 ^o	E16	57	8,12	60	8,10

Fonte: Dados fornecidos pela Graduanda Danielle Hirome Nakagawa, 2013.

Analisando os resultados de saída dos reatores (Tabela 03) e entrada semanal (Tabela 01), nota-se que houve redução na carga orgânica existente em ambos os reatores, pois em todas as entradas o valor de DQO_T , situava-se por volta de 300 mg/L e em ambas as saídas este valor manteve-se abaixo de 190 mg/L. Da Tabela 03, nota-se também que os valores de DQO_T , no geral diminuíram ao longo do tempo, indicando que os organismos presentes nos reatores com o tempo vieram a aumentar a sua potencialidade em degradação.

Das análises realizadas em termos de percentual foi constatada remoção média de DQO_T de aproximadamente 70,8% e 71,7% no RBS1 e RBS2 respectivamente.

Lima et al. (2013) trabalhando com um Reator Anaeróbio de Manto de Lodo (UASB), operado com esgoto sanitário, atingiram também um eficiência média de remoção de matéria orgânica de 70% em pouco tempo de operação do sistema.

Colares e Sandri (2013) com o objetivo de avaliar a eficiência de uma estação de tratamento de esgoto composta por um conjunto de três tanques sépticos compartimentados e dispostos em série seguidos por três leitos cultivados com *Typha sp* e construído com fluxo subsuperficial horizontal e preenchidos com cascalho natural, brita 2 e cascalho lavado, atingiram eficiência total de remoção de DQO_T de 65,40%, um valor bem próximo ao atingido neste trabalho.

Callado e Foresti (2005), avaliando o desempenho de um sistema composto de três Reatores Sequenciais em Batelada (RSB), em escala de laboratório, formando um sistema anaeróbio/aeróbio/anaeróbio na remoção biológica de carbono e nutrientes, operando em ciclos de 12 horas, com 8,0 L por batelada, tratando esgoto sanitário sintético, obtiveram remoção média de 86% de DQO_T , sendo que deste percentual 70% foi removida do Reator 1. Como um todo, os referidos autores concluíram que o sistema adotado foi eficiente no processo de remoção de matéria orgânica.

Os três sistemas apresentados acima, mesmo sendo bem diferentes do desenvolvido neste trabalho, apresentaram percentuais bem semelhantes com os encontrados neste estudo, indicando que o sistema aplicado pode ser comparado com muitos trabalhos.

Do percentual de remoção calculado, percebe-se que os valores de DQO_T , obtidos não diferem muito em ambos os reatores, indicando possivelmente que a

concentração de EM's inserida no RBS1 provavelmente não veio a contribuir para otimizar o processo de tratamento biológico.

Quanto ao pH, observa-se que o valor do mesmo aumentou, saindo da zona da neutralidade para alcalinidade.

Foi realizado nos reatores um perfil temporal de DQO_T , pH e OD, após 344 horas de operação dos sistema (Ciclo 44⁰), a fim de se verificar o comportamento destes ao longo do tempo (Figura 10).

Observando os resultados apresentados na Figura 10, nota-se que o consumo de DQO_T ocorreu nas horas iniciais do ciclo, sendo que nas 3 primeiras horas de reação ambos os sistemas, RBS1 e RBS2, já estavam removendo cerca de 70% de DQO_T , percentual este encontrado como média de remoção em ambos os reatores no período total de operação de cada ciclo, o que indica que um TDH máximo de 4 horas já seria suficiente para remoção de DQO_T .

Lapa (2003, p. 69), trabalhando com um reator em batelada, porém anaeróbio e de leito fixo, no tratamento de esgoto sanitário, constatou que após um período de 4 horas, o percentual de remoção de DQO_T , já havia atingido o seu nível máximo, indicando que o tempo de ciclo do reator, poderia ser reduzido para 4 horas cada batelada.

Quanto ao pH, novamente observa-se que o valor deste só veio a aumentar, sendo que ao longo de uma batelada, saiu da faixa de neutralidade para uma região de alcalinidade.

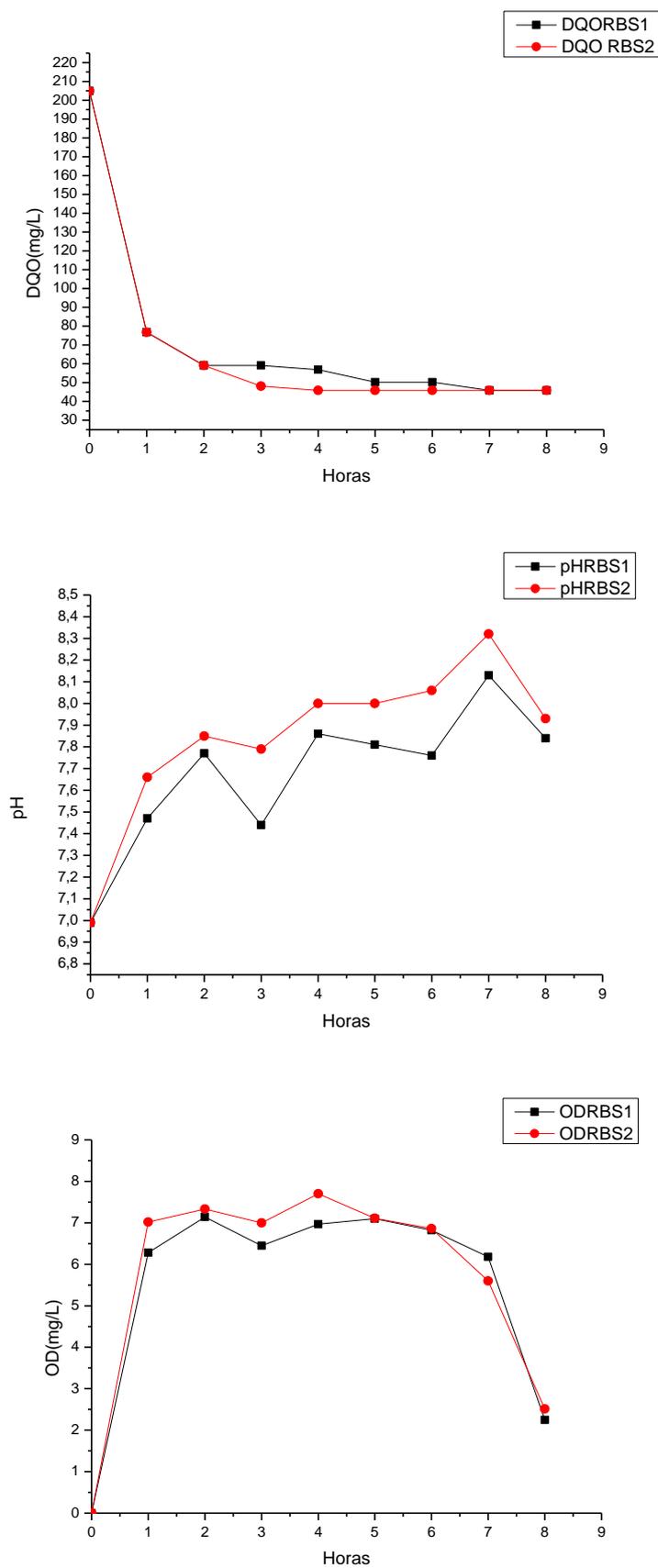


Figura 10 – Perfil temporal após 344 horas de operação dos reatores.
Fonte: Dados fornecidos pela Graduanda Danielle Hirome Nakagawa, 2013.

5.2.2 Sólidos totais aderidos na espuma

A quantificação dos sólidos aderidos à espuma – STA e STVA foram realizados após um período de funcionamento de 368 horas (ciclo 46^o), ou seja, aproximadamente 15 dias. No início do experimento o meio suporte encontrava-se limpo, sendo considerado nulo a quantidade de sólidos presentes. A Tabela 04 traz os resultados das análises realizadas:

Tabela 04 – Resultado das análises dos sólidos aderidos a espuma de poliuretano presentes nos reatores.

Ciclo	Tempo de operação dos reatores (horas)	RBS1		RBS2	
		STA (mg/g de espuma)	STVA (mg/g de espuma)	STA (mg/g de espuma)	STVA (mg/g de espuma)
-	0	0	0	0	0
46 ^o	368	342,4	215,2	473,8	235,7
61 ^o	488	793,2	295,8	513,6	212,1
76 ^o	608	851,4	300,0	654,8	330,4

Fonte: Dados fornecidos pela Graduanda Danielle Hirome Nakagawa, 2013.

Analisando os valores da Tabela 04, observa-se que em ambos os reatores houve um aumento na quantidade de STA e STVA, indicando que a espuma teve capacidade de retenção de sólidos.

De maneira geral observando o valor final de STA no RBS1, nota-se que houve um aumento de 40% na quantidade destes do segundo ao quarto ensaio, e quanto ao RBS2 houve um aumento de 72%.

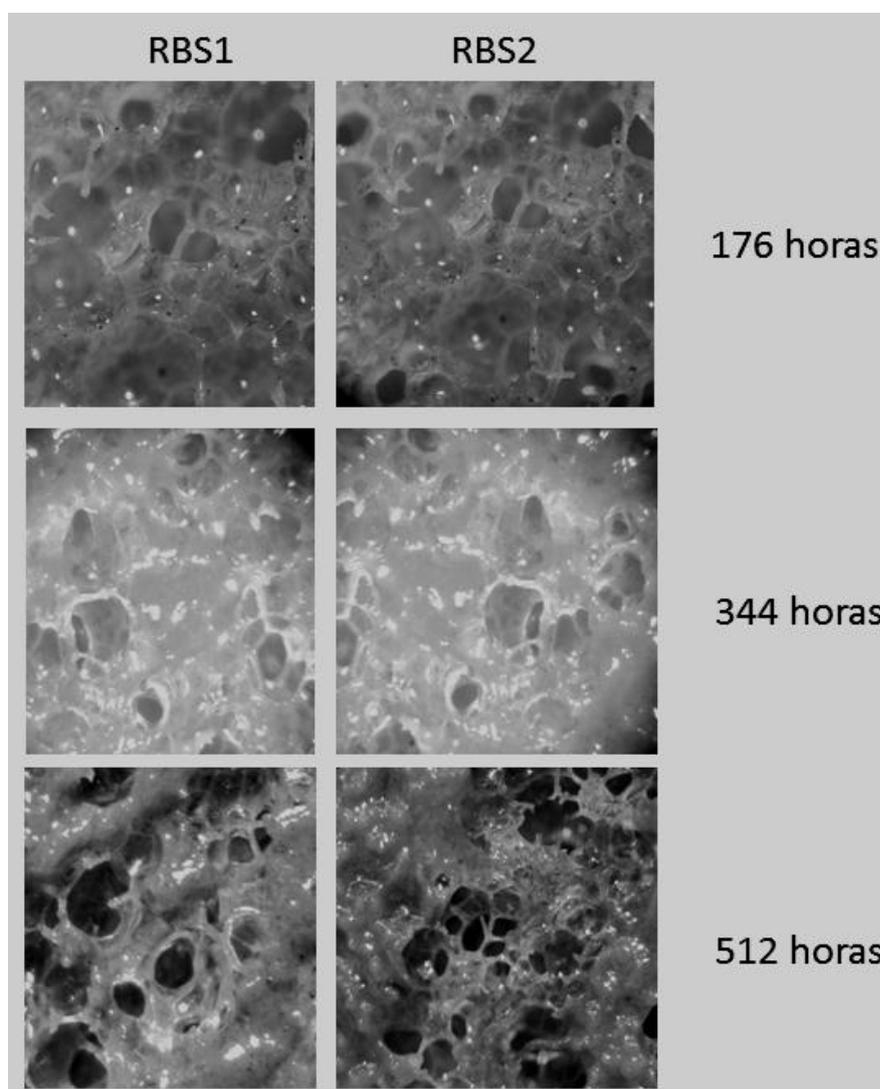
A análise dos STVA acaba indicando de maneira indireta a quantidade de biomassa aderida ao meio suporte. Em uma análise geral houve um aumento na quantidade desta em ambos os reatores, sendo que o RBS2 apresentou cerca de 10% a mais de STVA do que o RBS1.

No RBS2 foi observada uma pequena queda no valor dos STVA, da segunda a quarta análise, isto possivelmente pode ter ocorrido devido a um processo de desprendimento de biomassa.

Como a concentração de EM's inserido no RBS1 foi baixa e além deste fato já existir naturalmente estes grupos de micro-organismos no esgoto sanitário, a concentração de EM's no RBS1 não possibilitou verificar se os EMs poderiam melhorar ou não a adesão dos micro-organismos ao material suporte.

Na Figura 11 é possível visualizar imagens dos poros das espumas em períodos diferentes de análises: 176 horas (Ciclo 46^o), 344 horas (Ciclo 61^o) e 512 horas (Ciclo 76^o)

Da Figura 11 observa-se que há um aumento na quantidade de material aderido na espuma de poliuretano ao longo do tempo, e que não há diferença visual entre o meio suporte proveniente de ambos os reatores.

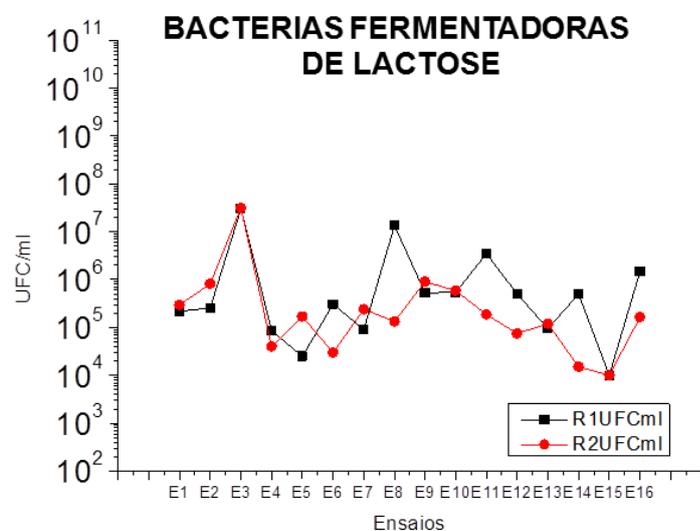


**Figura 11 - Imagem dos poros da espuma em estereoscópio (Aumento de 100x).
Fonte: Autoria própria.**

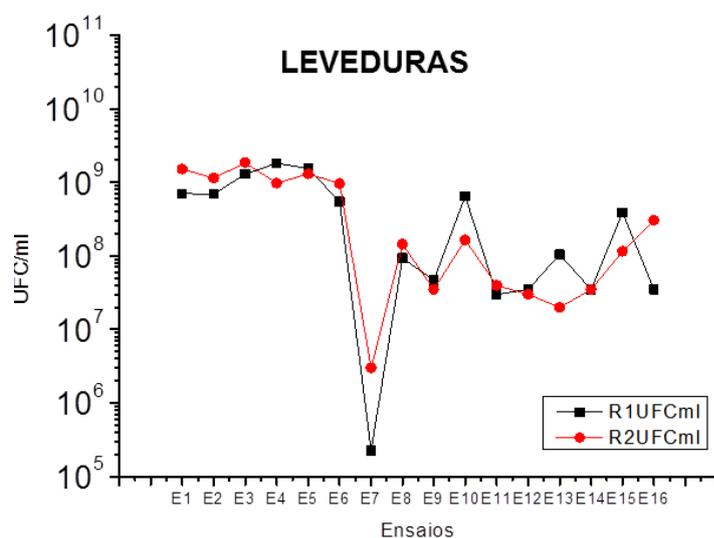
5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.3.1 Quantificação dos EM's aderidos ao meio suporte (Leveduras, Actinomicetos e Bactérias fermentadoras de lactose) e bactérias heterotróficas

Nas Figuras 12 e 13 são apresentados os resultados da quantificação dos EM's e bactérias heterotróficas aderidas ao meio suporte de ambos os reatores – RBS1 e RBS2.



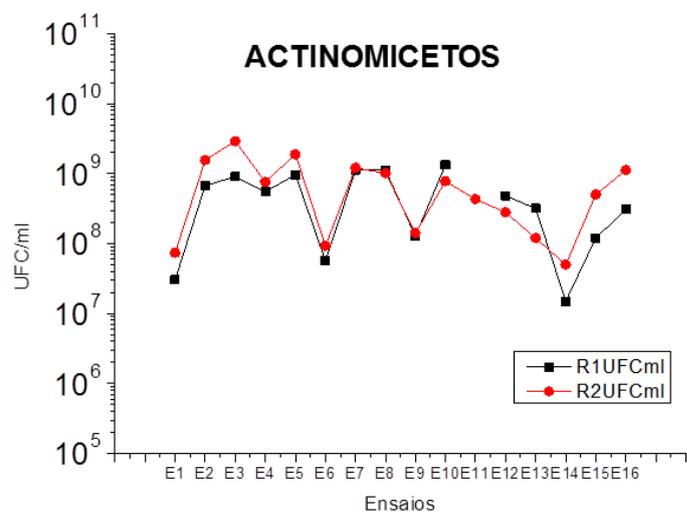
ENSAIOS	Horas (Total)	BACTERIAS FERMENTADORAS DE LACTOSE (UFC/ml)	
		RBS1	RBS2
E1	8	$2,20 \cdot 10^5$	$2,95 \cdot 10^5$
E2	12	$2,55 \cdot 10^5$	$8,15 \cdot 10^5$
E3	16	$3,05 \cdot 10^7$	$3,15 \cdot 10^7$
E4	32	$8,50 \cdot 10^4$	$4,00 \cdot 10^4$
E5	44	$2,50 \cdot 10^4$	$1,70 \cdot 10^5$
E6	56	$3,05 \cdot 10^5$	$3,00 \cdot 10^4$
E7	80	$9,00 \cdot 10^4$	$2,40 \cdot 10^5$
E8	104	$1,35 \cdot 10^7$	$1,35 \cdot 10^5$
E9	128	$5,30 \cdot 10^5$	$9,05 \cdot 10^5$
E10	176	$5,40 \cdot 10^5$	$5,90 \cdot 10^5$
E11	224	$3,50 \cdot 10^6$	$1,85 \cdot 10^5$
E12	272	$5,00 \cdot 10^5$	$7,50 \cdot 10^4$
E13	320	$9,50 \cdot 10^4$	$1,20 \cdot 10^5$
E14	392	$5,00 \cdot 10^5$	$1,50 \cdot 10^4$
E15	464	$1,00 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^4$
E16	608	$1,50 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^5$



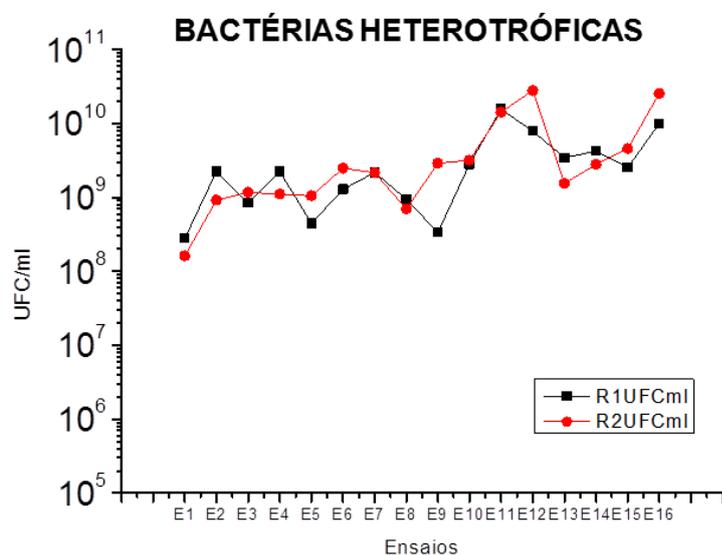
ENSAIOS	Horas (Total)	LEVEDURA (UFC/ml)	
		RBS1	RBS2
E1	8	$7,05 \cdot 10^8$	$1,52 \cdot 10^9$
E2	12	$7,00 \cdot 10^8$	$1,15 \cdot 10^9$
E3	16	$1,30 \cdot 10^9$	$1,86 \cdot 10^9$
E4	32	$1,82 \cdot 10^9$	$9,75 \cdot 10^8$
E5	44	$1,56 \cdot 10^9$	$1,31 \cdot 10^9$
E6	56	$5,50 \cdot 10^8$	$9,65 \cdot 10^8$
E7	80	$2,25 \cdot 10^5$	$3,00 \cdot 10^6$
E8	104	$9,35 \cdot 10^7$	$1,44 \cdot 10^8$
E9	128	$4,65 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^7$
E10	176	$6,50 \cdot 10^8$	$1,65 \cdot 10^8$
E11	224	$3,00 \cdot 10^7$	$4,00 \cdot 10^7$
E12	272	$3,50 \cdot 10^7$	$3,00 \cdot 10^7$
E13	320	$1,05 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^7$
E14	392	$3,50 \cdot 10^8$	$3,50 \cdot 10^7$
E15	464	$3,90 \cdot 10^8$	$1,15 \cdot 10^8$
E16	608	$3,50 \cdot 10^7$	$3,05 \cdot 10^8$

Figura 12 - Resultado da quantificação dos micro-organismos presente na espuma de poliuretano em escala logarítmica do grupo dos EM's (Bactérias fermentadoras de Lactose e Leveduras) dos reatores.

Fonte: Autoria própria.



ENSAIOS	Horas (Total)	ACTINOMICETOS (UFC/ml)	
		RBS1	RBS2
E1	8	3,05.10 ⁷	7,40.10 ⁷
E2	12	6,75.10 ⁸	1,56.10 ⁹
E3	16	9,00.10 ⁸	2,90.10 ⁹
E4	32	5,55.10 ⁸	7,60.10 ⁸
E5	44	9,65.10 ⁸	1,90.10 ⁹
E6	56	5,65.10 ⁷	9,30.10 ⁷
E7	80	1,13.10 ⁹	1,21.10 ⁹
E8	104	1,12.10 ⁹	1,02.10 ⁹
E9	128	1,29.10 ⁸	1,41.10 ⁸
E10	176	1,33.10 ⁹	7,80.10 ⁸
E11	224	0,00.10 ⁰	4,30.10 ⁸
E12	272	4,80.10 ⁸	2,80.10 ⁸
E13	320	3,20.10 ⁸	1,20.10 ⁸
E14	392	1,50.10 ⁷	5,00.10 ⁷
E15	464	1,20.10 ⁸	5,05.10 ⁸
E16	608	3,10.10 ⁸	1,12.10 ⁹



ENSAIOS	Horas (Total)	HETEROTRÓFICAS (UFC/ml)	
		RBS1	RBS2
E1	8	2,80.10 ⁸	1,63.10 ⁸
E2	12	2,25.10 ⁹	9,20.10 ⁸
E3	16	8,50.10 ⁸	1,18.10 ⁹
E4	32	2,24.10 ⁹	1,12.10 ⁹
E5	44	4,50.10 ⁸	1,05.10 ⁹
E6	56	1,29.10 ⁹	2,49.10 ⁹
E7	80	2,19.10 ⁹	2,17.10 ⁹
E8	104	9,45.10 ⁸	7,00.10 ⁸
E9	128	3,38.10 ⁸	2,91.10 ⁹
E10	176	2,82.10 ⁹	3,20.10 ⁹
E11	224	1,57.10 ¹⁰	1,43.10 ¹⁰
E12	272	7,90.10 ⁹	2,81.10 ¹⁰
E13	320	3,45.10 ⁹	1,55.10 ⁹
E14	392	4,25.10 ⁹	2,80.10 ⁹
E15	464	2,55.10 ⁹	4,60.10 ⁹
E16	608	1,01.10 ¹⁰	2,55.10 ¹⁰

Figura 13 - Resultado da quantificação dos micro-organismos presente na espuma de poliuretano em escala logarítmica do grupo dos EM's (Actinomicetos) e bactérias heterotróficas dos reatores.

Fonte: Autoria própria.

Das Figuras 12 e 13, nota-se que os reatores comportaram-se quase que como replicas um do outro. Isto possivelmente pode ser explicado pela concentração final de EM's e bactérias heterotróficas presentes nestes, item 5.1, Tabela 01, ou pelo TDH trabalhado, pois como obtido no perfil de DBO_T para os reatores, após 4 horas de operação a remoção deste já apresentava-se estável, indicando que a matéria orgânica (alimento), para estes organismos já havia sido consumida e tornada de certa forma escassa.

Este fato pode ter feito com que a partir deste momento ocorre-se um processo de endogenia dos organismos presentes, fazendo com que não pudesse ser observada diferença existente entre ambos os reatores, pois as análises realizadas tinham espaçamento de tempo maior que 4 horas em sua maioria.

Namsivayan; Narendrakumar e Kumar (2011, p.30) em seu estudo utilizaram uma solução de EM's com o objetivo de avaliar qual a influencia deste, em relação a redução de alcalinidade total, sólidos dissolvidos, DBO e DQO do esgoto doméstico. Estes autores afirmaram que na concentração de EM's inseria no seu reator havia cerca de $1,0 \cdot 10^4$ UFC/mL de bactérias fermentadoras de ácido láctico, $1,0 \cdot 10^5$ UFC/mL de leveduras, $3,0 \cdot 10^3$ UFC/mL de actinomicetos e $1,0 \cdot 10^5$ UFC/mL de fungos fermentadores.

O reator trabalhado possuía capacidade para 2 litros, sendo que destes, 1 litro foi preenchido inicialmente com esgoto doméstico e 100 mL de EM's ativados. O reator foi operado por 20 dias, sendo que nos 5 primeiros dias de experimento, foram adicionados mais 0,0001 mL (1/10,000) de EM's no reator.

Em seus resultados os autores constataram que todos os parâmetros testados apresentaram redução distinta, e quanto ao número de organismos em suspensão, estes apresentaram que o total da população bacteriana e levedura foram aumentados e quanto à população de fungos e actinomicetos não houve mudança significativa.

O valor inicial encontrado pelos referidos autores em seu reator foram de: $11,2 \cdot 10^4$ de bactérias; $2,4 \cdot 10^2$ actinomicetos; $12,0 \cdot 10^3$ leveduras e $41,1 \cdot 10^3$ UFC/mL de bolores. E após 20 dias de incubação estes valores passaram para $41,0 \cdot 10^7$ UFC/mL de bactérias, $51,0 \cdot 10^2$ UFC/mL de actinomicetos, , $27,1 \cdot 10^5$ UFC/mL de leveduras e $54,1 \cdot 10^4$ UFC/mL de bolores.

Observando os resultados demonstrados nas Figuras 12 e 13, e os obtidos pelos autores acima, constata-se que o número de organismos do grupo dos EM's

encontrou-se em número muito mais elevado no final deste experimento, do que os obtidos por Namsivayam, Narendrakumar e Kumar (2011, p.30), isto possivelmente pode ser explicado pelo fato dos organismos analisados nesse trabalho serem aqueles aderidos na espuma de poliuretano, formando biofilme, o que favorece o crescimento e desenvolvimento destes.

Todos os organismos dependem de forma direta e indireta dos fatores físico-químicos para o seu desenvolvimento. Desta forma, correlacionar os mesmos com o número de organismos no processo de tratamento, pode acabar explicando muito dos resultados obtidos. Os organismos cultivados neste trabalho, possuem faixas de pH e temperatura ótima, além de um metabolismo próprio (heterotróficos ou autotróficos, aeróbios, anaeróbios ou facultativos).

As bactérias fermentadoras de ácido láctico, por exemplo, são organismos em sua maioria mesófilicas, podendo se desenvolver na faixa de temperatura de 5^oC a 45^oC, com pH entre 4,0 e 4,5 (CAPLICE; FITZGERALD, 1999, p. 132). Como trazem em seu próprio nome, realizam o processo de fermentação para obtenção de energia.

Este processo de fermentação pode ser entendido como um processo metabólico, que ocorre na ausência de oxigênio. Utiliza um composto orgânico como acceptor final de elétrons e produz pouca energia, se comparado com o processo aeróbio (TORTORA; FUNKE e CASE, 2005, p.132).

Pode ser observado nas Figuras 12 e 13, que dentre os 4 grupos de organismos analisados, o que apresenta-se em menor número é o das bactérias fermentadoras. Isto possivelmente pode ter ocorrido devido ao metabolismo desta, e também devido ao pH encontrado nas análises realizadas no esgoto sanitário, visto que este apresentou-se na faixa da neutralidade, próximo da alcalinidade, e como apresentado, os valores ideais para o crescimento deste organismos fermentadores situa-se na faixa ácida.

Outro fator que possivelmente desfavoreceu este grupo de organismos fermentadores foi à competição com os organismos aeróbios presentes no meio, pois os reatores foram equipados com bombas de aeração, o que favoreceu este último grupo. Sendo que estes em sua maioria crescem muito mais rápido do que os organismos facultativos ou anaeróbios.

Levando em consideração a quantidade inicial para cada grupo de organismos dos EM's e bactérias heterotróficas presentes no esgoto sanitário no

início de cada batelada, pode-se realizar algumas análises em relação à quantidade dos organismos presentes no biofilme.

Da Figura 12 observa-se que o número de bactérias fermentadoras de ácido láctico, aumentou na ordem de 10^1 em 8 horas (1 ciclo) no RBS2, pois inicialmente estes grupo apresentava-se com um valor de 10^4 no esgoto sanitário. Já no RBS1 a quantidade destas manteve-se com os mesmos valores iniciais do efluente, 10^5 .

Estes organismos atingiram seu valor máximo no RBS1 e RBS2 após 16 horas de operação dos reatores (E3, 3^o ciclo), com um aumento de 10^5 UFC/mL para 10^7 UFC/mL no RBS1 e de 10^4 UFC/mL para 10^7 no RBS2.

Destes resultados pode-se concluir que ambos os reatores nas primeiras horas de operação já favoreceram a adesão destes organismos ao material suporte.

Como no caso das bactérias fermentadoras de lactose, após 16 horas de operação (E3, 3^o ciclo), as leveduras apresentaram seu valor máximo de UFC/ML no RBS1, partindo de um valor inicial neste de 10^6 UFC/mL para 10^9 UFC/mL. No RBS2 este valor foi atingido após 8 horas de operação, indicando que este sistema foi favorável ao desenvolvimento destes.

Os valores obtidos para estes organismos mantiveram-se quase que constante, diminuindo na ordem de 10^2 , por volta de 104 horas de reação (E8, 13^o ciclo) no RBS1 e no RBS2 após 128 horas (E9, 16^o ciclo).

Isto possivelmente ocorreu devido a processos físicos e biológicos já esperados, que ocorrem na formação de um biofilme, como cisalhamento deste, devido ao movimento do fluído e predação por outros organismos, como os protozoários.

Após 80 horas de operação dos reatores foi observada uma queda na ordem de 10^3 na concentração das leveduras nos dois reatores. Esta queda não foi explicada por nenhum dos fatores físico-químicos obtidos do meio, pois não houve nenhuma modificação nos valores dos parâmetros analisados, sendo esta possivelmente explicada por algum erro experimental.

As leveduras são fungos unicelulares e filamentosos. São capazes de crescimento anaeróbio e aeróbio (organismos anaeróbios facultativos), podendo utilizar oxigênio ou um componente orgânico como acceptor final de elétrons (TORTORA; FUNKE e CASE, 2005, p. 336), pois possibilita o desenvolvimento desses em vários ambientes.

Os fungos normalmente sobrevivem em condições em que as bactérias não sobreviveriam, são considerados como quimio-heterotróficos, crescendo normalmente em ambientes com pH próximo de 5.

Conhecendo os valores de pH obtidos para o esgoto sanitário e observando o perfil deste ao longo do tempo, pode-se concluir que este pode ter sido um fator prejudicial ao desenvolvimento destes, diminuindo sua frequência no meio, e por consequência na formação do biofilme.

Quanto aos actinomicetos as primeiras horas de operação não foram muito favoráveis ao estabelecimento do biofilme pelos mesmos, visto que estavam presentes nos reatores inicialmente cerca de 10^7 UFC/mL , e após 8 horas de reação (E1, 1^o ciclo) este número permaneceu quase que inalterado.

Estes organismos crescem preferencialmente em ambientes com pH neutro a alcalino (Araújo, 1998), e muitas das espécies são termofílicas, e aeróbias. Com temperaturas ótimas de desenvolvimento em torno de 55°C (OLIVEIRA, 2003, p. 19).

Observando estas informações juntamente com o perfil de pH obtido e a temperatura trabalhada neste experimento, nota-se que o pH foi um dos fatores que favoreceram o desenvolvimento destes organismos desde as primeiras horas de operação dos reatores, porém a temperatura existente no meio, pode de certa forma ter retardado o desenvolvimento destes, pois este fator influencia de maneira direta na velocidade de crescimento dos organismos, sendo que quando esta abaixo do ponto ótimo estes organismos podem crescer com uma velocidades baixa, ou até mesmo param de crescer.

No RBS2 o valor máximo para UFC/mL destes organismos foi atingido após 12 horas de reação (E2, 1^o ciclo), enquanto que para o RBS1 este valor foi obtido após 80 horas (E7, 10^o ciclo).

Em uma análise geral nota-se que ambos os organismos pertencentes ao grupo dos EM's, foram capazes de formar biofilme já nas primeiras horas de operação dos reatores, e dos 3 grupos analisados, as leveduras foram os que aparecem em maior quantidade no biofilme.

Segundo Zafarzadeh, et al. (2010), o biofilme formado em um material suporte dependerá diretamente dos micro-organismos que estão se desenvolvendo em suspensão no meio líquido. Se a taxa de crescimento ou a quantidade de um determinado grupo de organismos em suspensão é maior do que a taxa de crescimento de outro e quantidade, então, estes serão preferencialmente aderidos

ao biofilme. Isto indica que possivelmente no efluente o grupo predominante dos EM's era o grupo das leveduras.

Quanto ao número de bactérias heterotróficas observa-se que não houve diferença significativa no número desta em ambos os reatores, indicando que a concentração dos EM's inserida RBS1 não influenciou no desenvolvimento destes organismos.

O material suporte no caso destes micro-organismos, não apresentou-se inicialmente como um meio favorável ao seu desenvolvimento, visto que foi apenas após 224 horas de operação, que estes organismos apresentaram um aumento significativo de UFC/mL, com um aumento de 10^8 UFC/mL para 10^{10} UFC/mL, nos dois reatores.

Correa (2012, p. 05), trabalhando com um reator em bateladas sequenciais, aerado, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano, alimentado com efluente proveniente de abatedouro suíno, obteve que após 12 horas de operação do reator, a UFC/mL dos organismos heterotróficos presentes nesta, aumentou de 10^5 para 10^8 UFC/mL.

A quantidade de bactérias heterotróficas aderidas ao biofilme é dependente da carga orgânica aplicada no reator, pois de acordo Fu et al., (2010) as relações C/N semelhantes resultam em populações bacterianas aderidas nos biofilmes também semelhantes, sendo este responsável, em parte, na seleção e dominância das comunidades bacterianas em biofilme. A maioria da biomassa heterotrófica pode ser restringida devido à escassez de recursos de carbono, pois estas dependem de maneira direta da matéria orgânica para se desenvolverem.

Pelos resultados apresentados para ambos os organismos os dois reatores apresentaram-se com características favoráveis ao desenvolvimento e formação de biofilme.

Lee e Cho (2010) em seu trabalho buscaram avaliar a remoção de nitrogênio em águas residuais, utilizando em seu experimento a imobilização dos EM's. Para tal os referidos autores imobilizaram uma mistura de EM's em álcool polivinílico (PVA). O sistema de PVA com EM's imobilizados foi estabelecido em um reator em bateladas sequenciais, com capacidade para 3 L, e operado com TDH de 12 horas, aerado.

Neste sistema, quando atingido as condições ideais de operação (aeração intermitente) houve remoção de 73% de nitrogênio total e 93% de DQO,

demonstrando que o sistema adotado neste trabalho foi eficiente na remoção de matéria orgânica e nitrogênio.

Segundo relatos destes autores este é um dos primeiros trabalhos que combinam uma técnica de imobilização dos EM's no tratamento biológico de efluentes.

Como no caso de Lee e Cho (2010) os EM's presentes no esgoto sanitário e os inoculados nos reatores trabalhados nesse experimento, também apresentaram capacidade de formar biofilme.

Em relação ao número dos organismos estudados, nas Figuras 12 e 13, são observadas algumas quedas no número destes, nos diferentes tempos de análises. Estas quedas podem ser explicadas eventualmente pelo desprendimento da biomassa, pois segundo Pereira (2001), o crescimento e formação de um biofilme pode ser caracterizado como um crescimento de padrão sigmoidal, onde após o seu ápice de crescimento, ocorre possíveis fases de declínio onde a velocidade de crescimento dos organismos torna-se negativa, sendo isto resultado pela morte dos organismos ou por desprendimento de porções do biofilme devido a fenômenos de erosão superficial.

Os reatores foram aerados durante a maior parte do seu funcionamento, e durante este processo foi observado que o fluxo de ar causava grande agitação no material suporte presente em ambos os reatores, isto por ventura pode ter prejudicado o crescimento do biofilme, explicando o porquê não houve uma diferença tão significativa na quantidade de organismos encontrados no meio suporte em relação aos presentes no meio.

As velocidades elevadas acabam retardando a formação primária do biofilme por tensões tangenciais. Porém, após o estabelecimento deste, segundo Almeida (2007, p. 09), estas velocidades elevadas do fluido acabam estimulando o crescimento de biomassa em virtude do aumento do fluxo de substrato, gerando biofilmes mais lisos, menos espessos, compacto e com maior porosidade.

E quando ocorre a presença de velocidades baixas, sob elevadas concentrações de substrato, o biofilme torna-se espesso induzindo ao aparecimento de zonas inativas pela dificuldade de transferência de massa. Tal fato favorece o destacamento de parte destes (ALMEIDA, 2007, p. 09). Ambos os processos podem ter ocorrido dentro dos reatores em estudo durante sua operação, sendo este um dos fatores responsáveis pelo controle e desenvolvimento do biofilme.

O processo de adesão microbiana, é um processo natural, visto como uma estratégia dos organismos presentes nos reatores de forma dispersa de se protegerem (LUCCHESI, 2012, p. 32; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999, p. 1318). Porém esta adesão não ocasiona a estes organismos apenas vantagens, há também alguns prejuízos que podem sofrer como por exemplo o desvio de substrato para a produção dos EPS em detrimento a produção de células, quando o meio em que estes organismos encontram-se, contem alguma característica desfavorável ao desenvolvimento deste, como um fluxo de ar elevado.

O fluxo de ar inserido nos reatores era elevado, fazendo com que houvesse um movimento intenso do material suporte, isto pode ter sido um fato que veio a prejudicar o desenvolvimento e formação do biofilme.

5.3.2 Microscopia: Análise dos organismos presentes no material suporte e nas lâminas de vidro

5.3.2.1 Exame a fresco

Foram realizadas análises a fresco tanto do material contido na espuma de poliuretano quando nas lâminas presentes no fundo dos reatores.

Durante estas análises foram observados a presença de representantes do Filo *Protozoa* (Classe: flagelados; Ciliata e ameboides), Filo *Metazoa* (Classe Rotifera: rotíferos; Classe Nematoda: vermes), e bactéria (filamentosas e com os seguintes arranjos: sarcinas, bacilos delgados com bordas arredondas e diplococos).

Na Figura 14 e 15 são apresentadas algumas fotos dos micro-organismos observados tanto no material suporte (Figura 14), quanto nas lâminas de vidro (Figura 15).

Não foi observada diferença entre os organismos encontrados no material a fresco proveniente do RBS1 e RBS2, sendo que todos os micro-organismos observados em um reator foram observados no outro, com a mesma frequência. Isto ocorreu tanto para o material proveniente do material suporte quanto para a lâmina.

A observação da microbiota vem novamente confirmar a hipótese levantada anteriormente de que a inserção dos EM's no RBS1, não interferiu de maneira significativa neste, a ponto de surgir diferenças observadas nos organismos presentes no meio e no material suporte.

De acordo com Vazzoler (1996), a utilização da avaliação dos tipos de organismos existentes em biorreatores é importante, uma vez que, as análises dos organismos presentes podem revelar-se como bons indicadores das condições de operação do sistema, visto que o desenvolvimento destes organismos depende do nível de depuração deste, concentração de OD e com a presença de substâncias tóxicas.

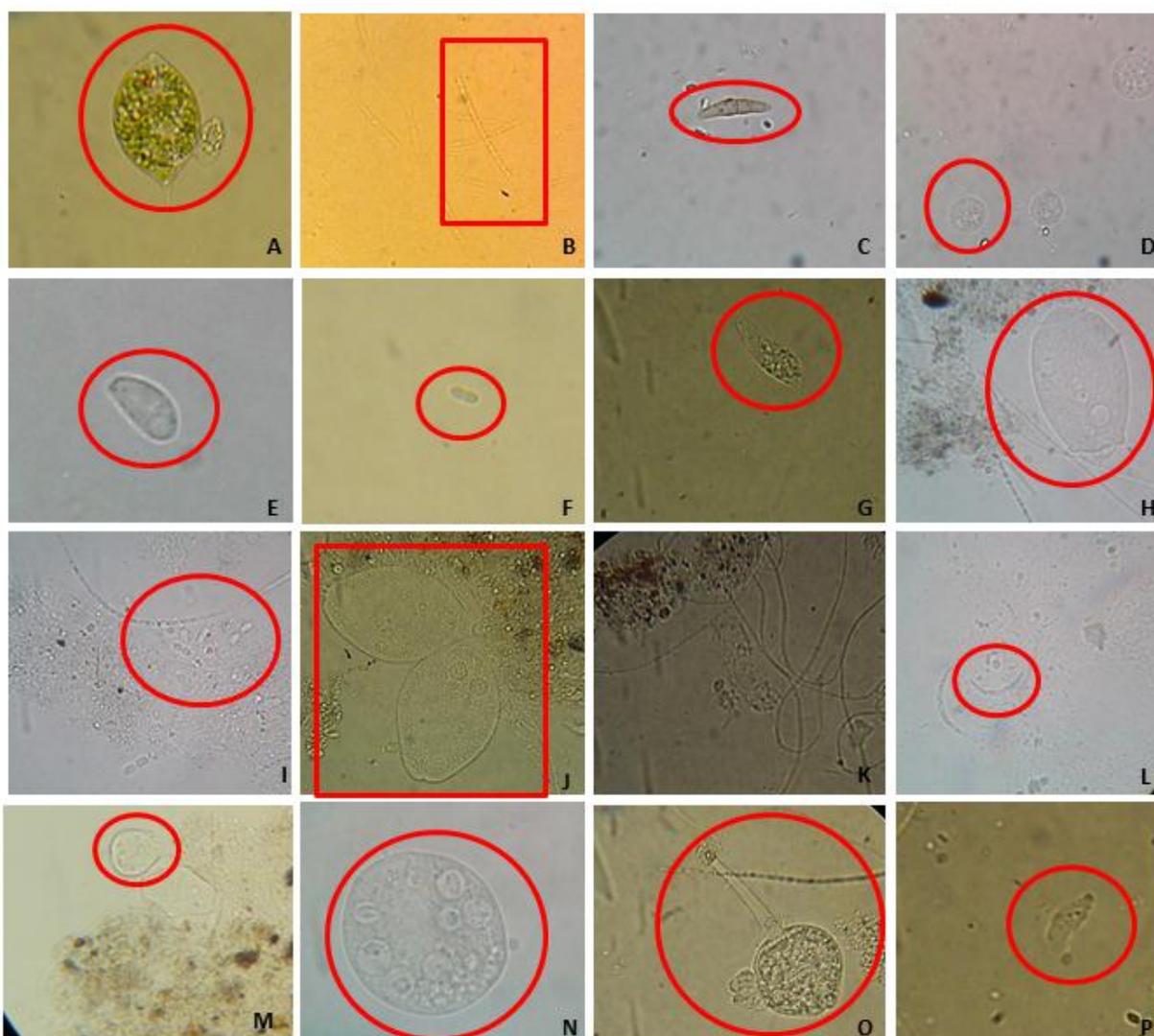


Figura 14 - Organismos presentes nas espumas de poliuretano de ambos os reatores observados em microscópio ótico (Aumento de 1000x).

Legenda:

A – Organismo não identificado	B – bacilos delgados com bordas arredondas	C - Diatomeácea	D – Organismo não identificado
E – Rotífero	F – Diplobacteria	G – Protozoário Ciliado livre	H- Protozoário Ciliado livre
I – Bactérias com arranjo de Diplococos	J – Protozoário ciliado fixo	K – Bactérias filamentosas	L - Não identificado
M – Rotífero	N – Ameboide	O – Protozoário ciliado fixo	P - Ameba

Fonte: Autoria própria.

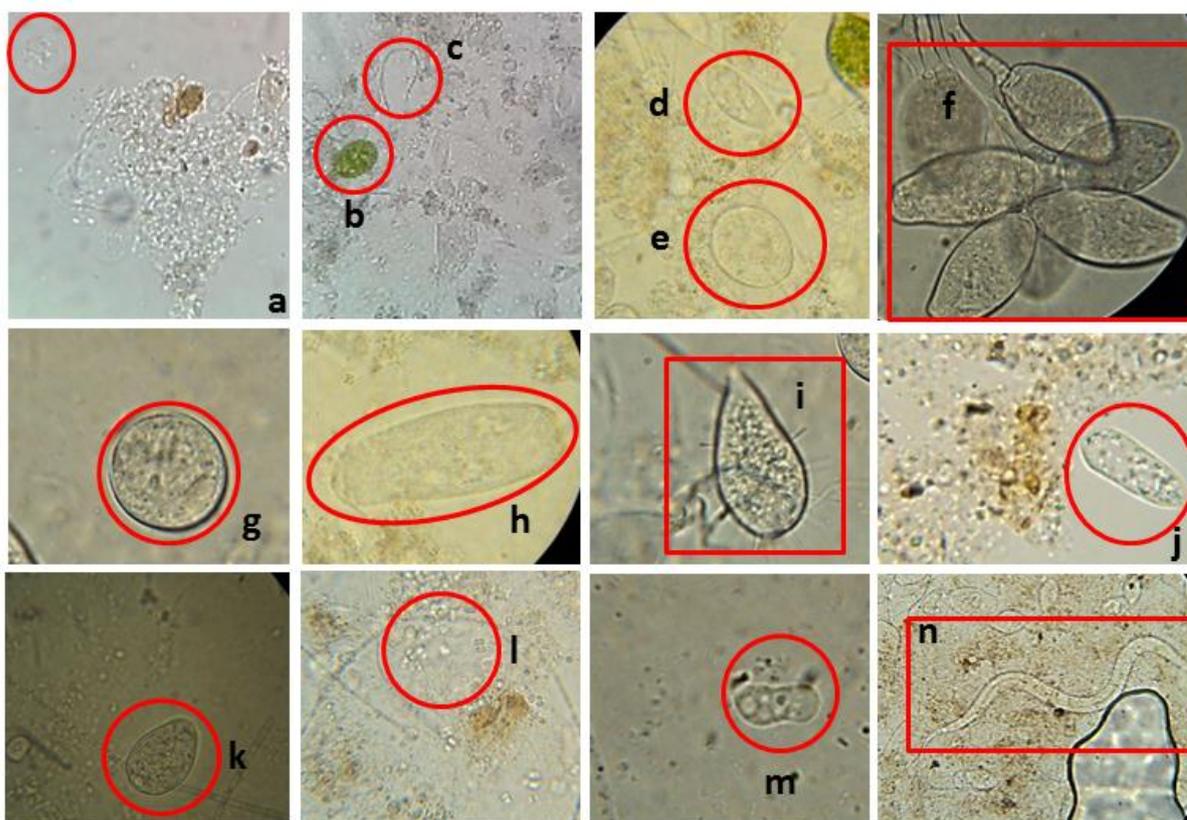


Figura 15 - Organismos presentes nas lamínas de vidro situadas no fundo de ambos os reatores observados em microscópio ótico (Aumento de 100x, exceto para n que foi 10x).

Legenda:

a – Organismo não identificado	b- Microalga	c – Bactéria filamentosa	d- Rotífero
e- Protozoário ciliado livre	f- Protozoário ciliado fixo	g- Ameboide (possivelmente Tecameba)	h- Protozoário Ciliado livre
i- Protozoário ciliado livre	j- Protozoário Ciliado livre	k- Protozoário Flagelado	l- Bactérias com arranjo de Diplococos
m- Ameba		n- Nematóide	

Fonte: Autoria própria.

Utilizando os organismos presentes nas lâminas acondicionadas no fundo dos reatores foi possível realizar uma análise das características do sistema. Como exposto no Quadro 04, a primeira lâmina a ser analisada foi com um tempo de operação dos reatores de 8 horas. Neste ponto os principais organismos observados foram: Figura 15 a, b, k e l, porém observou-se também organismos parecidos com o tipo Figura 15d.

Agra (2009, p. 69) trabalhando com um reator com biomassa aderida observou que os maiores valores de DQO no efluente foram encontrados durante o período de aclimatização dos organismos. Neste tempo de aclimatização o referido autor encontrou em suas análises predomínio de organismos flagelados, o que indica um lodo jovem, e menor predomínio de ciliados.

Nesta primeira análise como exposto acima foi observado alguns rotíferos (Figura 15d). Estes organismos tem papel importante, no sistema de tratamento, visto que a sua presença indica boa eficiência do processo de depuração biológica, pois são muito eficientes no consumo de bactérias e matéria orgânica (Agra, 2009, p. 74).

A segunda análise foi realiza com 152 horas de operação dos reatores (6 dias), sendo que neste momento foi observada grande diversidade na microbiota existente neste, como muitos organismos do tipo apresentado nas Figura 15c, d, e, g, h, i, j e m.

Callado e Foresti (2008) trabalhando com um sistema composto com 3 reatores em sequencia um aeróbio/anaeróbio/aeróbio, encontrou em suas análises microbiológicas nos reatores aerados organismos parecidos com o do tipo mostrado na Figura 15g. Estes autores relatam que encontrar este tipo de micro-organismos em um sistema, indica que o mesmo estava operando em boas condições de depuração.

Este organismo apresentado na Figura 15g, segundo Agra (2009, p. 72), é indicador de boas condições de nitrificação e depuração, surgindo em efluentes de boa qualidade e elevada concentração de oxigênio.

Com 368 horas de operação (15 dias) foi observado a predominância de organismos do tipo mostrado na Figura 15f, além de todos os outros já observados. E após 608 horas de operação (25 dias) foi observado organismos do tipo visualizado na Figura 15n. Segundo Vazzoler (1996) a presença destes metazoários indica boa eficiência do sistema, sendo a sua existência destes ligada a bons sinais de depuração.

Branco (1967, p. 134) traz que o desenvolvimento das populações de protozoários, em relação ao processo de estabilização pode ser visualizado por meio de curvas típicas (Figura 16).

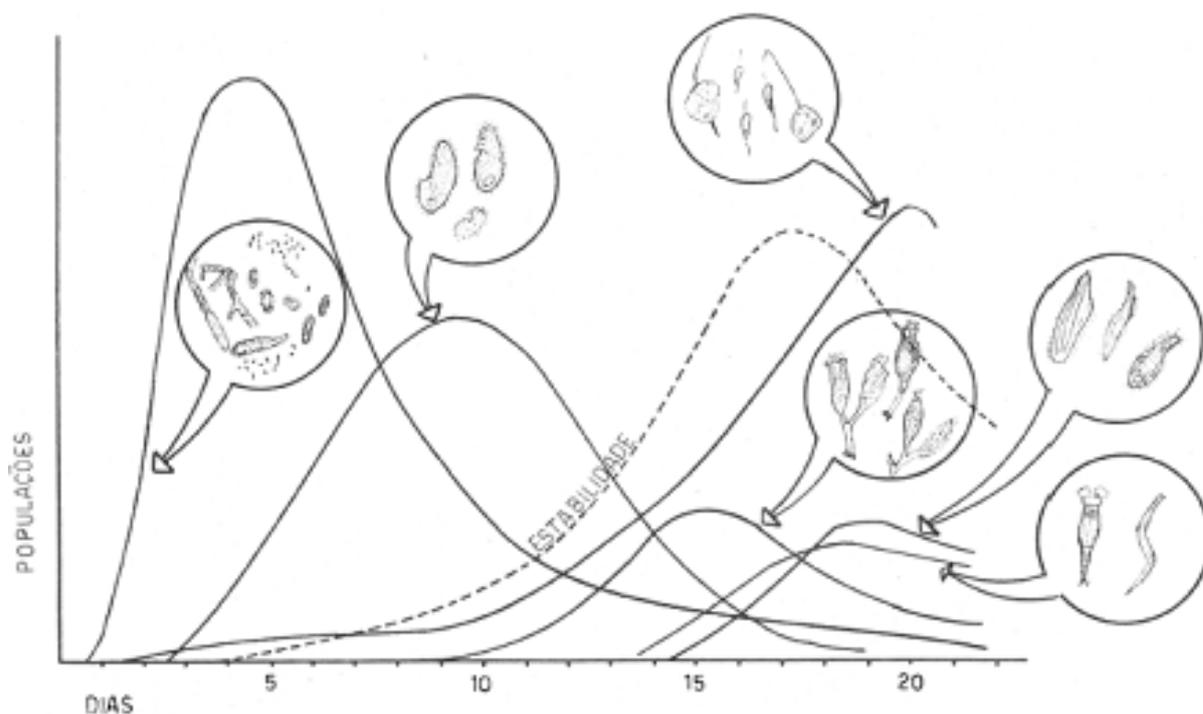


Figura 16 - Curva das populações de micro-organismos em relação ao tempo de aeração e a estabilização da matéria orgânica.
Fonte: BRANCO (1967, p. 135).

Segundo Branco (1967, p. 134) o primeiro grupo a ser visualizado desde os primeiros dias de aeração são os protozoários flagelados, que se alimentam da matéria orgânica presente no efluente. Estes organismos atingem o seu maior número por volta do 7^o dia de aeração, aumentando ainda seu número lentamente até o 15^o dia.

A partir do momento em que o meio torna-se rico em bactérias, e o pH começa a elevar-se, principia-se uma intensa proliferação de ciliados de locomoção muito rápida, atingido sua população máxima no 11^o dia de aeração.

Quando é observado no sistema um grande desenvolvimento de ciliados fixos, é possível observar também um grande número de rotíferos.

Quanto aos microinvertebrados como os nematoides de vida livre, estes são observados pela primeira vez segundo Branco (1967, p. 136), a partir do 13^o e 14^o dia.

Nicolau et al. (1996) também traz um gráfico, que demonstra a dinâmica das populações de lodos ativados, em estações de tratamento biológico. O autor mostra, as mesmas considerações apresentadas por Branco (1967) para cada grupo de organismos e o período de operação dos reatores em que estes provavelmente devem aparecer (Figura 17).

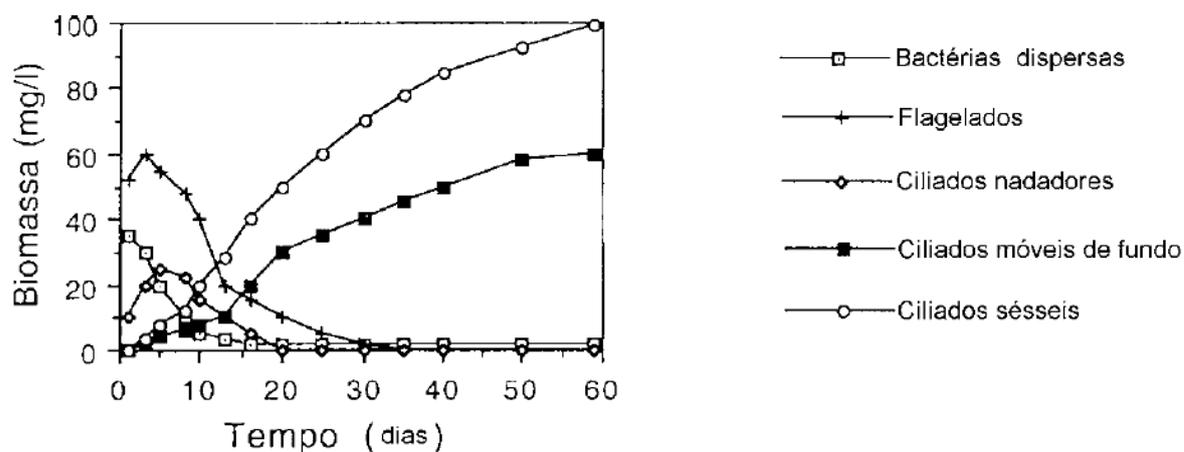


Figura 17 - Dinâmica de colonização de lodos ativados em estações de tratamento biológico de águas residuais desde o início do seu funcionamento.
 Fonte: NICOLAU et al. (1996, p. 665).

Observando a Figura 16, e os organismos encontrados no sistema trabalhado neste experimento, nota-se que de certa forma todos os organismos vistos apareceram no momento indicado por Branco (1967) e Nicolau et al. (1996), indicando que o sistema funcionou de maneira esperada, segundo os dados levantados na literatura.

5.3.2.2 Coloração de Gram

Da coloração de Gram das amostras retiradas da espuma de poliuretano dos reatores foi observado um grande diversidade de bactérias (Figura 18) entre elas: cocos Gram positivas e negativas, bacilos Gram positivos e negativos, estreptococos e estreptobacilos Gram positivos e negativos e bactérias filamentosas, com predominância nos reatores de estreptobacilos e estreptococos Gram negativos.

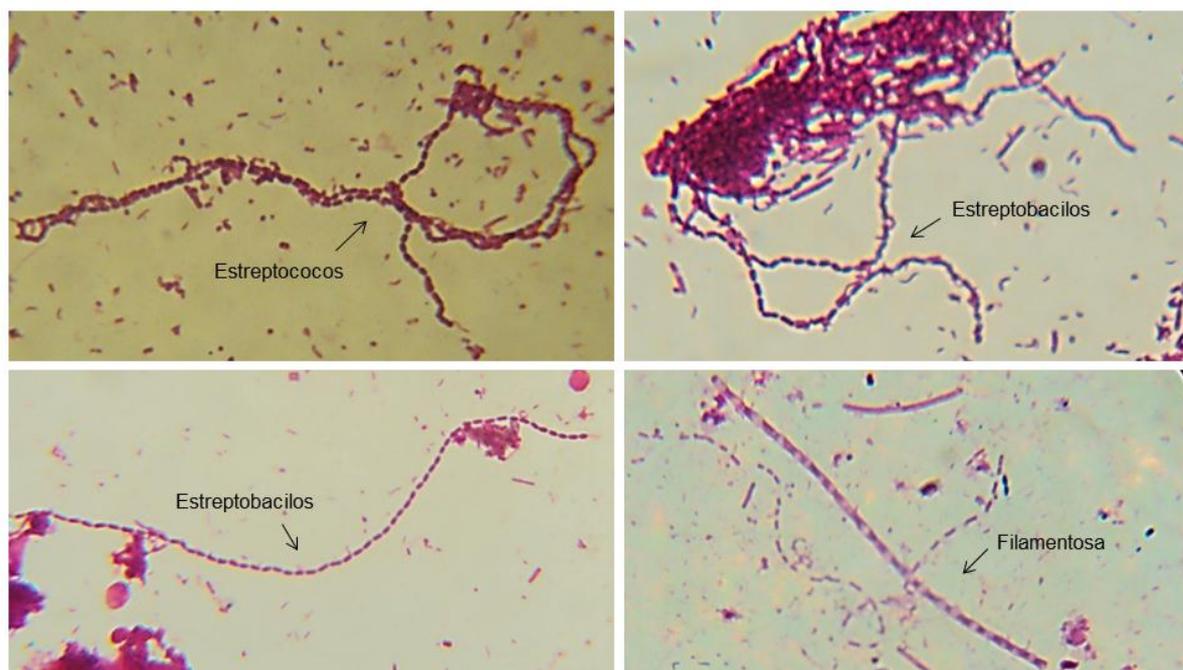


Figura 18 - Diversidade de morfológica encontrada nas lâminas com coloração de Gram (objetiva de 1000x).

Fonte: Autoria própria.

Jacobs (2012, p. 05), trabalhando com um reator em batelada sequencial aerado, tratando efluente suíno, utilizando como material suporte espuma de poliuretano também encontrou morfologias semelhantes às observadas neste estudo.

5.3.3 Caracterização dos EM's e bactérias heterotróficas: Análises das características macroscópicas (culturais) e microscópicas (morfológicas)

5.3.3.1 Bactérias Fermentadoras de lactose

Nas análises realizadas para as colônias de bactérias fermentadoras de ácido láctico, foi observado que não houve diferença macroscópica entre as colônias cultivadas tanto nos EM's inoculados no RBS1, como para o esgoto sanitário quanto para o material proveniente da espuma de poliuretano, sendo encontradas cerca de 25 colônias diferentes no total (Figura 19).

Fazendo uma análise apenas das placas inoculadas com as amostras de biofilme de ambos os reatores – RBS1 e RBS2, foi observado que também não houve diferença macroscópica em ambos os ambientes.

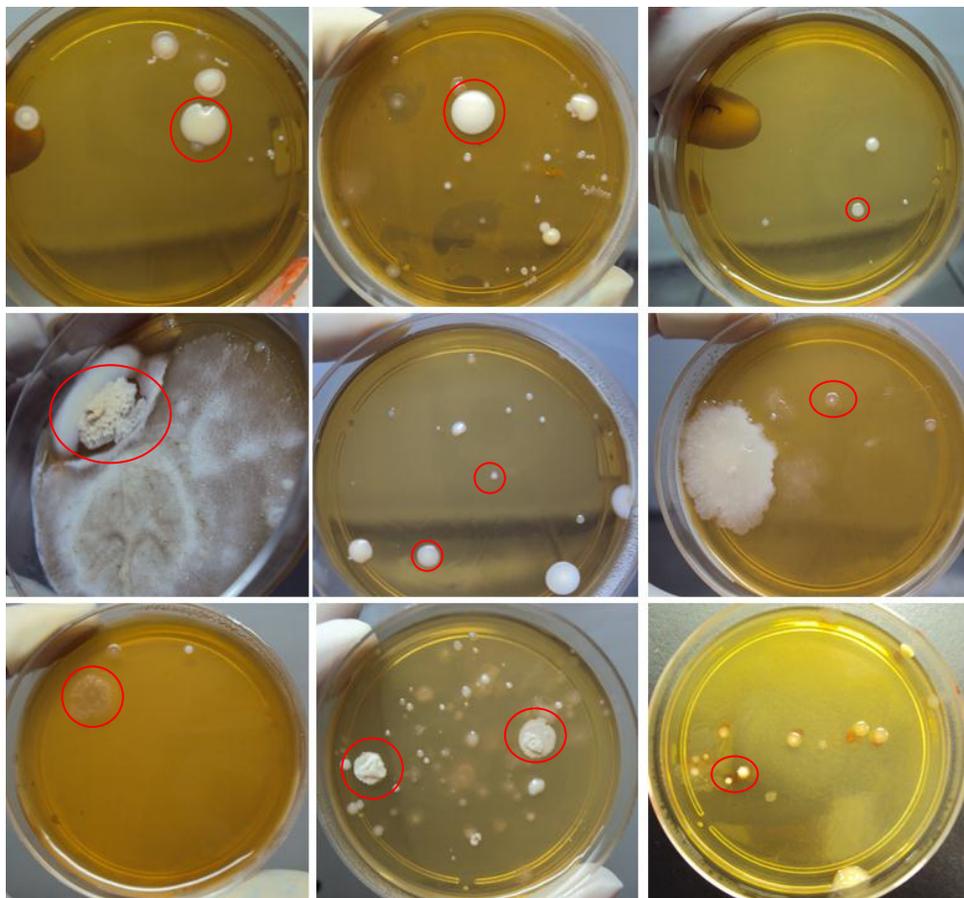


Figura 19 - Imagem de algumas das diferentes colônias de bactérias fermentadoras encontradas.
Fonte: Autoria própria.

Das colônias escolhidas para realização da análise morfofotintorial a coloração de Gram, todas as bactérias observadas apresentaram-se Gram positivas (Figura 20). Hall, Ledenbach e Flowers (2001) trazem que as bactérias lácticas apresentam-se na forma de bastonetes ou cocos Gram positivos.

Estas mesmas colônias utilizadas para coloração, foram utilizadas para o teste de catalase, sendo que todas apresentaram prova de catalase negativa, ou seja, não apresentaram formação de bolhas após a adição de peróxido de hidrogênio 3%.

Andreoli (2009, p. 54), trabalhando com este grupo de organismos, considerou que apenas os organismos que apresentaram coloração de Gram

positiva e teste de catalase negativa, pertenciam a grupo das bactérias lácticas. Levando em consideração o trabalho da referida autora, podemos concluir que os organismos trabalhados em sua maioria pertenciam ao grupo dos organismos de interesse.

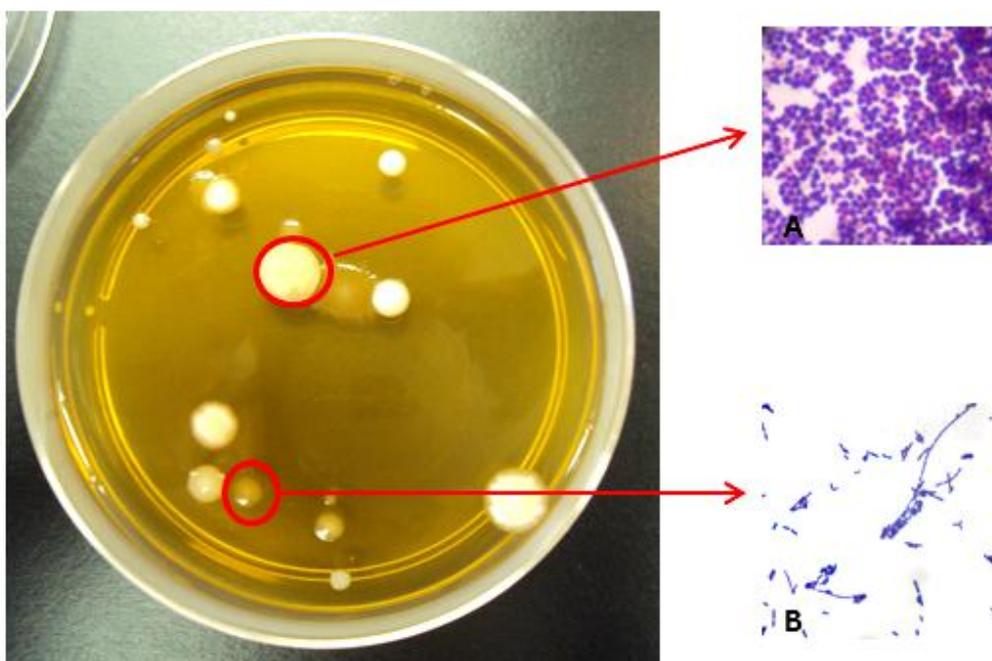


Figura 20 - Imagem de duas das colônias escolhidas para realização da coloração de Gram e suas respectivas morfologias.

Legenda:

A: Esfregaço em lâmina corado evidenciando cocos Gram positivos.

B: Esfregaço em lâmina corado evidenciando bacilos Gram positivos.

5.3.3.2 Leveduras

Este grupo apresentou-se com elevada diversidade, sendo observadas nas análises realizadas todas as colônias apresentadas pelo projeto da Fundação Elídio Pinho (2013).

No caso destes organismos foi visualizada certa divergência na observação macroscópica das colônias encontradas nos EM's inoculados, no esgoto sanitário e nas amostras da espuma. No meio inoculado com a concentração do EM inserido no RBS1, foi observado à predominância de colônias com forma, margem e textura

filamentosa, superfície peluda e elevada (1) (Figura 21); colônia pequena com forma circular, regular e transparente (2) (Figura 21) e colônia circular pequena, com formato regular e textura cremosa e esbranquiçada (3) (Figura 21).

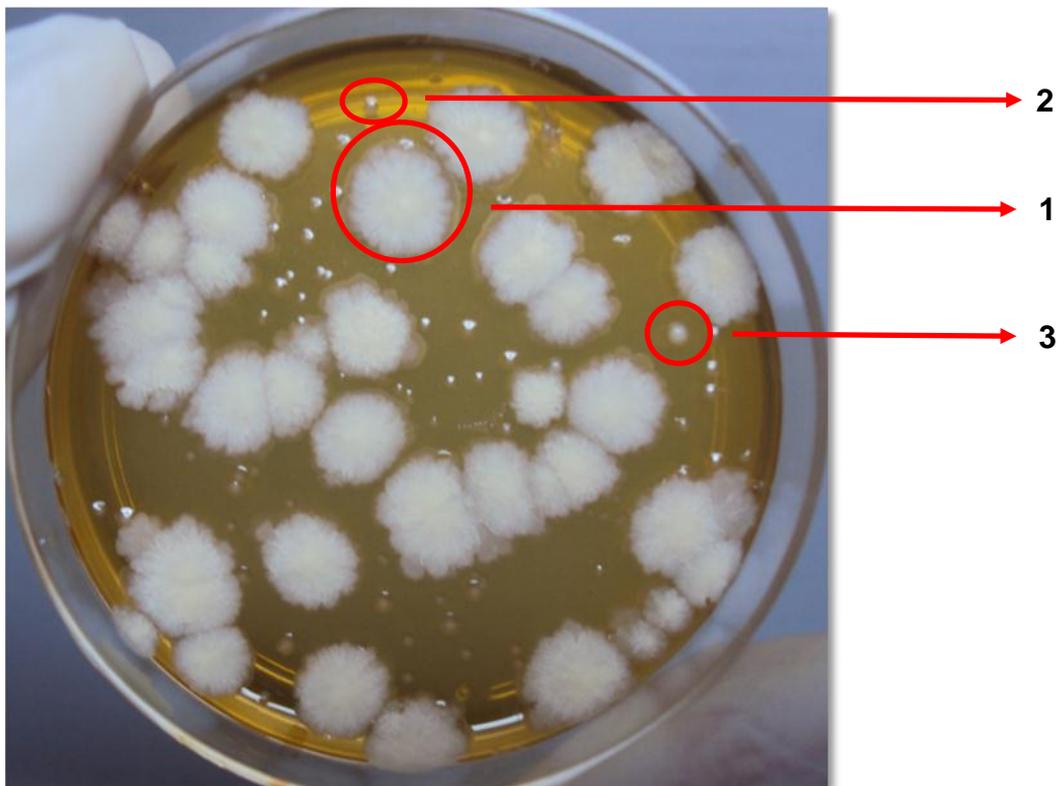


Figura 21 - Morfologia das colônias observadas na caracterização das leveduras para o grupo dos EM's inseridos no Reator.

Legenda:

- 1- colônias com forma, margem e textura filamentosa, superfície cotonoso e elevada;
- 2 – Colônias circular pequena com forma circular, regular e transparente;
- 3 – Colônias circular pequena, com formato regular e textura cremosa e esbranquiçada.

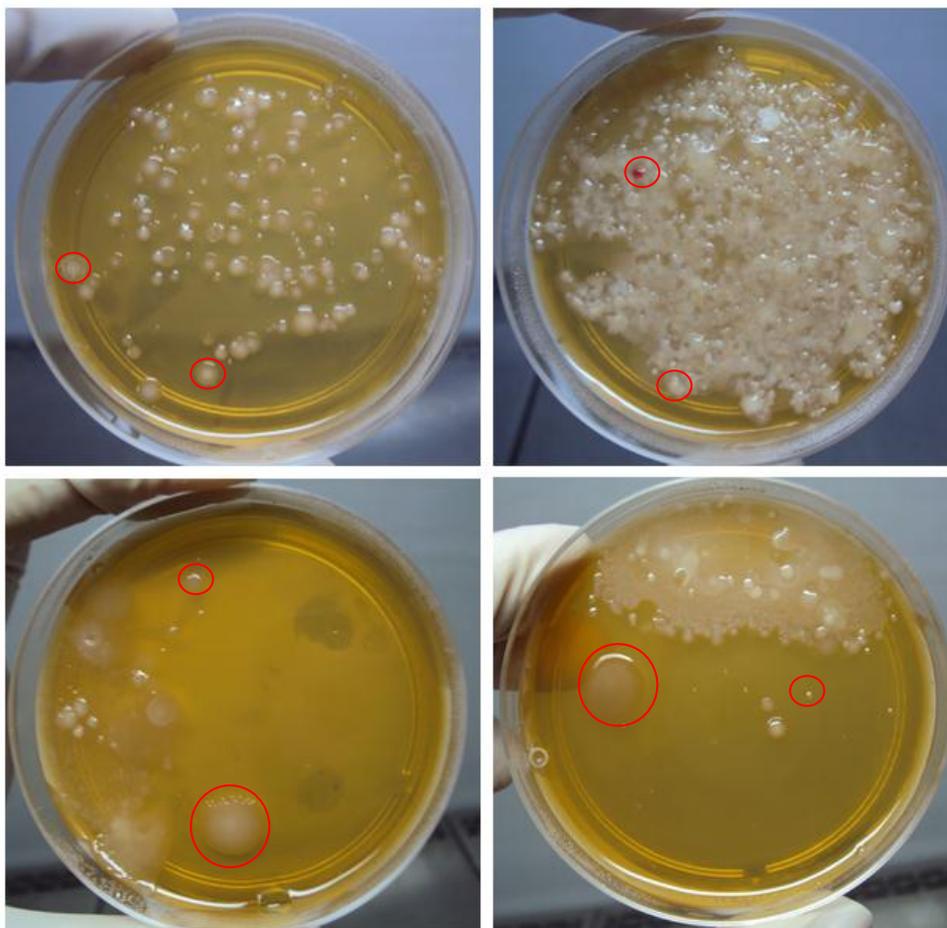
Fonte: Autoria própria.

Os organismos que cresceram nas placas inoculadas com esgoto sanitário e amostras do biofilme dos reatores apresentaram a mesma característica cultural macroscópica, sem predominância de nenhuma forma.

Já comparando as colônias observadas nas placas com amostras dos EM's inoculados no RBS1 com as que continham amostras do esgoto sanitário e amostras de biofilme, observou-se diferença nas colônias cultivadas, pois não foi visualizado em nenhuma destas ultimas – placas contendo amostras de esgoto sanitário e biofilme, o tipo colonial predominante na análise realizada para os EM's (colônia 1 com forma, margem e textura filamentosa, superfície cotonosa e elevada – Figura 21) foi observada.

Realizando análise somente das placas inoculadas com as amostras advindas da espuma do RBS1 e RBS2, observou-se o mesmo caso ocorrido para as bactérias fermentadoras, onde não foi observada diferença morfológica entre os organismos cultivados em ambos.

Na caracterização realizada para este grupo foram reconhecidas cerca de 45 colônias diferentes (Figura 22).



**Figura 22 - Imagem de algumas das diferentes colônias de leveduras em meio YPD.
Fonte: Autoria própria.**

Foram escolhidos 6 colônias diferentes para realização das análises morfo-tintoriais. As colônias foram coloridas com Azul de metileno, e observadas em microscópio ótico, não sendo visualizada diferença morfológica entre estas (Figura 23).



Figura 23 - Imagem de 3 das 6 colônias escolhidas para realização da coloração com azul de metileno das colônias de leveduras em meio YPD.

Segundo dados do Departamento de microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (2013), as leveduras apresentam características esféricas ou ovais, reproduzindo-se por brotamento e formando colônias pastosas ou cremosas, o que foi observado nas análises realizadas.

5.3.3.3 Actinomicetos

Na caracterização realizada para este grupo não foram identificadas muitas colônias com diferentes características. Porém como para o grupo das leveduras estes apresentaram colônias diferentes entre as amostras analisadas do esgoto sanitário, biofilme e do EM inoculado no RBS1.

Nas placas inoculadas com amostras dos EM's foi observado a predominância de colônias redondas, regulares e pequenas, com coloração esbranquiçada (Figura 24).

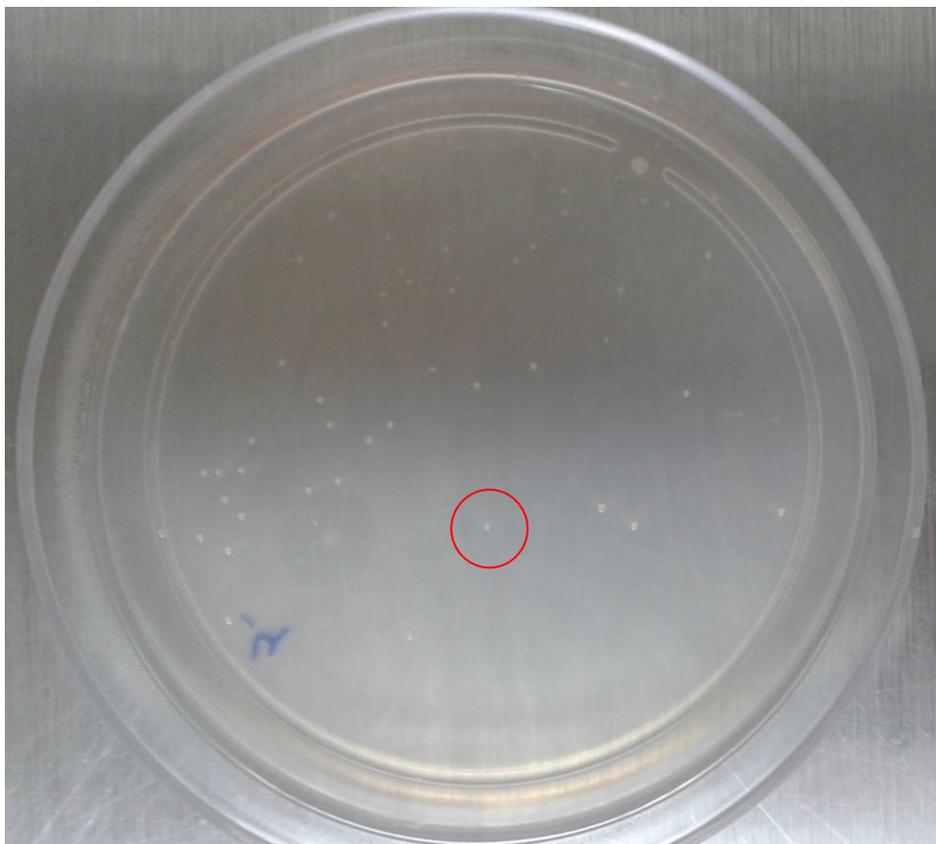


Figura 24 - Colônias de actinomicetos predominantes nas placas inoculadas com EM's provenientes da amostra que foi inoculado no RBS1.
Fonte: Autoria própria.

Já para as amostras de efluente e do biofilme não foi observado predominância de nenhum tipo de colônia. Como nos casos anteriores de caracterização macroscópica entre os reatores – RBS1 e RBS2 não foi possível observar nenhuma diferença entre as colônias cultivadas do material advindo da espuma de ambos os reatores operados.

No total foram observadas cerca de 30 colônias diferentes. Na Figura 25 são apresentadas as predominantes. Ensign (1978) traz que a diversidade morfológica dos actinomicetos pode ser explicada pelas suas técnicas de reprodução que conduzem a formação de uma variedade de estruturas de esporos.

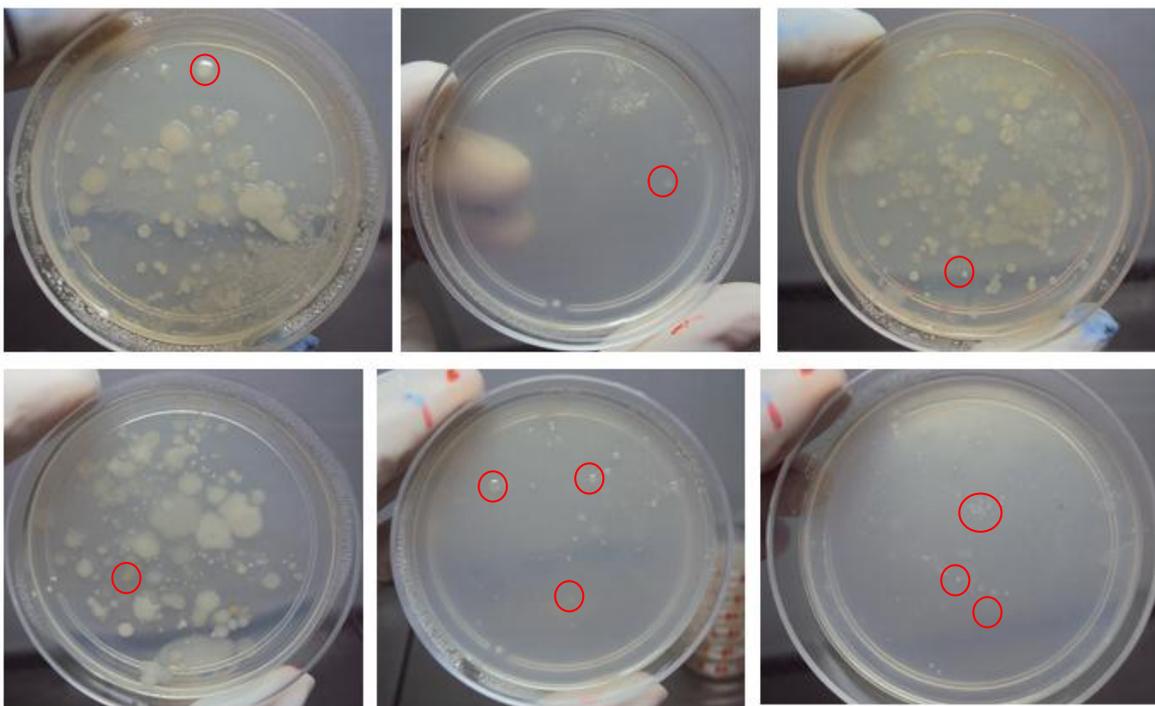


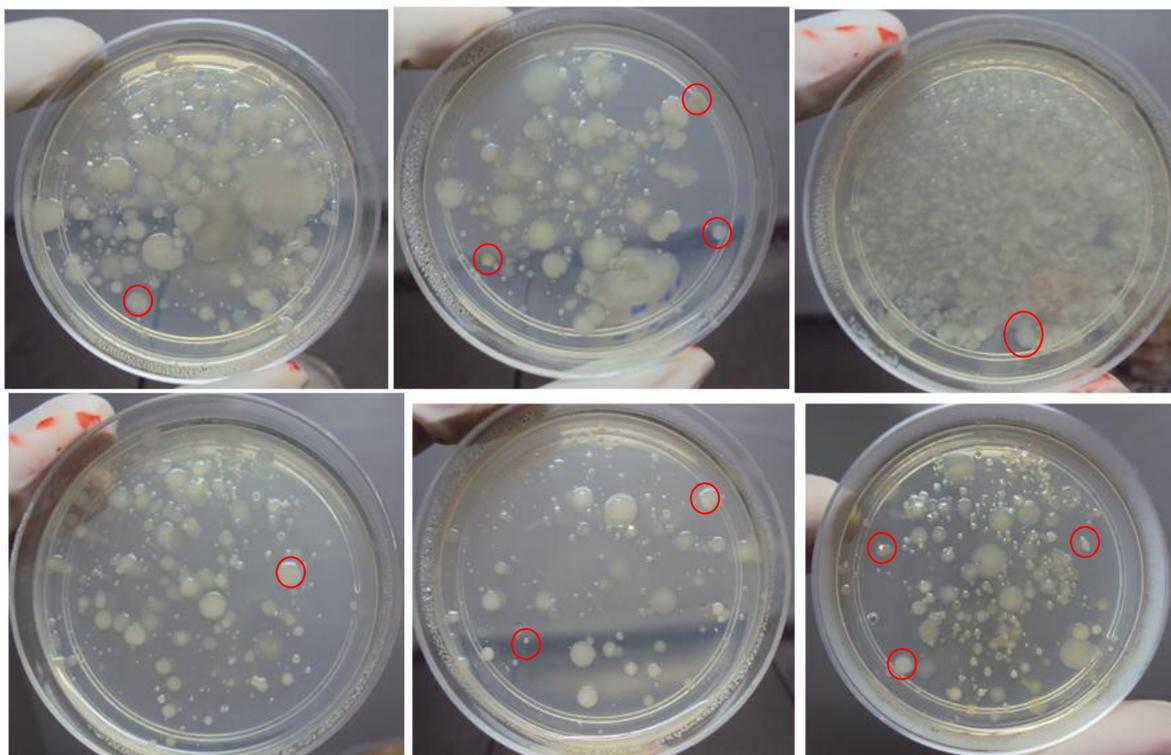
Figura 25 - Algumas das colônias de actinomicetos observadas.
Fonte: Autoria própria.

Como para as leveduras foram escolhidas 6 colônias diferentes para a realização da coloração de Gram dos actinomicetos, os resultados indicaram que os organismos cultivados eram Gram positivos, resultado semelhante ao obtido por Oliveira (2003).

5.3.3.4 Bactérias heterotróficas

Na caracterização morfológica realizada para as bactérias heterotróficas não foi perceptível nenhuma diferença entre as colônias encontradas na amostra de EM's, esgoto sanitário e biofilme. O mesmo aconteceu com a análise realizada entre as placas inoculadas com material aderido na espuma de poliuretano do RBS1 e RBS2, sendo que não foi visualizada nenhuma diferença entre as morfologias presentes nas mesmas, nem predominância de nenhum tipo morfológico em ambos.

Este grupo apresentou cerca de 40 colônias diferentes (Figura 26).



**Figura 26 - Imagem de algumas das colônias de bactérias heterotróficas em meio PCA.
Fonte: Autoria própria.**

Segundo Oliveira (2012) a diversidade de bactérias heterotróficas encontradas aderidas no material suporte indica que estes grupos estão desenvolvendo em maior número no meio líquido, e que apresentam maiores velocidades específicas de crescimento.

6 CONCLUSÃO

Dos resultados conclui-se que a concentração de EM's inseridas no RBS1 não foi suficiente para que fosse possível observar qual a influencia que os EM's poderiam exercer na formação de um biofilme.

Constatou-se que os micro-organismos do grupo dos EM's e bactérias heterotróficas, presentes nos reatores, foram capazes de formar biofilme desde as primeiras horas de operação do sistema e que os parâmetros físico-químicos (pH e temperatura) e operacionais do sistema (aeração e TDH) possivelmente interferiram no desenvolvimento destes organismos.

Não foi observada diferença entre os organismos observados no material a fresco de ambos os reatores (protozoários, rotíferos e bactérias), e a presença destes ao longo do tempo, indicaram que o sistema funcionou de maneira eficiente.

Quanto às análises macroscópicas realizadas tanto para o grupo dos EM's quanto para as bactérias heterotróficas, foi possível concluir que havia em ambos os reatores diversidade em todos os grupos analisados.

REFERÊNCIAS

AGRA, Clélia de A. **Tratamento de águas residuárias domésticas em reatores de biomassa dispersa e biomassa aderida**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande. Disponível em: <http://www.prrg.ufpb.br/prodema/novosite/smartgc/uploads/arquivos/clelia_agra.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2013.

ALMEIDA, Aurélia. de O. **Reator com leito de biomassa aderida aerado parcialmente aplicado ao tratamento de esgoto sanitário**. 2010. 158 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-13072010-141158/en.php>>. Acesso em: 18 Jan. 2012.

ALMEIDA, Paulo. G. S. de. **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**. 2007. 156 f. Tese (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ALVES, M. Madalena, et al;. A new device to select microcarriers for biomass immobilization: application to an anaerobic consortium. **Water Environment Research**.v.2, n. 71, p. 209-217, 1999. Disponível em: <[http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/1315/1/1999-01\[1\].pdf](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/1315/1/1999-01[1].pdf)>. Acesso em: 09 abr. 2013

ANDREOLI, Priscila Albuquerque. **Perfil bacteriológico e determinação da atividade de água de salame tipo italiano em três formas de comercialização no município de Niterói –RJ**. 2009, 107f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2009. Disponível em: <http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/priscila_andreoli.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2013.

ANTONIOLLI, Carmen; MONTEGGIA, Luiz O. Otimização Do Tratamento De Efluentes Em Indústrias De Triparia, Baseado No Reator Sequencial Em Batelada (Sbr). In: Congresso brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19, 1997, Foz do Iguaçu, **Anais...**, Foz do Iguaçu: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1997, p. 742-756. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPDISCA&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=88130&indexSearch=ID>>. Acesso em: 18 Jan. 2013.

APHA, **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. Ed. Washington: American Public Health Association, 2012.

ARAUJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: Melo, I,S; Azevedo, J. L. Ecologia microbiana, Jaguariúna: Embrapa, 1998, p. 351-367.

ARAUJO, Weliton. E. de L. de.; PASQUALETTO, Antônio. **UTILIZAÇÃO DE ALGAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DOMÉSTICO**. Goiânia, 2005. Disponível em: <<http://www.pucgoias.edu.br/ucg/prope/cpgss/ArquivosUpload/36/file/UTILIZA%C3%87%C3%83O%20DE%20ALGAS%20NO%20TRATAMENTO%20DE%20EFLUENTE%20DOM%C3%89STICO.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2013.

BOARI, Cleube A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n. 4, p. 886-895, out-dez 2009, ISSN 0101-2061. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n4/29.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2012.

BONFIM, Filipe P. G. et al. **CADERNO DOS MICRORGANISMOS EFICIENTES (EM)**. 2011. Disponível em:< <http://www.sunnet.com.br/biblioteca/livros-e-textos/caderno-dos-mcrganismos-eficientes.pdf> >. Acesso em: 18 Jan. 2013.

BRANCO, Samuel Murgel. A dinâmica de populações microbiológicas na estabilização aeróbia de resíduos orgânicos de fecularias de mandioca. **Rev. Saúde públ.** v.1, n. 2, p. 126 – 140, dez 1967.

CALLADO, Nélia Henriques., FORESTI, Eugenio. Tratamento de esgoto doméstico com remoção de nitrogênio e fósforo em reatores sequenciais em bateladas. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Fermentação de comidas: papel dos micro-organismos na preservação e produção de alimentos. **International Journal of food Microbiology**. V. 50, p. 131-149, 1999.

CHAVES, Lúcia. da C. D. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Escola de Engenharia, Escola do Minho, 2004. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/925/1/Tese%20Completa.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

LEE, Jintae,;CHO, Moo Hwan. Removal of nitrogen in wastewater by polyvinyl alcohol (PVA)-immobilization of effective microorganisms. **Korean j. Chem. Eng.** 27(1), p. 193-197, 2010.

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: 18 Jan. 2014.

COLARES, C. J. G., SANDRI, D., **EFICIENCIA DO TRATAMENTO DE ESGOTO COM TANQUES SÉPTICOS SEGUIDOS DE LEITOS CULTIVADOS COM DIFERENTES MEIOS DE SUPORTE.** *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, v. 8, n.1, 2013.

CONAMA 430. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/propresol_lanceflue_30e31mar11.pdf>. Acesso em: 14 Dez. 2013.

CONAMA 357. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 14 Dez. 2013.

CORREA, Camila Zoe; PRATES, JACOBS, Ana Carolina Pieroti; PRATES, Kátia Valeria Marques Cardoso; RANA, Bruna de Souza; Marchioni, Marcos Antonio. **CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE BIOFILMES FORMADOS EM LAMÍNULAS DE VIDRO E ESPUMA DE POLIURETANO.** **Anais: XVII Seminário de Iniciação Científica e tecnológica da UTFPR, Curitiba, 2012.**

COSTERTON, P.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science, New Series**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, maio 1999. Disponível em: < <http://www.jstor.org/discover/10.2307/2899085?uid=3737664&uid=2134&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21102473490501>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

CYBIS, Luiz F. de A.; SANTOS, Altamar V. dos; GEHLING, Gino R. Eficiência do reator sequencial em batelada (rsb) na Remoção de nitrogênio no tratamento de esgoto sanitário com DQO baixa. **Eng. sanit. Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 260-264, jul-set 2004. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/esa/v9n3/v9n3a12.pdf> >. Acesso em: 18 jan. 2013.

DANIEL, Leonidia M. de C. **Remoção De Nitrogênio Via Nitrito Em Reator Operado Em Bateladas Sequenciais Contendo Biomassa Imobilizada E Aeração Intermitente**. 2005, 116f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005. Disponível em: <http://biblioteca.universia.net/htML_bura/ficha/params/title/remo%C3%A7%C3%A3o-nitrog%C3%AAnio-via-nitrito-em-reator-operado-em-bateladas-sequenciais/id/10257063.htML>. Acesso em: 18 jan. 2013.

DHAMNASKAR, R. S. Sustainable Treatment of Tannery Waste Water By Effective Microorganism (Em) **Technology**. **International Referred Research Journal**, v. 3, fev. 2012. Disponível em: <http://www.ssmrae.com/admin/images/a02f0f8d9991c8f1db4b37c996045b96.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2013.

DORLAN, Rodney. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n. 9, p. 881 – 890, 2002. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/pdfs/02-0063.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

DREESZEN, Paula. H. Biofilme - A chave para compreender e controlar o crescimento bacterial em Sistemas de Água Potável Automatizados. **Biofilme – Edstrom**, 2 ed., p. 1-32, Jun. 2003. Disponível em: <<http://grupohumma.com.br/web/biblioteca/biofilme.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

ENSIGN, J. C. Formation, proprieties, and germination of actinomycetes spores. **Annual review microbiology**, Boston, v. 32, p. 185-219, 1978.

FU, B., LIAO, X., DING, L., REN, H. Characterization of microbial community in an aerobic moving bed biofilm reactor applied for simultaneous nitrification and denitrification. **World J Microbiol Biotechnol**. vol. 26, p.1981–1990, 2010.

PEREIRA, M.O.B.O. **Comparação de eficácia de dois biocidas (Carbamato e glutaraldeído)em sistema de biofilme**, 150f, 2001. Tese (Doutorado) – Universidade do Minho, Braga, 2001.

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**. 2011, 109f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3147/tde-12122011-134438/pt-br.php>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

Fundação Ilídio Pinho. "Ciência na Escola". Leveduras. Disponível em: <<https://sites.google.com/a/dmaria.pt/extremofilos/home>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

FYNN, G. H.; WHITMORE, T. N. Retention of methanogens in colonised reticulated polyurethane foam biomass support particle. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 2, p 81-86, fev. 1984.

GARCIA, M. L. **Avaliação do suporte no desempenho de reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com agitação, contendo biomassa imobilizada no tratamento de esgoto sanitário**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Carlos, 2005.

GONÇALVES, Ricardo. F. et al. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores com biofilme. In: Prosab, cap. 04, p. 1 – 82, 2013. Disponível em: <<http://www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabCarlos/Cap-4.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

GOOGLE EARTH. Disponível em: <http://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/index.html>. Acesso em: 10 jun. 2012.

HIGA, Teruo. **THE TECHNOLOGY OF EFFECTIVE MICROORGANISMS – BENEFICIAL IMPACT ON GLOBAL ENVIRONMENTS**. 2013. Disponível em: <<http://www.dzumenvis.nic.in/pdf/effective%20microbes.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

HALL, P. A.; LEDENDACH, L.; FLOWERS, R. S. Produção de ácidos por microorganismos. In: Dowes, P. F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 4. Ed. Washington: APHA, 2001. 676p., cap. 19, p. 201-2015.,

HIGA, Teruo; PARR, James F. **BENEFICIAL AND EFFECTIVE MICROORGANISMS for a SUSTAINABLE AGRICULTURE AND ENVIRONMENT**. **International Nature Farming Research Center**. Japão, 1994. Disponível em: <<http://www.agriton.nl/higa.html>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

HIGA, Teruo; WOOD, M. **Effective Microorganisms for Sustainable Community Development: A National Case Study of Cooperation and Co-Prosperity in North Korea for the Preservation of Environmental, Agricultural, Economic, and Cultural Integrity**. SCD: Japão, 2013. Disponível em: <

<http://www.envismadrasuniv.org/pdf/Effect%20Microorganisms.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

IAMAMOTO, Cristina. Y. **Remoção de nitrogênio de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal em reator contendo biomassa em suspensão operando em bateladas sequenciais e sob aeração intermitente**. 2006. 157f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

IN-SITU Anaerobic Bio-remediation of Oily-Sludge at Large-Scale using EM Technology. Environmental Health Sciences Consultants, EM Research Organization, Generic proposal, mar. 2003, p. 1-13. Disponível em: < <http://www.emturkey.com.tr/TR/dosya/1-287/h/28-ehsc-generic-proposal.pdf> >. Acesso em: 18 jan. 2013.

JACOBS, Ana Carolina Pieroti; PRATES, Kátia Valeria Marques Cardoso; RANA, Bruna de Souza; Marchioni, Marcos Antonio; Correa, Camila Zoe. Estudo das Morfologias de micro-organismos presentes em um reator com biomassa aderida operado com efluente de abatedouro de suínos. **Anais: XVII Seminário de Iniciação Científica e tecnológica da UTFPR**, Curitiba, 2012.

JENKINSON, Haward. F.; LAPPIN-SCOTT, Hilary. M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 9-10, jan. 2001. Disponível em: < <http://www.cell.com/trends/microbiology//retrieve/pii/S0966842X00018916?returnURL=http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X00018916?showall=true> >. Acesso em: 15 jan. 2013.

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

LAMEGO NETO, Luiz G.; COSTA, Rejane H. R. da. Tratamento de esgoto sanitário em reator híbrido em bateladas sequenciais: eficiência e estabilidade na remoção de matéria orgânica e nutrientes (N, P). **Eng Sanit Ambient**, v.16, n.4, p. 411 – 420, out-dez 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/esa/v16n4/a13v16n4.pdf> >. Acesso em: 15 jan. 2013.

LAPA, K. R. **Avaliação de desempenho do reator anaeróbico em batelada sequencial (ASBR), contendo biomassa imobilizada em pedra pome, para tratamento de esgoto sanitário**. 120 f., 2003. Dissertação (Mestrado).- Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003. Disponível em: < www.tese.usp.com.br >. Acesso em: 10 jun. 2012.

LEITE, Alfredo. E. de B. **Simulação do lançamento de esgotos domésticos em rios usando um modelo de qualidade d'água, SisBAHIAR** ®. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: < <http://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/leiteaebm.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2013.

LIMA, Francisco Josivan de. et al., **AVALIAÇÃO DA EFICIENCIA NA REMOÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS VOLÁTEIS E DQO DE REATOR UASB EM FASE DE PARTIDA**. 2013. Disponível em: <>. Acesso em: 16 Dez. 2013.

LUCCHESI, Eliane. G. **Influência de diferentes materiais na formação e susceptibilidade de biofilmes a agentes antimicrobianos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012. Disponível em: < <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000840317>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

MACHADO, Sílvia. M. de O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005, 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária). Universidade do Minho. Disponível em: < <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3466/1/Tese%20Final.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

MADIGAN, Martinko.T. et al. **MICROBIOLOGIA DE BROCK**. 12 ed. 1160p. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAH, Thien-Fah C.; O'TOOLE, George. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **TRENDS in Microbiology**, v.9, n.1, Jan. 2001. Disponível em: < http://classes.biology.ucsd.edu/old.web.classes/bimm124.SP05/mechanisms_biofilm_resistance.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2013.

MAINS, Craig. Biofilm Control in Distribution Systems. **Tech Brief**, v. 8, n. 2, verão 2008. Disponível em: < http://www.nesc.wvu.edu/pdf/dw/publications/ontap/2009_tb/biofilm_DWFSOM124.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

MEIRELLES, Thais.; BANDEIRA, Virgílio. **Avaliação dos Efeitos da Tecnologia EM™ (EM•1®) na Eliminação de Maus Odores e no Desempenho e Eficiência de uma ETE Mista (DAFA e Lodo Ativado)**. 2013 Disponível em: <http://www.reboreda.es/Documentos/Tecnologia%20EM%20para%20Eliminar%20e>

%20Melhorar%20a%20Eficiencia%20em%20ETEs_cgi.pdf . Acesso em: 19 abr. 2013.

MELO, Luís. 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=2ZlanAslP9k52fd9Dn5jGmG422Q#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 18 jan. 2013.

_____. Biofilm physical structure, internal diffusivity and tortuosity. **Water Science & Technology**, v. 52, n. 7, p 77–84, 2005. Disponível em: < <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/257/2/11677.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

_____. **Tratamento Biológico de água e efluentes líquidos: Biomassa Fixa versus Biomassa em Suspensão**. Universidade do Minho, Braga. 1996. Disponível em:< <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/3994> >. Acesso em: 15 jan. 2013.

MISSAGIA, Beatriz. **Estudos das Comunidades Bacterianas em Filtros Biológicos Percoladores Utilizados para pós-tratamento de Efluentes e um reator UASB**. Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Tese (Doutorado em Saneamento), 2010. –Disponível em: < <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/ENGD-89WQGG/1/530d.pdf> >. Acesso em: 10 jun. 2012.

MIQUELETO, A. P. **Comportamento de reator anaeróbico operando em batelada sequencial, contendo biomassa imobilizada e submetido a aumento progressivo da concentração de substrato de fácil degradação**. 2003. 117f. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. Dissertação (Mestrado). 2003. 114 f.–. Disponível em: < http://www.paulorodrigues.pro.br/ojs/riap_teses/dissertacao_miqueleto.pdf >. Acesso em: 10 jun. 2012.

NAMSIVAYAN, S. K. R.; NARENDRAKUMAR, G.; KUMAR, A. Evaluation of Effective Microorganism (EM) for treatment of domestic sewage. **Journal of Experimental Sciences**, v. 2, n. 7, p. 30-32, 2011. Disponível em: < [http://www.google.com.br/#sclient=psy-ab&q=Evaluation+of+Effective+Microorganism+\(EM\)+for+treatment+of+domestic+sewage&oq=Evaluation+of+Effective+Microorganism+\(EM\)+for+treatment+of+domestic+sewage&gs_l=serp.3..0i30.1701.2127.0.3512.1.1.0.0.0.210.210.2-1.1.0....0.0..1c.1.20.psy-](http://www.google.com.br/#sclient=psy-ab&q=Evaluation+of+Effective+Microorganism+(EM)+for+treatment+of+domestic+sewage&oq=Evaluation+of+Effective+Microorganism+(EM)+for+treatment+of+domestic+sewage&gs_l=serp.3..0i30.1701.2127.0.3512.1.1.0.0.0.210.210.2-1.1.0....0.0..1c.1.20.psy-)>

ab.cdGoKsnD81k&pbx=1&bav=on.2,or.r_qf.&fp=b7639cdac02e71ab&biw=1366&bih=600&bvm=pv.xjs.s.en_US.MpiVkf51mpA.O>. Acesso em: 10 jan. 2013.

NICOLAU, A.; LIMA, N ; MOTA, M; MADONI, P. Os Protozoários como indicadores de qualidade biológica das lamas ativadas. **Boletim de Biotecnologia**, 1996.

OLIVEIRA, Karina. V. V. de. **Caracterização de comunidade microbiana em biofilme associado a filtro biológico para tratamento de efluente de aquacultura**. 2010. 100 f. Dissertação (Pós –Graduação em Engenharia Urbana) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufrgs.br/da.php?nrb=000760786&loc=2010&l=9e2d51bf2407a033>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

OLIVEIRA, Laurence. D. de. **AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO EM UM FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO ALIMENTADO COM EFLUENTE DE RALF**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Urbana) - Universidade Estadual de Maringá, 2012. Disponível em: <<http://www.peu.uem.br/Discertacoes/Laurence.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

OLIVEIRA, Margaroni Fialho de. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003, 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola e do meio ambiente, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

OKURA, M. H. **Microbiologia: roteiros de aulas práticas**. Riberão Preto, SP: Tecmedd, 2008.

O'REILLY, E., RODGERS, M. ZHAN, X. M. Pumped flow biofilm reactors (PFBR) for treating municipal wastewater. **Water Science & Technology**. London, v. 57, n. 12; p. 1857-1865, 2008. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18587171>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

PEREIRA, Maria O.B.O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (Carbamato e glutaraldeído) em sistema de biofilme**. 2001. 211f. Tese (Doutorado em Engenharia Sanitária). Universidade do Minho, Braga. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/189/1/Tese%2030.pdf> >. Acesso em: 10 jun. 2012.

PICANÇO, Aurélio P. et al. Avaliação da atividade biológica do biofilme formado em materiais suportes de filtros anaeróbios de fluxo ascendente. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 21, set. 2001a, João Pessoa. **Anais...**, João Pessoa: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001, p. 1-7. Disponível em:<

<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/brasil/ii-084.pdf> >. Acesso em: 10 Jun. 2012.

_____. Influence of porosity and composition of supports on the methanogenic biofilm characteristics developed in a fixed bed anaerobic reactor. **Water Science & Technology**, v. 44, n. 4 p 197–204, 2001b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11575085>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

PIMENTA, Handson C. D. et al. O ESGOTO: A IMPORTÂNCIA DO TRATAMENTO E AS OPÇÕES TECNOLÓGICAS. In: Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 12, 2002, Curitiba. **Anais Eletrônicos...** Curitiba: ABEPRO, 2002. Disponível em: <www.ufpel.edu.br/cic/2012/anais/pdf/EN/EN_01298.pdf>. Acesso em: 10 maio 2013.

RAMOS, Joana M. F. **Determinação de Parâmetros Cinéticos de Biofilmes formados por Pseudomonas fluorescens**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Portugal, 2008. Disponível em: <<http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/59968/2/Texto%20integral.pdf>>. Acesso em: Jan. 2013.

RODINA, A. G. **Methods in aquatic microbiology**. Baltimore. University Park Press. 461p. 1972.

SANTOS, Rafael C. de O.; FILHO, Olavo B.; GIORDANO, Gandhi. Proposta De Um Método Racional Para O Dimensionamento De Reatores De Tratamento De Esgotos Por Lodos Ativados Em Bateladas Para Remoção De Carga Orgânica. **Eng. sanit. ambient.**, v. 11, n. 2, p. 153 – 161, abr-jun 2006. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522006000200008>. Acesso em: 10 jan. 2013.

SARTI, Arnaldo; SAKAMOTO, Isabel K.; VARESCHE, Maria B. A. TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO UTILIZANDO REATORES ANAERÓBIOS OPERADOS EM BATELADAS SEQUENCIAIS (ESCALA PILOTO). **Eng. sanit. ambient.**, v.11, n. 1, jan-mar 2006, p. 73-82. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/1587>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

SILVA, Ariovaldo J. da. **Biodessulfatação com posterior oxidação parcial do sulfeto em reatores operados em bateladas Sequenciais**. 2005. 188f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SIMÕES, Manuel. J. V. **Use of biocides and surfactants to control *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Role of the hydrodynamic conditions.** Dissertação (PhD licenciatura em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Portugal, 1995. Disponível em: < <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/3320>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

SILVA, A.J.; HIRASAWA, M.B.; VARECHE, M.B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evolution of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea *Anaerobe*, v.12, p. 93 – 98, 2006.

SIRIPORNADULSIL, Surasak; LABTEEPHANA, Wimonnuch. The Efficiency of Effective Microorganisms (EM) on Oil and Grease Treatment of Food Debris Wastewater. **KKU Science Journal (Supplement)**, v. 36, p. 27-35, 2008. Disponível em:< http://www.champa.kku.ac.th/sci_journal/book/36_Supplement/27.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2013.

SOUZA, Andrea A. R. de. et al. Avaliação Do Desempenho De Reator Sequencial Em Batelada (Rsb), Tratando Mistura De Esgoto sanitário E Lixiviado De Aterro Sanitário Pré-Tratado Em Lagoas De Estabilização. In: Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, 7, 2010, Porto Alegre. **Anais...**, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <10_raatores>. Acesso em: 25 jan. 2013.

SPÍNOLA, Ana L. G. **Biofilmes aeróbicos para remoção de nitrogênio em células de fluxo, submetidos a diferentes velocidades superficiais e taxas de carregamento.** 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, São Carlos.

SZYMANSKI, N., PATTERSON, R.A. Effective Microorganisms (EM) and Wastewater Systems. In: Conference by Patterson, 3, 2003. **Anais...**, Patterson, 2003, p. 347-354. Disponível em:< <http://www.lanfaxlabs.com.au/papers/P53-03-Szymanski-Patterson.PDF>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

TECNOLOGIA EM. EM-1 Microrganismos Eficazes – AMBIEM Ltda. p. 1-4, 2013. Disponível em: <http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base_dados/informacoes_tecnicas_em1.pdf>. Acesso em: 10 out. 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, R.; CASE, C L. **Microbiologia.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VAZOLLER, R. F. **Biodiversidade: Oportunidade e Perspectivas Tecnológicas.** Workshop. Campinas-SP.USP. p.1-24.1996.

VELA, F. J. **Tratamento de esgoto sanitário em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais e periodicamente aerado**. 2006. 159 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

VON SPERLING, Marcos. **Princípios básicos de tratamento de esgoto**. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v.2. 211p .Belo Horizonte, 1996.

VU, Barbara et al. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. **Molecules**, v.14, n. 7, p. 2535-2554, jul. 2009, ISSN 1420-3049. Disponível em:< www.mdpi.com/journal/molecules>. Acesso em: 12 jan. 2013.

XAVIER, J. B. et al. **Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes**. 2005. Disponível em: <http://www.biofilms.bt.tudelft.nl/pdf/2002_jxavier_biofilmes.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2012.

ZAFARZADEH, A., BINA, B., NIKAEEN, MOVAHEDIAN A, HAJIAN, N. Performance of moving bed biofilm reactors for biological nitrogen compounds removal from wastewater by partial nitrification-denitrification process. **J. Environ. Health. Sci. Eng.**, Vol. 7, No. 4, pp. 353-364, 2010.

ZENATTI, Dilcemara. C. **Avaliação da nitrificação de efluente de abatedouro de tilápia em reator em batelada sequencial aerado com biomassa imobilizada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel. 2007. 106 f. Disponível em:< http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=82347>. Acesso em: 10 jan. 2013.