

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
CÂMPUS APUCARANA/LONDRINA**

CAMILA ZOE CORREA

**REATOR DE LEITO ESTRUTURADO COM RECIRCULAÇÃO
SUBMETIDO À AERAÇÃO INTERMITENTE NO TRATAMENTO DE
ESGOTO SANITÁRIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**LONDRINA
2015**

CAMILA ZOE CORREA

**REATOR DE LEITO ESTRUTURADO COM RECIRCULAÇÃO
SUBMETIDO À AERAÇÃO INTERMITENTE NO TRATAMENTO DE
ESGOTO SANITÁRIO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Apucarana e Londrina.

Orientadora: Prof^a. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Deize Dias Lopes

**LONDRINA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação UTFPR - Câmpus Londrina

C824r Correa, Camila Zoe

Reator de leito estruturado com recirculação submetido à aeração
Intermitente no tratamento de esgoto sanitário / Camila Zoe Correa -
Londrina: [s.n.], 2015.
50 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kátia Valéria Marques Cardoso Prates
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Deize Dias Lopes
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2015.
Bibliografia: f. 43-50

1. Esgoto sanitário. 2. Bactérias nitrificantes. 3. Bactérias
Desnitrificantes. 4. Biofilme. I. Prates, Kátia Valéria Marques Cardoso,
orient. II. Lopes, Deize Dias, coorient. III. Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Ambiental. V. Título.

CDD: 628

Bibliotecária: Sandra Gomes de Oliveira Reis CRB 9/1287 – DIRPPG-LD



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pró-reitora de Pesquisa e Pós Graduação
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Campus Apucarana/Londrina



TERMO DE APROVAÇÃO

REATOR DE LEITO ESTRUTURADO COM RECIRCULAÇÃO SUBMETIDO À AERAÇÃO INTERMITENTE NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO

por

Camila Zoe Correa

Dissertação de mestrado apresentada no dia dez de dezembro de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

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

Prof^a. Dr. Ajadir Fazolo - Membro Titular
(UTFPR)

Prof. Dra. Marcia Helena Zamariolli Damianovic- Membro Titular
(EESC- USP)

Prof. Dr Edson Fontes de Oliveira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental.

À minha mãe espelho de amor e honestidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Papai do céu por me dar forças, saúde e sabedoria para chegar ao fim desta etapa, por colocar pessoas maravilhosas na minha vida, por me abençoar e me mostrar o caminho certo a seguir.

A minha família em especial a minha Mãe admirável (Gabriela) e meu Pai (José) por acreditarem em mim e me apoiarem. Ao meu irmão e minha cunhada por terem me acolhido em sua casa durante quase todo o meu mestrado. A minha sobrinha linda Maria Fernanda, pelos longos abraços e beijos e pelo colinho que ela sempre me deu nos momentos em que eu estava triste.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia e mestrado na UTFPR: Danielle Nakagawa, Sharize Beatriz, Vivian Lima, Gabriella Ornellas e Ana Alicia pela amizade e parceria. Ao meu grupo de trabalho, querido e admirável, “meus filhos científicos”: Melina Kaiser, Isadora Guizilini e em especial Eduardo Rodrigues (Du) e Gissely Peterlini (Gi) que me acompanharam do início ao fim deste trabalho. Nesta caminhada vivi momentos maravilhosos ao lado de vocês, foram muitos risos, muita parceria e muito carinho. Obrigada pela amizade, sei que serão excelentes engenheiros e tenho muito orgulho em ter trabalhado com todos.

Aos companheiros de laboratório e mestrado na UEL: Juliana Frias (Ju), Aline, Caroline Coldebella (Carol), Flávia Gonçalves, Thais Lemos, Isabela Machado (Isa), Neil Ortiz (Neil), Rubielle Saretto, Vilson Junior e Renan Pascal por estarem presentes em muitas coletas de esgoto, pela parceria, conselhos, confidências e principalmente pela amizade. Em especial gostaria de agradecer aos colegas Camilla Pedroso (Cami IC), Camila Azevedo (Cami TCC) e Henrique Kitan (Japa), que trabalham em conjunto comigo. Foram muitos perfis juntos, ou seja, muitas horas compartilhadas, muitas análises perdidas, o que resultava em muitas risadas e muitas confidências, obrigada por estarem comigo durante todo o meu trabalho, vocês são muito especiais.

Ao Ivan (Técnico do laboratório de Saneamento) pelo auxílio em muitos trabalhos, na elaboração das nossas “gambiarras” no laboratório, por me ajudar em muitas coletas e por estar sempre presente nos socorrendo.

A equipe da Sanepar (ETE norte) por ceder o esgoto sanitário utilizado, pelo auxílio em muitas coletas e pelo cuidado e presteza com que sempre me atenderam.

Aos Professores: Prof. Dr. Ajadir Fazolo e Prof. Dr. Ricardo Nagamine, por participarem da minha qualificação, me orientando nos próximos passos.

Novamente agradeço ao Prof. Dr. Ajadir Fazolo e ao Prof. Dr. Edson Fontes de Oliveira pela colaboração e auxílio no entendimento e elaboração de algumas análises. É muito bom ter professores que sempre estão dispostos a ajudar e a contribuir com o nosso trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Ana Barana (UEPG) pela colaboração externa e oportunidade de trabalharmos em grupo.

A minha querida Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Deize Dias Lopes por me abrir as portas do laboratório de Saneamento e Hidráulica da UEL, por confiar no meu trabalho, pelos seus conselhos e disponibilidade. Eu não tenho palavras para agradecer o quanto me ajudou e me ensinou neste tempo em que trabalhamos juntas, muito obrigada por ter me orientado e pela oportunidade em trabalhar com a senhora, sou extremamente grata por tudo.

A minha mãe científica Prof^a. Dr^a. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates, por me apresentar esta carreira, por ser minha orientadora durante estes 6 anos, por me aguentar, por me dar conselhos e muitos abraços cheios de energia e carinho. O seu ombro já acolheu muitas lágrimas de saudades e seus ouvidos já ouviram muitas palavras de tristeza e alegria. Tudo que sou profissionalmente e muito do que aprendi como pessoa devo a sua confiança, apoio e palavras. Infelizmente nenhuma frase conseguirá expressar minha gratidão, então sinta o meu abraço cheio de energia e carinho, muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Foram muitos que me ajudaram direta e indiretamente se me esqueci de algum nome me perdoem, mas saibam que agradeço a todos do fundo do meu coração, pois cada um foi fundamental para que esta pesquisa chegasse ao fim.

Muito obrigada!

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

RESUMO

CORREA, Camila Zoe. **Reator de leito estruturado com recirculação submetido à aeração intermitente no tratamento de esgoto sanitário**. 2015. 50f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

O lançamento de compostos nitrogenados em corpos d'água pode resultar em problemas ambientais, sendo assim tratar águas residuárias, como o esgoto sanitário com o objetivo de remover não apenas matéria orgânica, mas também nitrogênio tem sido objeto de estudo há algumas décadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de um reator de leito estruturado e fluxo contínuo, com recirculação, na remoção de matéria orgânica e nitrogênio presente em esgoto sanitário, sob diferentes ciclos de Aeração intermitente (AI) e avaliar a influência destes ciclos no desenvolvimento de bactérias nitrificantes (Bactérias Oxidadoras de Amônia – BOA e Bactérias Oxidadoras de Nitrito – BON) e desnitrificantes (DESN) aderidas (Material Suporte - MS) e em suspensão (Efluente – EF e Lodo – LD). O reator utilizado possuía volume útil de 9,4 L. Como material suporte (MS) foi utilizado espuma de poliuretano, cortada e fixada em hastes de PVC. Foram trabalhadas 3 fases de aeração (AE) e não aeração (AN) com diferentes tempos: Fase 1 (4 h AE/ 2 h AN); Fase 2 (2 h AE/ 1 h AN) e Fase 3 (2 h AE/ 2 h AN). Durante todas as fases o tempo de detenção hidráulico foi mantido em 16 h e o efluente recirculado a uma vazão de 3 vezes a vazão afluyente. Foram analisados: pH, alcalinidade total, temperatura, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT), N-amoniaco – $N-NH_4^+$, nitrito- $N-NO_2$ e nitrato- $N-NO_3$. A concentração das BOA, BON e DESN foi determinada utilizando o Número Mais Provável.gSSV⁻¹ (NMP.gSSVmL⁻¹). Na Fase 1 o percentual de remoção de NKT, $N-NH_4^+$ e NT foi de 76±10%, 70±21% e 67±10% respectivamente. Na Fase 2 de 80±15% de remoção de NKT, 86±15% de $N-NH_4^+$ e 68±9% de remoção de NT e na Fase 3 de 58±20%, 72±28% e 41±6% de NKT, $N-NH_4^+$ e NT, respectivamente. A eficiência de desnitrificação nas 3 fases foi acima de 70%, indicando que no reator ocorreu o processo de Nitrificação e desnitrificação Simultânea (NDS). Os percentuais de remoção de DQO_T foram de 88%±4 na Fase 1, 94%±7 na Fase 2 e 90%±11 na Fase 3. A ANOVA multivariada aplicada ao NMP.gSSV⁻¹, indicou que houve diferença significativa (F: 20,2; p-valor <0,01) entre a concentração dos organismos analisados nos diferentes ciclos de AI. Porém as diferenças entre os NMP.gSSV⁻¹ não depende apenas de fatores isolados e sim de quais meios, fases e grupos estão sendo analisados. Dos resultados conclui-se que o sistema foi eficiente em termos de remoção de nitrogênio e matéria orgânica, e que a fase que apresentou a maior disponibilidade de Oxigênio Dissolvido (OD) e relação C/N (Fase 2), foi a que obteve as menores concentrações efluentes de matéria orgânica e $N-NH_4^+$. Apontasse que houve diferença significativa entre a concentração (NMP.gSSV⁻¹) dos organismos analisados (BOA, BON e DESN), porém esta diferença não depende de fatores isolados e sim de quais meios (MS, EF ou LD, fases (1, 2 ou 3) e grupos (BOA, BON e DESN) está sendo considerado.

Palavras-chave: Bactérias nitrificantes. Desnitrificantes. Nitrificação e Desnitrificação Simultânea. Número Mais Provável.gSSV⁻¹ (NMP.gSSV⁻¹).

ABSTRACT

CORREA, Camila Zoe. **Structured bed reactor with recirculation subjected to intermittent aeration in the treatment of domestic sewage.** 2015. 50f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

The release of nitrogen compounds in water bodies can result in many environmental problems, so treat wastewater, such as sewage in order to remove not only organic matter but also nitrogen has been studied a few decades. From the above, the objective of this study was to evaluate the performance of a structured bed reactor, continuous flow, with recirculation, in removing organic matter and nitrogen present in wastewater under different cycles of intermittent aeration (AI) and to evaluate the influence of these cycles in the development of nitrifying bacteria (Oxidizing Bacteria Ammonia - BOA and Bacteria Oxidizing Nitrite - BON) and denitrifying (DESN) adhered (Support Material - MS) and suspension (Effluent - EF and sludge - LD). The reactor used has usable volume of 9.4 L. As support materials (MS) polyurethane foam was used, cut and fixed in PVC rods. 3 were worked aeration phases (AE) and non-aeration (AN) at different stage: Stage 1 (4 h EA / AN 2H); Stage 2 (2H EA / AN 1 h) and Phase 3 (2H EA / AN 2 h). During all hydraulic detention time phases was kept at 16 h and the effluent recirculated at a rate of 3 times the inflow. Were analyzed: pH, total alkalinity, temperature, chemical oxygen demand (COD), Biochemical Oxygen Demand (BOD), nitrogen Kjeldahl Total (NKT), ammonia-N-N-NH₄⁺, nitrito-N-NO₂⁺ and nitrate- NO₃⁻. The concentration of BOA, BON and DESN was determined using the number More Provável.gSSV-1 (NMP.gSSV-1). In phase 1 the percentage removal NTK N-NH₄⁺ and NT was 76±10%, 70±21% and 67±10% respectively. In Phase 2 80±15% of removal NKT, 86±15% of N-NH₄⁺ e 68±9% of removal NT e na Fase 3 de 58±20%, 72±28% and 41±6% of NKT, N-NH₄⁺ of NT, respectively. The denitrification efficiency in stage 3 was over 70%, indicating that occurred in the reactor the process of simultaneous nitrification and denitrification (NDS). DQOT the removal percentages were 88 ± 4% in Phase 1, 94 ± 7 in Phase 2 and 90± 11% in Phase 3. The multivariate ANOVA applied to NMP.gSSV-1, it indicated that there was significant (F: 20,2, p <0,01) between the analyzed concentration of organisms AI in different cycles, but the differences between NMP.gSSV-1 depends not only isolated factors but of which means, and phase groups being analysis. From the results it is concluded that the working system is efficient in terms of nitrogen removal and organic matter, and that the stage with the highest availability of Dissolved Oxygen (DO) and C/N ratio (Step 2), was the one obtained the lower concentrations of organic matter effluents and N-NH₄⁺. Hinted that there was a significant difference between the concentration (NMP.100mL⁻¹) of the analyzed organizations (BOA, BON and DESN), but this difference does not depend on factors alone but of which means (MS, EF or LD), stages (1, 2 or 3) and groups (BOA, BON and DESN) is being considered.

Keywords: Nitrifying bacteria. Denitrifying. Nitrification and denitrification Simultaneous. Number More Provável.gSSV⁻¹ (NMP.gSSV⁻¹).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do sistema de tratamento utilizado.	15
Figura 2. Resultados de alcalinidade e pH afluente (Af) e efluente (Ef) durante as 3 fases experimentais trabalhadas.	23
Figura 3. Resultados de N-NH ₄ ⁺ afluente (Af)/efluente (Ef) (A) e NO ₂ ⁻ e NO ₃ ⁻ efluente (B) durante as 3 fases operacionais do sistema.	25
Figura 4. Concentração de OD durante um ciclo de AI na (A) Fase 1 (B) Fase 2 e (C) Fase 3.	26
Figura 5. Box plot de distribuição dos percentuais de remoção de NT nas Fase 1, 2 e 3 de operação do reator.	28
Figura 6. Gráfico box plot de distribuição dos percentuais de remoção de DQO _T nas Fase 1, 2 e 3 de operação do reator.	30
Figura 7. Resultado da ANOVA, médias e erros padrões do (NMP.gSSV ⁻¹) ^{1/2} (A) das bactérias nitrificantes (BOA e BON) e desnitrificantes; (B) das bactérias analisadas entre os meios MS, EF e LD, e (C) das bactérias analisadas entre as fases 1, 2 e 3.	32
Figura 8. Resultado da Anova, médias e erros padrões do (NMP.gSSV ⁻¹) ^{1/2} das bactérias nitrificantes (BOA e BON).	35
Figura 9. Resultado da ANOVA Fatorial, média e erro padrão dos (NMP.gSSV ⁻¹) ^{1/2} das bactérias entre os grupos BOA, BON e DESN e os meios (MS, EF e LD) e Fases (1, 2 e 3).	36
Figura 10. Concentração média de PLT, PT e STVA durante as 3 fases trabalhadas.	38
Figura 11. MEV realizada na superfície externa (A, C, D, E e F) e interna (B) do material suporte.	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL	15
3.2 ESGOTO SANITÁRIO.....	16
3.3 INÓCULO.....	16
3.4 FASES EXPERIMENTAIS.....	17
3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	17
3.5.1 Cálculo das eficiências.....	18
3.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	18
3.6.1 Preparo das amostras (EF, MS e LD) para determinação do NMP/gSSV de BOA, BON e desnitrificantes	19
3.6.2 Quantificação das bactérias nitrificantes (BOA e BON) e desnitrificantes.....	20
3.6.3 Determinação de Polissacarídeos Totais (PST) e Proteínas Totais (PT) aderidos ao Material Suporte (MS).....	21
3.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO	23
4.1.1 pH, Alcalinidade e Remoção de Nitrogênio	23
4.1.2 Remoção de Matéria orgânica	29
4.2 BACTÉRIAS NITRIFICANTES E DESNITRIFICANTES PRESENTES EM REATOR DE LEITO ESTRUTURADO SUBMETIDO A DIFERENTES CICLOS DE AERAÇÃO INTERMITENTE (AI).....	31
4.2.1 NMP.gSSV ⁻¹ das Bactérias Nitrificantes (BOA e BON) e Desnitrificantes (DESN).....	31
4.3 CONCENTRAÇÃO DE PLT, PT E STVA	37
4.4 MICROSCOPIA.....	39
5 CONCLUSÃO	41
REFERENCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

No Brasil dos 5564 municípios existentes cerca de 3069 (55%) possuem sistema de coleta de esgoto e destes apenas 29% tratam o esgoto coletado (IBGE, 2011), sendo o tratamento convencionalmente aplicado, projetado visando a remoção de sólidos sedimentáveis e matéria orgânica (LAMEGO NETO e COSTA, 2011), porém estes não são os únicos constituintes que podem causar problemas quando lançados em corpos hídricos.

Os macronutrientes presentes no esgoto doméstico, como o nitrogênio, se não removido adequadamente, quando lançado pode trazer sérios prejuízos ao meio ambiente como a eutrofização, diminuição da concentração de oxigênio dissolvido no meio, mortalidade de peixes (CAMPOS et al.; 2008; WHANG et al.; 2009; EPA, 1993), além de problemas em relação saúde humana, como a metahemoglobinemia (SHUVAL e GRUNER, 1977) e câncer no estômago (GULIS et al.; 2002).

Um das tecnologias que vem sendo estudadas já a algum tempo, com vistas a solução deste problema, é a utilização de sistemas compactos que podem promover a remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio na mesma unidade. Como exemplo deste tipo de reator tem-se os reatores de leito estruturado e fluxo contínuo, que agregam características positivas de sistemas com biomassa imobilizada e em suspensão, e são efetivos em termos de remoção de matéria orgânica e nitrogênio (ARAÚJO e ZAIAT, 2009; MOURA et al., 2012; BARANA et al., 2013; MOCKAITIS et al., 2014; WOSIACK et al., 2015).

O processo de remoção de matéria orgânica e nitrogênio neste tipo de reator é biológico, e envolve uma série de organismos. A remoção de matéria orgânica ocorre pela ação de bactérias heterotróficas que podem ser aeróbias, anaeróbias ou facultativas.

Já o processo de nitrificação ocorre por meio da ação de bactérias nitrificantes, que agem sequencialmente para conversão de nitrogênio amoniacal em nitrito e nitrato. Os compostos orgânicos nitrogenados no esgoto sanitário são convertidos em amônia pela ação de bactérias heterotróficas. A

amônia ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) pode ser utilizada por bactérias autotróficas aeróbias oxidadoras de amônia (BOA), sendo oxidada a nitrito (NO_2^-). O nitrito por sua vez pode ser utilizado por bactérias autotróficas aeróbias oxidadoras de nitrito (BON) e convertido em nitrato (NO_3^-). O nitrato na falta de oxigênio dissolvido no meio, pode ser utilizado pelas bactérias desnitrificantes heterotróficas facultativas como acceptor final de elétrons, e transformado em Nitrogênio gasoso (N_2), sendo liberado do sistema (HENZE et al, 1997; SEDLAK, 1992; EPA, 1993; AHN, Y., 2006; PAREDES et al, 2007).

Do exposto conclui-se que são necessários no meio, duas condições para que o processo convencional de remoção biológica de nitrogênio ocorra, uma fase aeróbia e outra anóxica. Uma das técnicas que vem sendo empregada para que este processo ocorra no mesmo sistema é a utilização de biomassa imobilizada, que possibilita a existência de diferentes ambientes ao longo do biofilme formado, favorecendo a coexistência de ambos os organismos no mesmo meio (FU et al., 2010; DANIEL et al., 2009; NOGUEIRA et al, 2002; KOTLAR, et al., 1996) e a utilização de um sistema de Aeração Intermitente (AI) (WANG et al., 2009; VIRDIS et al, 2011; GUO et al.; 2013; CAPODICCI et al.; 2015).

O sistema de AI baseia-se em ciclos de aeração e não aeração e vem sendo pesquisado desde 1990. O emprego deste sistema viabiliza o processo conhecido como nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) em um mesmo reator, tendo como vantagens operacionais a diminuição na quantidade de energia gasta no sistema (COLLIVIGNARELLI e BERTANZA, 1999; MOURA et al., 2012), controle do pH, permanecendo este próximo a neutralidade, pois a alcalinidade consumida na nitrificação pode ser devolvida ao meio no processo de desnitrificação, resultando em menor demanda de alcalinidade externa (CHAN e TSENG, 1999), dentre outras.

Considerando as vantagens associadas ao sistema de AI e obtidas na operação do reator de leito estruturado com fluxo contínuo e recirculação, o presente trabalho propõe o estudo deste tipo de sistema operado sob diferentes ciclos de AI, buscando avaliar a sua influência em termos de remoção de matéria orgânica e nitrogênio, e investigar as alterações sofridas na biomassa nitrificante e desnitrificantes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o desempenho de um reator de leito estruturado, com fluxo contínuo e recirculação, sob diferentes condições de aeração intermitente tratando esgoto sanitário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i) Avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica e nitrogênio no sistema nos diferentes ciclos de aeração intermitente;

(ii) Estimar a concentração de bactérias nitrificantes e desnitrificantes presentes no reator, verificando se as fases operacionais vieram a interferir na concentração destes organismos;

(iii) Monitorar e caracterizar a formação do biofilme no material suporte;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL

A instalação experimental em escala de bancada foi composta por um reator de fluxo contínuo ascendente, construído em acrílico, com volume total de 13 L, volume útil de 9,4 L, diâmetro externo de 22 cm, diâmetro interno de 16 cm e altura de 82 cm (Figura 1).

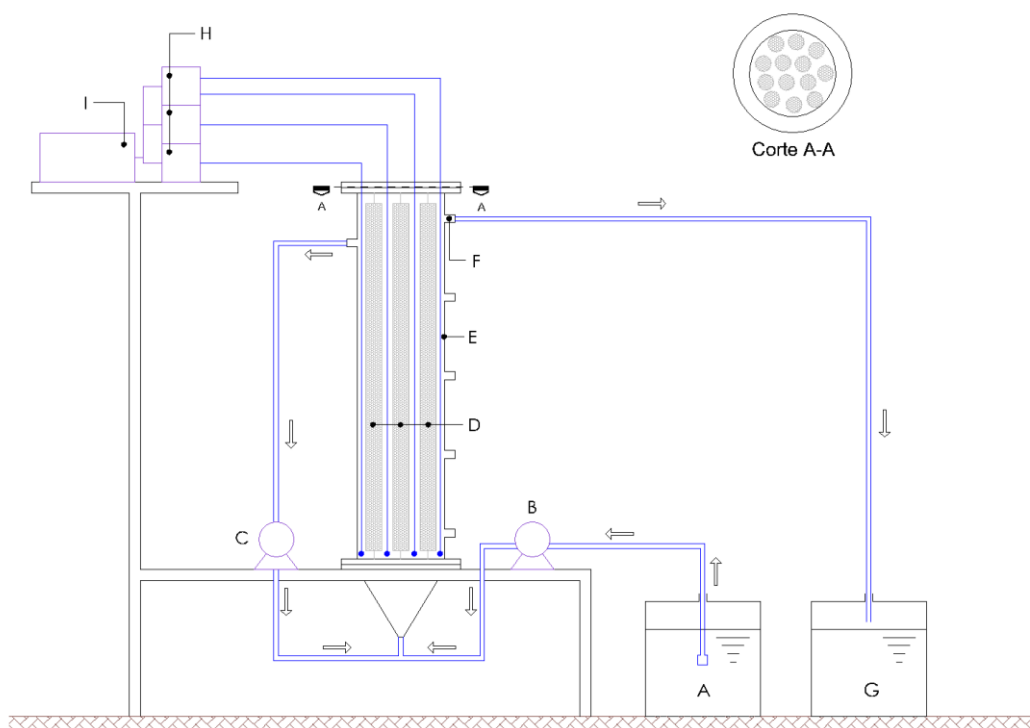


Figura 1. Representação esquemática do sistema de tratamento utilizado.

Legenda: A- Reservatório esgoto sanitário afluyente; B- Bomba de alimentação; C- Bomba de recirculação; D- Material suporte; E – Reator de Leito Estruturado - RLE; F – Saída do esgoto efluente; G – Reservatório de esgoto efluente; H – Bombas de aeração; I – Timer analógico.

Fonte: Autoria própria.

Como material suporte foram utilizadas estruturas cilíndricas de espuma de poliuretano com cerca de 3 cm de diâmetro e 65 cm de altura, totalizando 13 estruturas no interior do reator, gerando um leito com porosidade de 28%. Para fixação das estruturas cilíndricas verticalmente no reator foram utilizadas hastes de PVC, encaixadas nas extremidades (Figura 1).

O reator foi alimentado por meio de uma bomba (ProMinent modelo GALA – Vazão máxima: 1,2 L.h⁻¹). Para aeração foram utilizadas 3 bombas

(Marca BIG ALFA A230) ligadas a pedras porosas que forneciam juntas uma vazão de ar de aproximadamente 9,5 L/min. Durante a operação do sistema o efluente nitrificado foi recirculado a uma taxa de três vezes a vazão de entrada ($Q_{Re} = 3Q$), sendo esta recirculação realizada por meio de uma bomba da mesma marca e modelo da de alimentação.

O sistema foi operado durante 210 dias e até o 148^o a temperatura não foi controlada, porém devido a mudanças na temperatura ambiente (diminuição) foi instalado junto ao reator um sistema de aquecimento que o manteve a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2 ESGOTO SANITÁRIO

O esgoto sanitário utilizado foi proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Companhia de Saneamento do Paraná – ETE Norte/Sanepar, situada na Região norte da cidade de Londrina – PR, sendo este coletado semanalmente após o tratamento preliminar (gradeamento e caixa de areia). Após a coleta o mesmo era mantido congelado até a sua utilização. No momento da utilização este era descongelado e em seguida preenchia-se um reservatório de 20 L a temperatura ambiente, onde o esgoto sanitário era succionado e levado ao reator.

3.3 INÓCULO

Para dar partida no reator foi utilizado um inóculo obtido através da aeração contínua de esgoto sanitário, em um reator em bateladas sequencias, com TDH de 24 h, até ser constatada a atividade de organismos nitrificantes (30 dias).

Após este período o lodo formado foi colocado em contato com as estruturas cilíndricas de poliuretano, utilizadas como suporte, por um período de 24 h. Após este tempo estas foram instaladas no reator, que ficou operando sob aeração e fluxo contínuo com TDH de 58 h, para favorecer a adaptação e

fixação da biomassa. Após 33 dias foi constatada remoção de 100% de N-amoniaco no efluente, e deu-se início ao estudo do sistema efetivamente, com a ligação da aeração intermitente (AI) e alteração do TDH.

3.4 FASES EXPERIMENTAIS

Seguidamente ao período de adaptação da biomassa foi dado início as fases operacionais no sistema (Quadro 1). Foram trabalhadas 3 fases, sendo o TDH mantido constante em 16 h com variação dos ciclos de AI. Em todas as fases houve a recirculação do efluente ($Q_{re}=3*Q$). A duração de cada fase experimental dependeu do percentual de remoção de matéria orgânica e nitrogênio indicando uma faixa estabilizada. Em todas as fases foram realizadas análises físico químicas (Item 3.5) e microbiológicas (Item 3.6).

Quadro 1. Fases operacionais do sistema com suas respectivas temperaturas, aeração intermitente (Aeração ligada – AE/ Aeração desligada – AN) e duração.

Fase	Temperatura	Aeração intermitente (AE/AN)	Duração (dias)
1	$26\pm 2^{\circ}\text{C}$	4h/2h	66
2	$25\pm 2^{\circ}\text{C}$	2h/1h	45
3	$*25\pm 2^{\circ}\text{C}$	2h/2h	50

*Temperatura controlada

Fonte: Autoria própria.

3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O monitoramento do sistema (análises físico químicas afluente e efluente) foi realizado seguindo os procedimentos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Foram realizadas análises para determinação: pH (4500-H B); Alcalinidade total (2320 B); temperatura (2550 B); Demanda Química de Oxigênio (DQO - 5220 D) sendo esta total (DQO_T) e filtrada (DQO_F); Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO -5210 B/4500 -OG), sendo esta também total (DBO_T) e filtrada (DBO_F); N-amoniaco (4500-NH₃ B/C); nitrito- N-NO₂⁻ (4500 B - FIA); nitrato- N-NO₃⁻

(4500 NO₂ B) e Nitrogênio Kjeldhl Total- NKT (4500 – Norg/4500-NH₃ C – Kjeldhl).

3.5.1 Cálculo das eficiências

As eficiências de remoção de DQO, DBO, N-amoniacal e NKT foram calculadas levando em consideração os valores afluente e efluente destes compostos. Para a eficiência de remoção de Nitrogênio Total (NT), utilizou-se os dados de NKT afluente e efluente, nitrito e nitrato efluente e o percentual de desnitrificação foi estimado seguindo a equação utilizada por Barana et al., (2013).

3.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram realizadas análises quantitativas no efluente (EF), material suporte (MS) e lodo (LD) para determinação da concentração de bactérias nitrificantes (Bactérias Oxidadoras de Amônia – BOA e Bactérias Oxidadoras de Nitrito – BON) e desnitrificantes. Para determinar a quantidade de biomassa aderida ao MS, formando o biofilme, foram realizadas análises para determinação da concentração de polissacarídeos totais (PST), proteínas totais (PT) e Sólidos Totais Voláteis Aderidos (STVA). Também foram realizadas análises qualitativas MS e LD, por meio de técnicas de microscopia óptica, e no MS ao final de cada ciclo de AI, foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). No Quadro 2 são apresentadas as análises microbiológicas que foram realizadas, juntamente com suas frequências.

Quadro 2. Análises microbiológicas realizadas no Efluente (EF), Material suporte (MS) e Lodo (LD).

Análise	Dias de operação			Método/Unidade
	EF	MS	LD	
BOA, BON e DESN	33 ⁰ , 47 ⁰ , 61 ⁰ , 75 ⁰ , 84 ⁰ , 108 ⁰ , 127 ⁰ , 169 ⁰ , 176 ⁰ e 191 ⁰	33 ⁰ , 47 ⁰ , 61 ⁰ , 75 ⁰ , 84 ⁰ , 108 ⁰ , 127 ⁰ , 169 ⁰ , 176 ⁰ e 191 ⁰	33 ⁰ , 61 ⁰ , 108 ⁰ , 169 ⁰ e 191 ⁰	Schmidt & Belser (1984), adaptado; Tiedje (1984) adaptado/Número Mais Provável. (NMP.gSSV ⁻¹)
Proteínas (PT)	-	Semanal	-	Bradford (1976)/mg.L ¹
Polissacarídeos (PLT)	-	Semanal	-	Dubois (1956)/mg.L ¹
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	-	Semanal	33 ⁰ , 61 ⁰ , 108 ⁰ , 169 ⁰ e 191 ⁰	Abreu e Zaiat (Adaptado) (2008)/mg.L ⁻¹
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	-	Ao final de cada fase	-	Oliveira et al., 2013
Microscopia a fresco	-	-	33 ⁰ , 61 ⁰ , 108 ⁰ , 169 ⁰ e 191 ⁰	À fresco (Okura, 2008).

Fonte: Autoria própria.

3.6.1 Preparo das amostras (EF, MS e LD) para determinação do NMP/gSSV de BOA, BON e desnitrificantes

Todos os materiais coletados para análise – EF, MS e LD, passaram por um processo de diluição em série em solução salina, para posteriormente seguirem as metodologias propostas para determinação do NMP/gSSV⁻¹. Todos os materiais foram diluídos até a diluição 10⁻¹⁰.

O EF para as análises microbiológicas foi coletado dentro do reator após a sua abertura para a retirada de uma amostra do MS a ser analisado. Foram coletados cerca de 10 mL de efluente. Deste volume 2 mL foram utilizadas para o processo de diluição em série.

O MS coletado tinha aproximadamente 3 cm de diâmetro e 2,5 cm de altura, sendo retirado de pontos aleatórios, com o auxílio de um bisturi estéril para proceder os cortes. Após a sua coleta o mesmo foi cortado em 3 partes, sendo uma utilizada no procedimento de diluição em série e outra para a determinação da concentração de PST e PT.

A parte destinada ao procedimento de diluição em série era colocada em tubo Falcon de 100 mL, juntamente com 10 g de pérolas de vidro, e 20 mL de água estilada estéril. O tubo Falcon seguia para equipamento Vortex, onde

todo o conteúdo era agitado por 10 minutos, para possibilitar o desprendimento do material aderido. O material oriundo desta agitação era considerado como a primeira diluição.

A parte do MS destinado a determinação dos STVA foi colocada em um tubo Falcon e agitada por 25 min. O material oriundo desta agitação foi colocado em uma capsula e procedeu-se com os procedimentos descritos por APHA (2012) para concentração de sólidos voláteis (2540 E).

O LD utilizado foi coletado na entrada inferior do reator. Após a sua coleta, este ficava em repouso por 30 minutos, sendo após este período coletado 10 mL do conteúdo sedimentado. O material coletado foi colocado em um tubo Falcon, com 10 g de perolas de vidro, e agitado por 10 minutos em Vortex, para permitir a quebra dos flocos. Deste material foi coletado 2 ml para proceder com a diluição em série.

3.6.2 Quantificação das bactérias nitrificantes (BOA e BON) e desnitrificantes

As análises para quantificação do NMP.gSSV^{-1} das bactérias nitrificantes (BOA e BON) foi baseada na metodologia proposta por Schimidt & Belser (1984) e adaptada às amostras de esgoto, conforme descrito por Mendonça (2002). Para determinação do NMP.gSSV^{-1} dos organismos desnitrificantes foi utilizada a metodologia proposta por Tiedje (1984) também conforme Mendonça (2002).

O cálculo do NMP foi realizado com a combinação dos tubos positivos, utilizando a Tabela Padrão de Probabilidade encontrada em APHA (2012), sendo os resultados obtidos divididos pela média total de SSV em cada fase operacional.

3.6.3 Determinação de Polissacarídeos Totais (PST) e Proteínas Totais (PT) aderidos ao Material Suporte (MS)

Os PST e as PT que foram determinados neste trabalho correspondem às substâncias ligadas (referente ao material polimérico extracelular) somadas as presentes no material intracelular das bactérias.

A concentração dos PLT e PT foi determinada após a lise completa das células aderidas ao MS (metodologia adaptada de CAMMATORA (1998)). Para a extração, um pedaço de MS foi inserido em um tubo Falcon de 100 mL e imerso em 10 mL de solução de NaOH 1 mol/L. O recipiente era colocado em banho-maria a aproximadamente 100°C, por 15 minutos. Após este período, o pedaço de espuma era retirado e o líquido centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm, sendo posteriormente filtrado em membrana éster celulose (diâmetro médio de poro de 0,22 µm).

Após a extração, para determinação da concentração de PLT foi utilizado o método colorimétrico de Dubois (1956) que consiste no desenvolvimento da cor na amostra quando a mesma reage com fenol após aquecimento com a adição de ácido sulfúrico. Após a reação, a amostra resfriada era lida à 490 nm em espectrofotômetro, utilizando glicose como padrão, para construção da curva de calibração.

Para determinação da concentração das PT foi utilizado o método de Bradford (1976), que fundamenta-se na reação das proteínas com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, e sua posterior leitura de absorvância em 595 nm, em espectrofotômetro, utilizando albumina de soro bovina como padrão, para construção da curva de calibração.

3.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O exame microscópico do biofilme aderido ao MS utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina

em um aparelho da marca ZEISS, modelo DSM-960 em 10 a 20 keV e fotografadas com um vídeo processador de cópias (Mitsubishi), com chapa fotográfica (Fuji) CK 100-S. Esta análise foi realizada no MS retirado do reator ao final de cada fase operacional, sendo este preparado segundo a metodologia proposta por Oliveira et al. (2013).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados de remoção de NT e DQO_T foram realizadas no software Statística 10, utilizando o teste de hipótese ANOVA (um critério), com um nível de decisão: $\alpha = 0,05$ ($p\text{-valor} < 0,05$), para verificar se houve diferença significativa entre os resultados.

Também foi realizada a Análise de Variância Fatorial nos resultados do $NMP.gSSV^{-1}$. Foi utilizado como variável dependente a estimativa do Número Mais Provável ($NMP.gSSV^{-1}$) obtido dos diferentes microrganismos analisados e variáveis independentes os grupos (BOA, BON e DESN), Meios (MS, EF e LD - Lodo) e Fases (Fase 1, 2 e 3). A análise estatística também foi realizada no software Statística 10, com um nível de decisão: $\alpha = 0,05$ ($p\text{-valor} < 0,05$), visando avaliar se existia interação entre os parâmetros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO

4.1.1 pH, Alcalinidade e Remoção de Nitrogênio

Na Figura 2 são apresentados os resultados de pH e alcalinidade afluente (Af) e efluente (Ef) durante as 3 fases experimentais trabalhadas. Observa-se que durante a operação do sistema houve variação nos valores de pH afluente (7,1 a 9,6) e efluente (5,0 a 9,8), porém o pH manteve-se dentro de valores considerados ótimos na maior parte do período operacional para o desenvolvimento de organismos nitrificantes e desnitrificantes (pH entre 7 - 8) (PAREDES et al., 2007; MAYER et al., 2009).

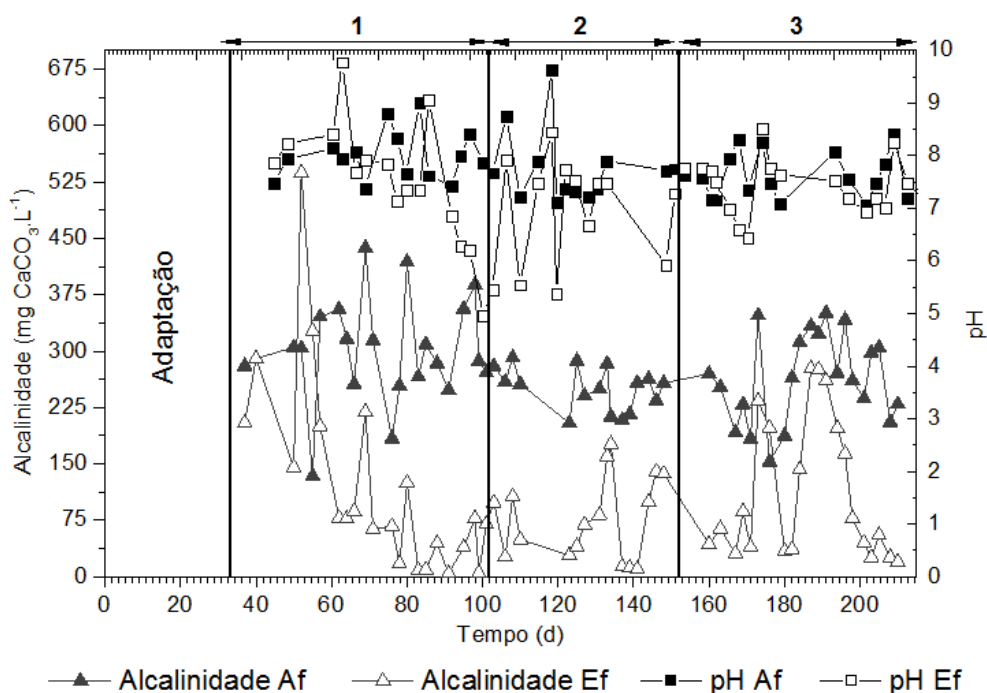


Figura 2. Resultados de alcalinidade e pH afluente (Af) e efluente (Ef) durante as 3 fases experimentais trabalhadas.

Fonte: Autoria Própria.

Os valores de alcalinidade afluente variaram de 427 mg CaCO₃.L⁻¹ a: 134 mg CaCO₃.L⁻¹) e efluente de 537 mg CaCO₃.L⁻¹ a 4 mg CaCO₃.L⁻¹).

A variabilidade na alcalinidade está relacionada ao consumo desta e a adição pontual de alcalinidade externa (Bicarbonato de sódio: $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ – $180 \text{ mg.L}^{-1} \text{ HCO}_3^-$) ao afluente, para manutenção do pH próximo a neutralidade, a fim de que o processo de nitrificação não fosse comprometido. Para que o processo de nitrificação biológica ocorra é fundamental à presença de alcalinidade no meio, visto que são consumidos cerca de $7,1 \text{ mg CaCO}_3$ a cada mg de N-amoniaco oxidado a NO_3^- (SEDLACK, 1991; EPA, 1993), devido a liberação de H^+ no processo.

O aumento da alcalinidade afluente é favorável a sistemas de tratamento biológico que utilizam material suporte para formação do biofilme, pois o aumento desta eleva o pH nas camadas internas do biofilme contribuindo para um processo de nitrificação mais rápido nestas estruturas (SHANAHAN e SEMMENS, 2015).

Na Tabela 1 são apresentados as médias e desvio padrão das concentrações de NKT e N-NH_4^+ afluente e efluente ao reator, juntamente com a média de remoção obtida durante cada fase operacional e as concentrações de N-NO_2^- e N-NO_3^- efluente. Na Figura 3 podem ser observados os resultados de N-NH_4^+ afluente e efluente e seus respectivos percentuais de remoção (Figura 3A) e os resultados de N-NO_2^- e N-NO_3^- efluente (Figura 3B).

Tabela 1. Média e desvio padrão de NKT, N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- , carga de nitrogênio e percentual de remoção de NKT e N-NH_4^+ .

Fase	NKT (mg/L)		N-NH_4^+ (mg/L)		N-NO_2^- (mg/L)	N-NO_3^- (mg/L)	*Carga Nitrogênio $\text{KgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$		% Remoção	
	Af	Ef	Af	Ef	Ef	Ef	Aplicada	Removida	NKT	N-NH_4^+
1	101±44	22±19	65±17	21±14	0,4±0,3	14±11	0,150±0,070	0,080±0,050	76±10	70±21
2	67±12	12±7	41±7,8	5±6	0,3±0,2	10±7	0,100±0,020	0,060±0,020	80±15	86±15
3	71±16	36±27	56±23	20±23	0,4±0,2	8±4	0,100±0,030	0,040±0,020	58±28	72±28

*Cálculo realizado com base nos valores de NKT semanais.

Fonte: Autoria própria.

O maior percentual de remoção de NKT foi encontrado na Fase 2 ($80\pm 15\%$), cuja carga de nitrogênio removida foi de $0,060\pm 0,020 \text{ KgN.m}^{-3}\text{d}^{-1}$, valor este próximo ao encontrado por Moura et al., (2012) trabalhando com um reator de leito estruturado com AI de 2h AE/1 h AN e TDH de 12 h.

O valor máximo e mínimo afluente de N-NH_4^+ foi de 110 mg.L^{-1} e 25 mg.L^{-1} , respectivamente e a concentração efluente máxima foi de 74 mg.L^{-1} e mínima de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Nota-se da Figura 3A que no início da Fase 1 as

concentrações de N-NH_4^+ efluente foram elevadas, em relação às outras fases, sendo este fato possivelmente relacionado à adaptação da biomassa a Al.

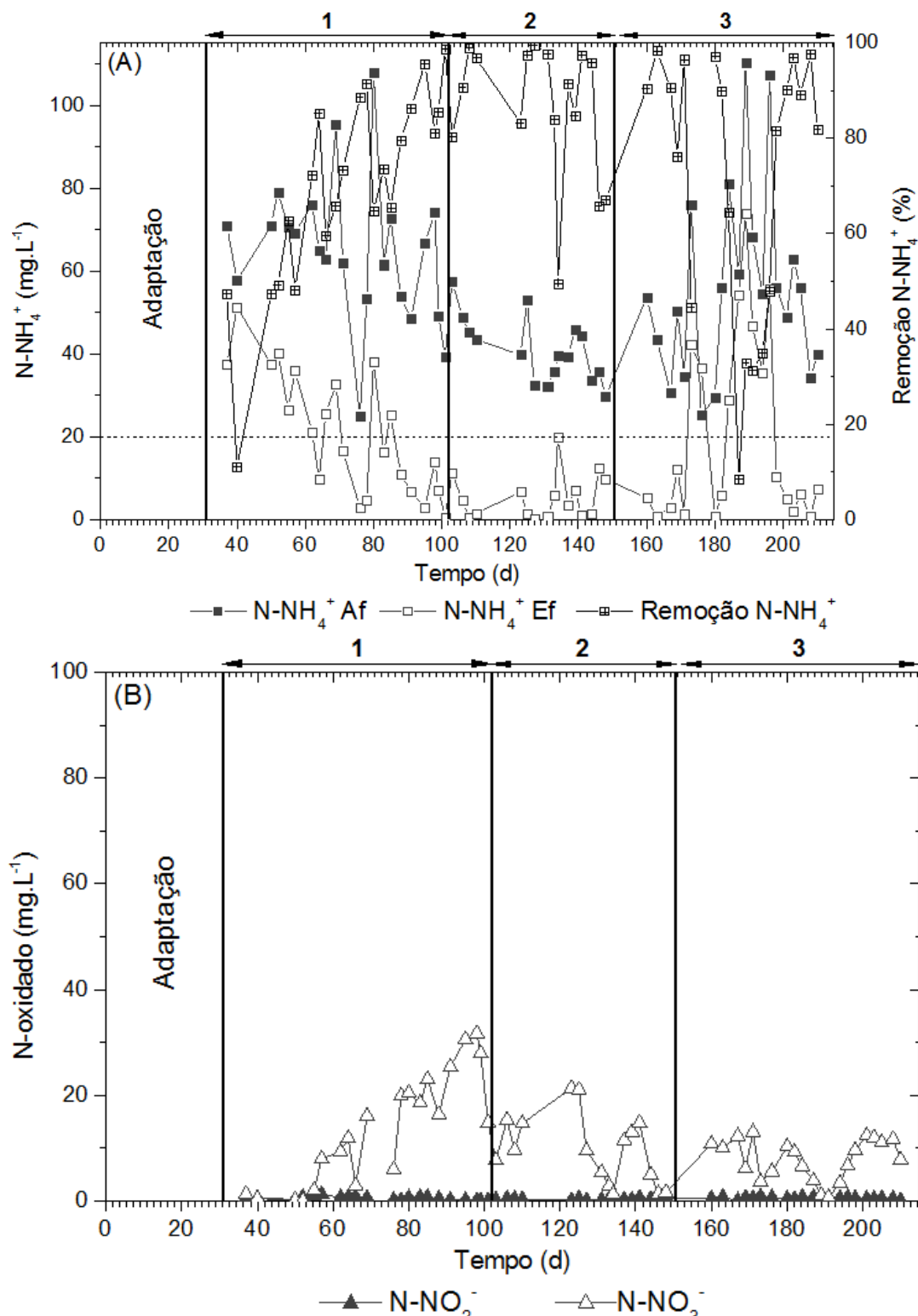


Figura 3. Resultados de N-NH_4^+ afluente (Af)/efluente (Ef) (A) e NO_2^- e NO_3^- efluente (B) durante as 3 fases operacionais do sistema.

Fonte: Autoria própria.

As menores concentrações efluentes de N-NH_4^+ encontram-se na Fase 2, com valores situados em sua maioria abaixo de 20 mg.L^{-1} . Observando a eficiência de remoção de N-NH_4^+ constata-se que a Fase 2 foi a que apresentou os maiores percentuais, com valor médio de $86 \pm 15\%$. A relação $\text{N-NH}_4^+/\text{NKT}$ obtido nas 3 fases indica que a concentração de N-NH_4^+ presente no NKT afluente permaneceu praticamente a mesma (60%) não sendo este um fator que veio a influenciar na concentração de N-NH_4^+ efluente. Possivelmente a maior eficiência e remoção de NKT e N-NH_4^+ na Fase 2 está relacionada à manutenção da concentração de OD no meio acima de 1 mg/L durante todo o ciclo de AI (Figura 4) e também ao maior período de adaptação da biomassa no reator ao processo de AI.

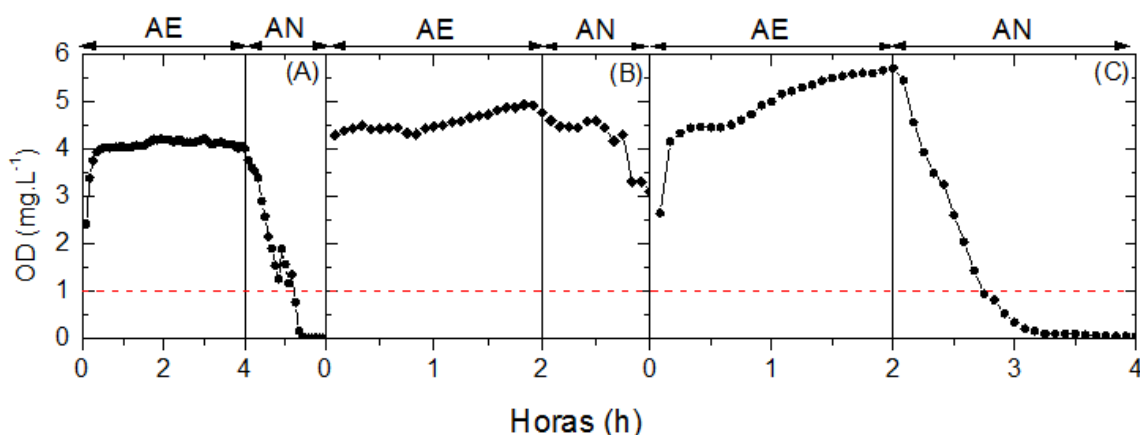


Figura 4. Concentração de OD durante um ciclo de AI na (A) Fase 1 (B) Fase 2 e (C) Fase 3.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se da Figura 4 que na Fase 2 a concentração de OD foi elevada durante o ciclo de AI, diferentemente das Fases 1 e 3 onde em pelo menos 50 minutos a concentração deste foi menor que 1 mg.L^{-1} . EPA (1993) indica que o processo de nitrificação pode ser limitado em concentrações de OD de $0,5 - 2,5 \text{ mg/L}$, sendo recomendados valores superiores a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para a completa nitrificação em sistemas de tratamento de efluentes (ECKENFELDER, 1989; WEF, ASCE, EWRI, 2005).

Não foram detectadas concentrações de N-NO_2^- e N-NO_3^- afluente. As concentrações de N-NO_2^- efluente em todas as fases foram abaixo de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, indicando que não houve acúmulo de nitrito no sistema. A concentração de N-NO_3^- variou muito, sendo as maiores concentrações obtidas na Fase 1. A

eficiência de desnitrificação obtida nas Fases 1, 2 e 3 foi de $70\pm 20\%$, $74\pm 15\%$ e $74\pm 18\%$, respectivamente, indicando que os organismos nitrificantes e desnitrificantes atuaram em conjunto em toda a operação do sistema. A coexistência e ação destes organismos na mesma unidade operacional pode ser explicada pela aderência destes organismos ao material suporte (biofilme) e a formação flocos.

A formação do biofilme ou floco pode criar resistência à difusão de OD e nutrientes que como consequência geram gradientes de concentração no meio que permitem que microrganismos executem diferentes vias metabólicas. No caso de sistemas de tratamento biológico que tratam efluentes com disponibilidade de nitrogênio e matéria orgânica, nas camadas externas do biofilme podem ser encontrados os organismos aeróbios responsáveis pela oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrato, e nas camadas internas os organismos desnitrificantes heterotróficos, que na falta de OD, utilizam N-NO_3^- como agente oxidante, completando o processo de desnitrificação biológica convencional (MANSER et al., 2005; FU et al., 2010; VIRDIS et al., 2011; GUADIE et al., 2014).

Devido a formação deste gradiente o processo de desnitrificação pode ocorrer em sistemas com elevadas concentrações de OD (YILMAZ et al., 2008; VIRDIS et al., 2011), o que viabiliza o processo de NDS no mesmo reator, sem prejudicar nenhum dos grupos envolvidos (WANG et al., 2008).

Alguns trabalhos que utilizam material suporte em sistemas biológicos que visam a remoção de nitrogênio, relatam a redução de nitrato em concentrações de OD superiores a 4 mg.L^{-1} , relacionando a viabilidade deste processo nestas concentrações de OD devido a existência de gradientes de concentração de substratos no biofilme formado no material suporte ou em flocos (GUO et al., 2005; YILMAZ et al.; 2008; VIRDIS et al.; 2010; VIRDIS et al.; 2011; MOURA et al; 2012; WOSIACK et al., 2015).

A relação C/N (DQO_T/NKT) média encontrada no sistema foi de 4 ± 2 na Fase 1, 6 ± 4 na Fase 2 e 3 ± 2 na Fase 3. A relação C/N afeta de maneira direta a fração de bactérias nitrificantes autotróficas e desnitrificantes heterotróficas no biofilme (OHASHI et al., 1995). Xia et al. (2010) relata que quanto maior a relação C/N maior a eficiência de NDS devido a não escassez de doadores de elétrons, o que resulta em um maior percentual de remoção de NT no sistema.

A fase que apresentou a melhor remoção de NT no reator foi a Fase 2, $68\pm 9\%$ (Figura 5), onde a maior relação C/N foi obtida. Em reatores operados com sistemas de AI, que favorecem o processo de NDS, a relação C/N necessária para que este processo ocorra com sucesso é superior ao desejado em reatores que visam apenas o processo de nitrificação, sendo estes valores próximos a 9 (FU et al., 2010).

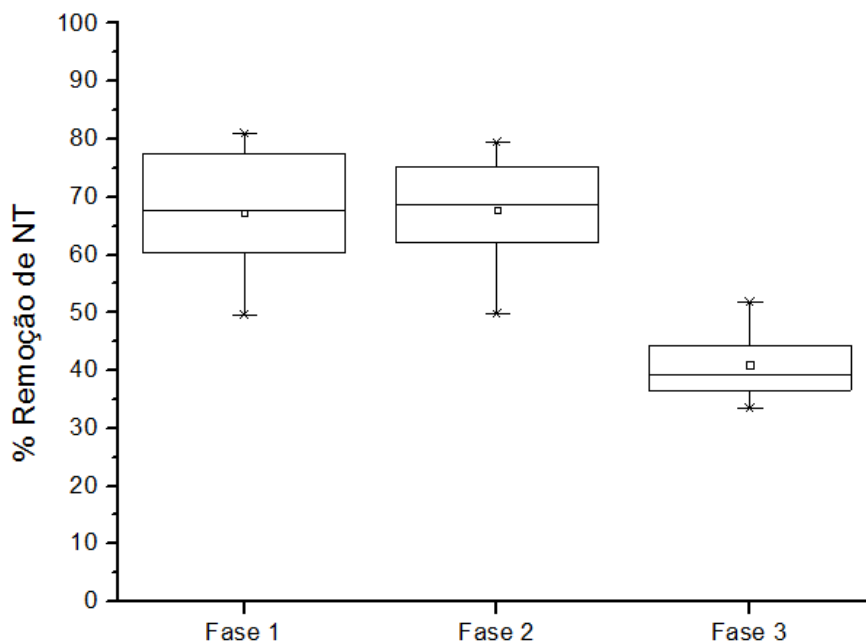


Figura 5. Box plot de distribuição dos percentuais de remoção de NT nas Fase 1, 2 e 3 de operação do reator.

Fonte: Autoria própria.

Fan et al., (2013) encontraram em sua pesquisa percentuais de remoção de 99% de nitrogênio e 96% DQO quando a relação C/N foi 10, constatando que em valores superiores o sistema não funcionou tão bem, possivelmente em decorrência da competição entre os organismos nitrificantes e heterotróficos por OD nas camadas externas do biofilme, sendo que os organismos heterotróficos se desenvolvem mais rápido do que os organismos nitrificantes autotróficos.

Observa-se na Figura 5 que os percentuais de remoção de NT nas Fases 1 e 2 foram muito próximos, porém na Fase 2 houve uma distribuição mais homogênea dos dados entorno da média. Da análise estatística aplicada aos resultados de remoção de NT, obteve-se que não houve diferença significativa entre os resultados na Fase 1 e 2 (p-valor: não significativo), porém

indicou diferença significativa entre os resultados obtidos entre a Fase 1 e 3 (p-valor < 0,01) e 2 e 3 (p-valor < 0,01), sendo a remoção de NT significativamente menor na Fase 3.

4.1.2 Remoção de Matéria orgânica

Na Tabela 2 são apresentados os resultados de DQO_T , DQO_F , DBO, carga orgânica e percentual de remoção de DQO_T e DBO durante o período de operação do reator.

Tabela 2. Média e desvio padrão de DQO_T , DQO_F , DBO, carga orgânica e percentual de remoção de DQO_T e DBO .

Fase	DQO_T (mg. L ⁻¹)		DQO_F (mg. L ⁻¹)		DBO (mg .L ⁻¹)		Carga orgânica KgN.m ⁻³ .d ⁻¹		% Remoção	
	Af	Ef	Af	Ef	Af	Ef	Aplicada	Removida	DQO_T	DBO
1	342±154	20±19	212±45	19±20	148±52	10±5	0,513±0,283	0,283±0,140	88±4	92±5
2	409±283	17±17	173±68	12±9	74±20	10±7	0,615±0,425	0,384±0,288	94±7	73±15
3	240±150	29±46	107±48	13±17	79±78	11±10	0,326±0,239	0,178±0,115	90±11	83±3

Fonte: Autoria própria.

De maneira geral todas as fases operacionais do sistema apresentaram baixas concentrações de DQO e DBO efluente, porém a Fase 2 foi a que apresentou as menores concentrações, com concentração de DQO_T e DBO efluente média de 17±17 mg.L⁻¹ e 10±7 mg.L⁻¹, respectivamente, com percentual de remoção de 94±7% de DQO_T e 94±7% de DBO. Na Figura 6 é apresentado um gráfico box plot do percentual de remoção de DQO_T das 3 fases trabalhadas. Observando a figura constata-se a maior homogeneidade dos dados em torno da média na Fase 2, demonstrando que nesta fase o sistema operou de maneira estável.

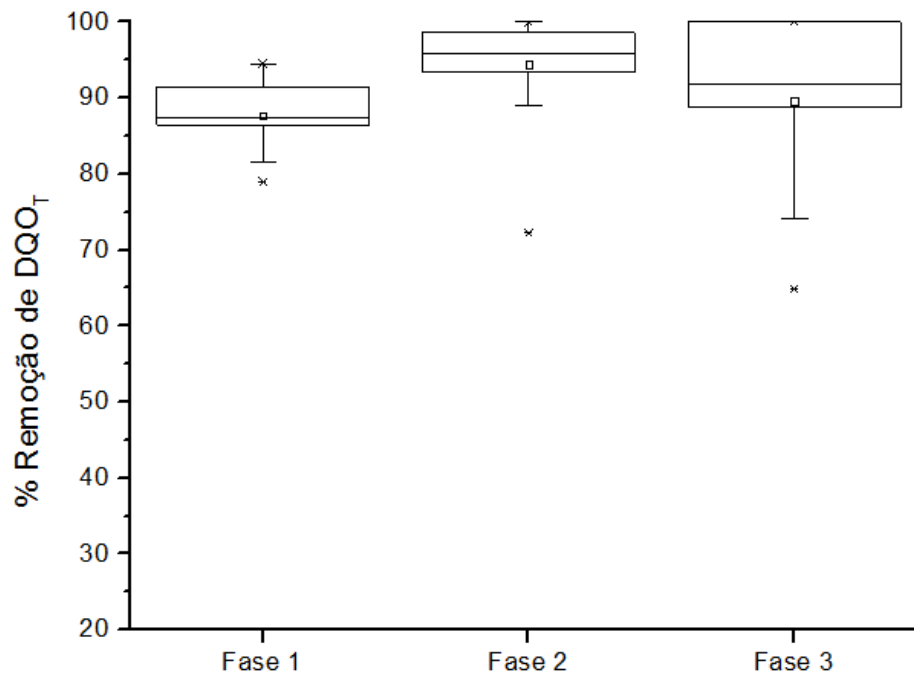


Figura 6. Gráfico box plot de distribuição dos percentuais de remoção de DQO_T nas Fase 1, 2 e 3 de operação do reator.

Fonte: Autoria própria.

Para a processo de remoção de nitrogênio a fase que apresentou o maior percentual de remoção de matéria orgânica foi a operada com a maior concentração de OD durante toda a operação do ciclo de AI como no trabalho de Wosiack et al., (2015) e Asadi et al., (2012), que indicam que a atividade das bactérias heterotróficas é superior em períodos onde a disponibilidade de OD é maior.

Da análise estatística aplicada aos dados de remoção de DQO_T obteve-se que não houve diferença significativa entre os dados de remoção de matéria orgânica entre a Fase 1 e 3 e 2 e 3, porém entre a Fase 1 e 2 foi obtido diferença significava entre os dados com p-valor < 0,01, sendo a remoção de matéria orgânica significativamente maior na Fase 2.

4.2 BACTÉRIAS NITRIFICANTES E DESNITRIFICANTES PRESENTES EM REATOR DE LEITO ESTRUTURADO SUBMETIDO A DIFERENTES CICLOS DE AERAÇÃO INTERMITENTE (AI)

4.2.1 NMP.gSSV⁻¹ das Bactérias Nitrificantes (BOA e BON) e Desnitrificantes (DESN)

Na Tabela 3 são apresentados os resultados para análise multivariada do NMP.gSSV⁻¹ das bactérias nitrificantes e desnitrificantes, meios (MS, EF e LD) nas 3 fases analisadas (Fase 1, 2 e 3). Devido a elevada ordem de grandeza dos resultados para NMP.gSSV⁻¹ os dados foram analisados tomando a raiz quadrada destes, para facilitar a sua apresentação e visualização nos gráficos.

Tabela 3. Resultados da Análise de Variância Fatorial para as estimativas dos (NMP.gSSV⁻¹)^{1/2} das bactérias nos diferentes Grupos (BOA, BON e DESN), Meios (MS, EF e LD) e Fases (Fase 1, 2 e 3).

	GL (efeito; erro)	*(NMP.gSSV ⁻¹) ^{1/2}	
		F	P
Grupos	2; 45	128,0	<0,01
Meios	2; 45	84,1	<0,01
Fases	2; 45	19,8	<0,01
Grupos*Meios	4; 45	90,5	<0,01
Grupos*Fases	4; 45	19,3	<0,01
Meios*Fases	4; 45	20,4	<0,01
Grupos*Meios*Fases	8; 45	20,2	<0,01

*Raiz quadrado do NMP.gSSV⁻¹ dos dados originais.

Fonte: Autoria própria.

Os efeitos dos grupos, meios e fases sobre as médias dos NMP.gSSV⁻¹ das bactérias no presente estudo revelaram efeitos isolados significativos, bem como interação par a par e interação significativa entre os três parâmetros (Tabela 3; $F_{8;45} = 20,2$; $p < 0,01$). Portanto, as diferenças entre as médias dos NMP.gSSV⁻¹ detectadas entre os grupos, não dependem de fatores isolados, mas sim de quais meios e fases estejam sendo considerados. Na Figura 7 são apresentados os gráficos com os dados obtidos na ANOVA, média e erros padrões dos NMP.gSSV⁻¹ entre os tratamentos.

Na Figura 7A observa-se que há diferença significativa ($F_{2;45} = 128,0$; $p < 0,01$) entre as médias dos NMP.gSSV⁻¹ entre os diferentes grupos de bactérias analisados (Nitrificantes – BOA/BON e desnitrificantes - DESN), com destaque para os valores elevados das bactérias desnitrificantes.

No tratamento de esgoto sanitário segundo Souza e Foresti (1999) o processo de desnitrificação ocorre frequentemente pela ação de bactérias heterotróficas facultativas, que na ausência de oxigênio utilizam o NO_3^- como acceptor final de elétrons.

A diferença da taxa específica de crescimento específico entre o grupo de bactérias autotróficas e heterotróficas pode explicar as elevadas concentração de bactérias desnitrificantes em relação às nitrificantes. A taxa de crescimento das BOA e BON é de até 0,76 e 0,84 d^{-1} respectivamente, já a das bactérias heterotróficas aeróbias chega a 4,8 d^{-1} (RITTMANN e SNOEYINK, 1984; WATANABE et al., 1992).

Da Figura 7B verifica-se que houve diferença significativa ($F_{2;45} = 84,1$; $p < 0,01$) entre as médias dos NMP.gSSV^{-1} em relação aos diferentes meios (MS, EF e LD), com destaque para os valores elevados das bactérias presentes no lodo (LD). Possivelmente esta maior concentração está relacionada à elevada concentração de bactérias desnitrificantes presentes neste.

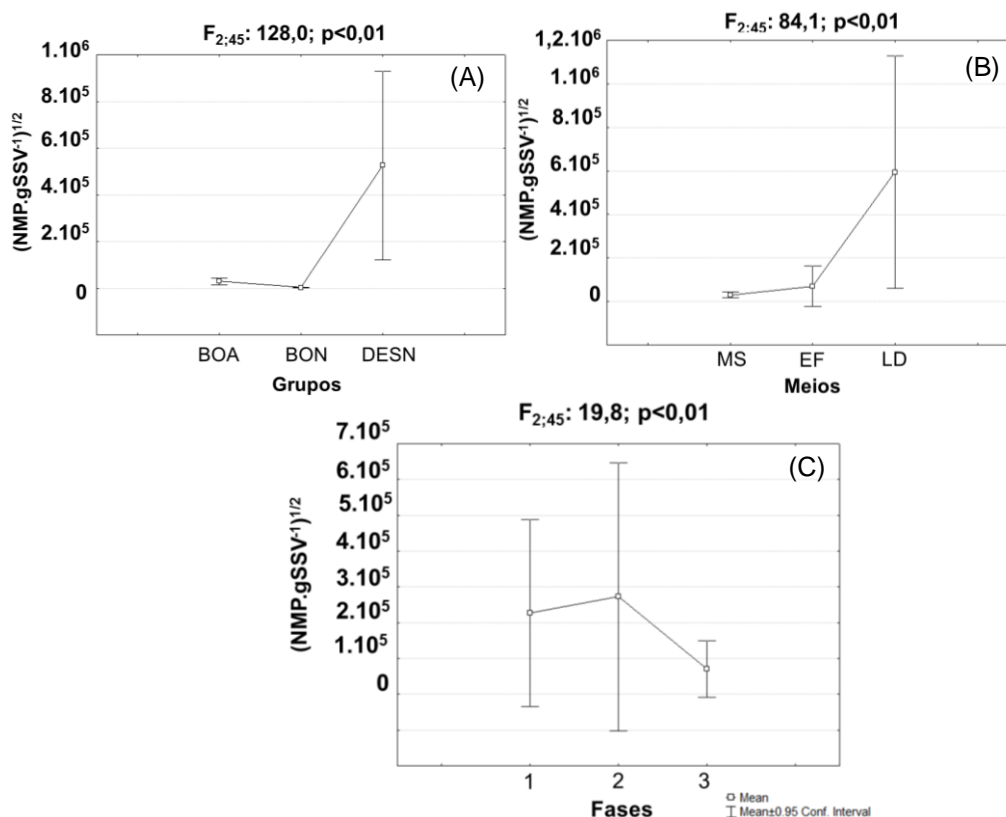


Figura 7. Resultado da ANOVA, médias e erros padrões do $(\text{NMP.gSSV}^{-1})^{1/2}$ (A) das bactérias nitrificantes (BOA e BON) e desnitrificantes; (B) das bactérias analisadas entre os meios MS, EF e LD, e (C) das bactérias analisadas entre as fases 1, 2 e 3.

Fonte: Autoria própria.

Em sistemas com elevadas concentrações de OD, o processo de desnitrificação convencional geralmente ocorre no MS (biofilme) em suas camadas inferiores ou no LD, onde ocorre a formação de flocos que viabilizam a existência de ambientes anaeróbio/anóxico em suas camadas inferiores.

Zhang et al., (2015) avaliando a diversidade das bactérias desnitrificantes no lodo e no biofilme, constataram que estas bactérias estavam presentes em ambos os meios, porém eram mais abundantes no lodo, onde ficam em suspensão podendo movimentar-se no sistema, com a vantagem de ter maior disponibilidade de alimento.

Segundo Nogueira et al., (2002) em sistemas com disponibilidade de C e N a diversidade de bactérias heterotróficas em suspensão é maior do que aderidas, pois quando estas encontram-se fixas, principalmente em camadas externas do biofilme, ficam expostas a condições de elevado estresse, por isso apenas as BH com elevadas taxas de crescimento se mantem nestas condições, enquanto as outras espécies ficam em suspensão.

Na Figura 7C observa-se que as fases estudadas influenciaram na concentração dos organismos analisados ($F_{4,45} = 19,3$; $p < 0,01$). As concentrações mais elevadas dos organismos analisados foram encontradas nas Fases 1 e 2, com destaque para a Fase 2, enquanto na Fase 3 os valores foram significativamente menores.

A maior concentração de organismos presentes principalmente na Fase 2 é condizente com os maiores percentuais de remoção de NKT

Os resultados indicam que a atividade dos organismos nitrificantes autotróficos e desnitrificantes heterotróficos foram favorecidas na Fase 2, isto possivelmente em decorrência das condições do meio, como disponibilidade de OD, elevada idade do lodo e substratos em concentrações suficientes para a viabilidade dos processos de nitrificação e desnitrificação.

Na Fase 1 a concentração média de OD em cada ciclo de AI foi de $2,7 \pm 1,6 \text{ mg.L}^{-1}$, na Fase 2 de $4,3 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e na Fase 3 de $3,1 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Quanto maior a disponibilidade de OD maior será o desenvolvimento dos microrganismos nitrificantes, visto a dependência de OD para o seu desenvolvimento. Palma e Manga (2005) e Rodrigues et al., (2011) em suas pesquisas apontam que a concentração de OD no meio influencia de maneira direta a concentração de bactérias nitrificantes, havendo uma correlação linear

entre a concentração destes microrganismos e a concentração de OD, sendo que quanto maior a disponibilidade de OD maior a concentração de bactérias nitrificantes.

Dos percentuais de nitrificação e desnitrificação obtidos no reator e das concentrações de biomassa nitrificante e desnitrificantes, supõe-se que o processo de NDS possa ter ocorrido, visto a coexistência destes organismos de diferentes metabolismos na mesma unidade.

Aponta-se que os organismos nitrificantes e desnitrificantes coexistiram no MS - formando biofilme e em flocos no LD. Estes organismos possivelmente se desenvolveram em diferentes camadas do biofilme e do LD formando gradientes de nutrientes e OD, devido ao crescimento e adesão de novas células.

Nas camadas mais externas do biofilme e flocos são encontrados os organismos nitrificantes e nas camadas mais internas os desnitrificantes que na falta de OD utilizam os produtos do metabolismo dos organismos nitrificantes para o seu processo metabólico (GUO et al., 2005; FU et al., 2010; XIA et al., 2010; VIRDIS et al., 2011), viabilizando o processo de NDS.

Foi realizada uma ANOVA: um critério no $NMP.gSSV^{-1}$ das BOA e BON, afim de verificar se havia diferencia significativa entre a concentração destes microrganismos durante a operação do reator. Na Figura 8 são apresentados os resultados da ANOVA, médias e erros padrões $NMP.gSSV^{-1}$ das BOA e BON.

A ANOVA indica que existe diferença significativa entre a concentração de BOA e BON ($F= 14,32$, $p<0,01$) sendo a média ($NMP.gSSV^{-1}$)^{1/2} das BOA maior que a das BON. Este resultado pode estar relacionado à energia liberada na oxidação do nitrogênio, visto que a energia estimada para a oxidação de N-amoniacal a nitrito situa-se entre 58 e 84 kcal/mol de amônia oxidada e a energia livre pela oxidação de nitrito a nitrato, gira em torno de 14,4 a 20,9 kcal/mol de nitrito (EPA, 1993).

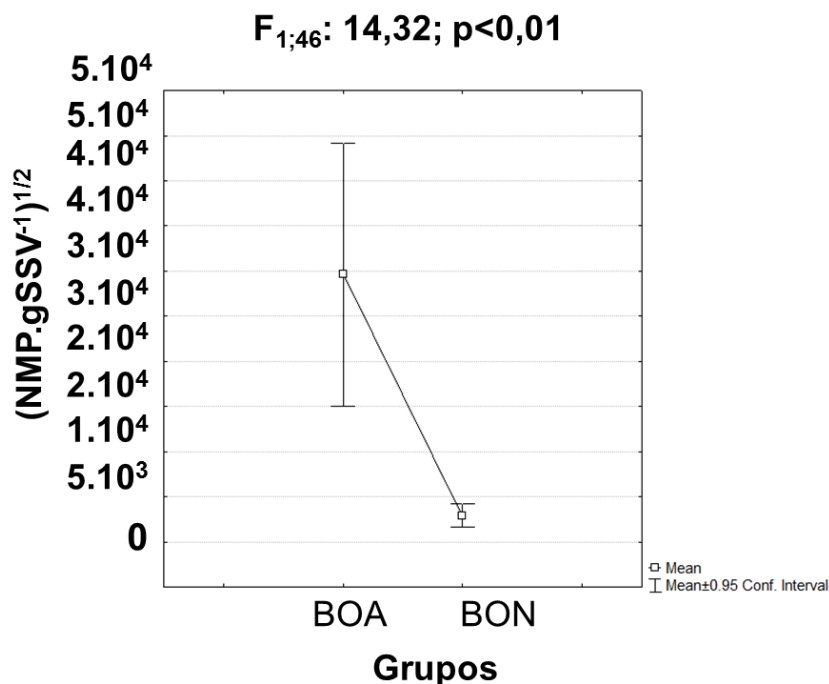


Figura 8. Resultado da Anova, médias e erros padrões do $(\text{NMP.gSSV}^{-1})^{1/2}$ das bactérias nitrificantes (BOA e BON).

Fonte: Autoria própria.

Do exposto constata-se que as BOA podem obter mais energia na oxidação de amônia do que as BON, o que resulta em maior produção de biomassa, visto que a quantidade de células produzidas é proporcional a quantidade de energia disponível (EPA, 1993). Liu e Wang (2012) registraram um coeficiente de crescimento de 0,18 gSSV/g N-NH₃ para as BOA e para as BON de 0,06 gSSV/g N-NO₂, o que evidencia o maior crescimento das BOA em relação as BON.

Na Figura 9 encontra-se o gráfico para ANOVA multivariada, média e erros padrões dos NMP.gSSV-1 da interação entre os tratamentos.

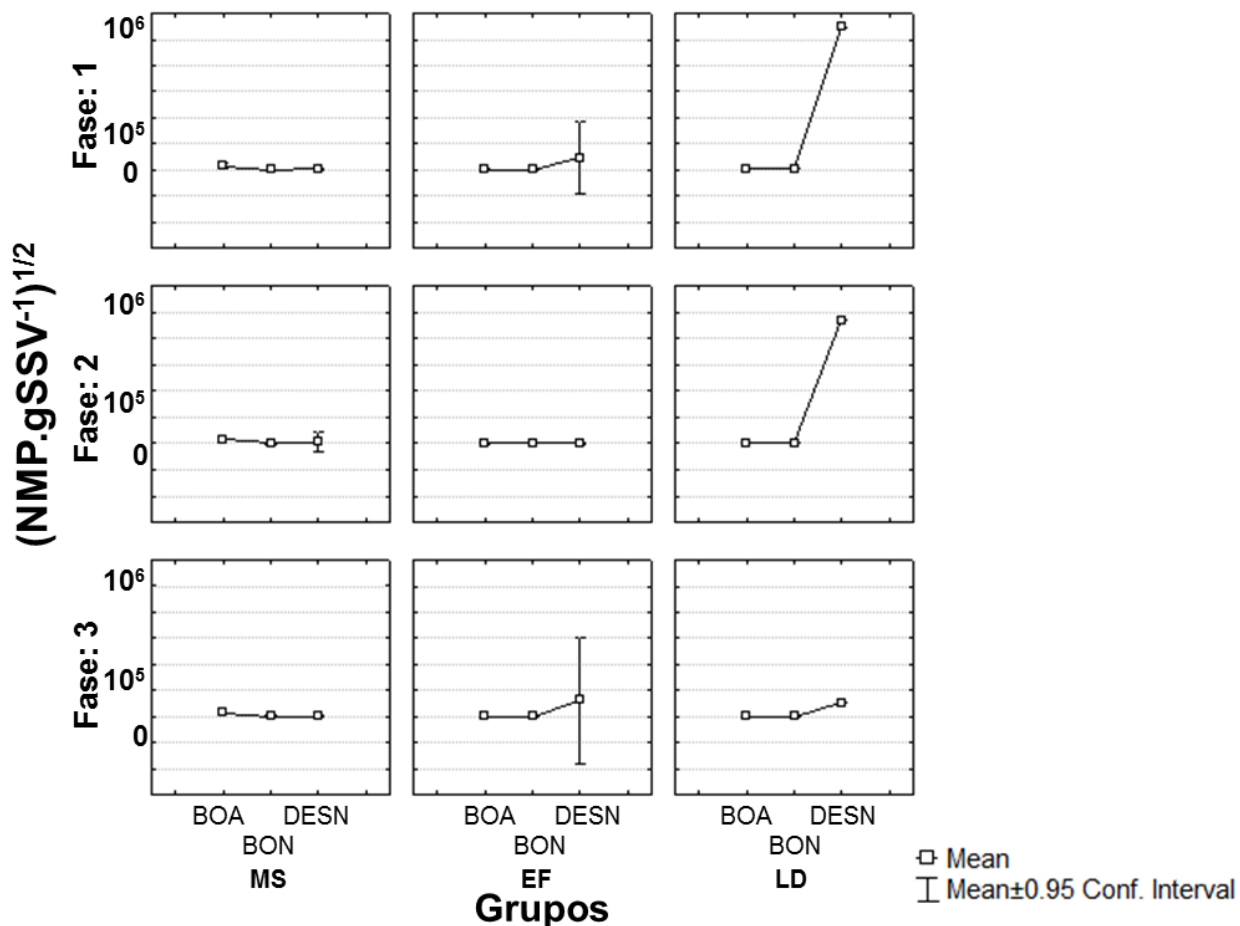


Figura 9. Resultado da ANOVA Fatorial, média e erro padrão dos $(\text{NMP.gSSV}^{-1})^{1/2}$ das bactérias entre os grupos BOA, BON e DESN e os meios (MS, EF e LD) e Fases (1, 2 e 3). Fonte: Autoria própria.

Na Figura 9 pode ser observado que a concentração de bactérias nitrificantes e desnitrificantes presentes no MS em todas as fases analisadas não sofreram variações significativas, indicando que o MS utilizado no leito do reator favoreceu a permanência dos grupos analisados no sistema, permitindo que os mesmos se mantivessem mesmo nos diferentes ciclos de AI.

Na Tabela 4 são apresentadas as médias do NMP.gSSV^{-1} das BOA, BON e DESN nos três meios analisados (MS, EF e LD) e nas fases trabalhadas (1, 2 e 3)

Sistemas que operam com biomassa imobilizada favorecem o desenvolvimento de organismos nitrificantes, pois permitem que estes organismos de lento crescimento, se desenvolvam e permaneçam no sistema por mais tempo (LEYVA-DÍAZ et al., 2013; KIM et al., 2013; REBOLEIRO-RIVAS et al., 2015).

Tabela 4. Médias do NMP.gSSV⁻¹ das BOA, BON e DESN nos três meios analisados (MS, EF e LD) e nas fases trabalhadas (1, 2 e 3).

FASES	NMP.gSSV ⁻¹								
	BOA			BON			DESNITRIFICANTES		
	MS	EF	LD	MS	EF	LD	MS	EF	LD
1	6.10 ⁹	9.10 ⁶	7.10 ⁹	4.10 ⁷	2.10 ⁴	7.10 ⁷	1.10 ⁸	2.10 ¹¹	7.10 ¹²
2	5.10 ⁹	5.10 ⁸	5.10 ⁹	3.10 ⁷	1.10 ⁵	5.10 ⁵	7.10 ⁸	3.10 ⁶	5.10 ¹²
3	4.10 ⁹	9.10 ⁷	4.10 ⁸	2.10 ⁷	1.10 ⁵	8.10 ⁵	5.10 ⁷	3.10 ¹¹	7.10 ¹⁰

Fonte: Aatoria própria, 2015

O fato da concentração dos organismos aderidos variarem menos do que os organismos presentes no meio, pode ser explicado pela proteção às condições ambientais adversas, fornecida pelo biofilme aos organismos aderidos, pois estes sofrem menos as variações ambientais como temperatura, pH, produtos metabólicos e substâncias tóxicas, do que culturas suspensas (FLEMMING e WINGENDER, 2010; GUELLI e SOUZA, 2012; REBOLEIRO-RIVAS et al., 2013).

4.3 CONCENTRAÇÃO DE PLT, PT E STVA

Na Tabela 5 são apresentadas as médias da concentração de PLT, PT e STVA durante as fases analisadas. Na Figura 10 são apresentados os resultados para PLT, PT e STVA durante as 3 fases operadas no reator.

Tabela 5. Médias da concentração de Polissacarídeos Totais Aderidos (PLT), Proteínas Totais (PT) e Sólidos Totais Voláteis Aderidos (STVA) durante as fases analisadas (1, 2 e 3).

FASES	PLT (mg. L ⁻¹)	PT (mg. L ⁻¹)	STVA (mg. L ⁻¹)
1	48±19	37±12	201±70
2	34±12	46±9	209±47
3	38±4	55±5	230±33

Fonte: Aatoria Própria.

Na Figura 10 verifica-se uma tendência linear nas concentrações de PLT, PT e STVA, o que demonstra que a variação nos ciclos de AI, não influenciou de maneira expressiva a concentração de biomassa aderida.

Da análise estatística (ANOVA: um critério) aplicada aos dados de PLT, PT e STVA confirma-se a hipótese de que não houve diferença significativa (p -valor $> 0,05$) entre os dados em ambas as fases, ou seja, a análise estatística mostra que os diferentes ciclos de AI não vieram a interferir significativamente na concentração de biomassa aderida.

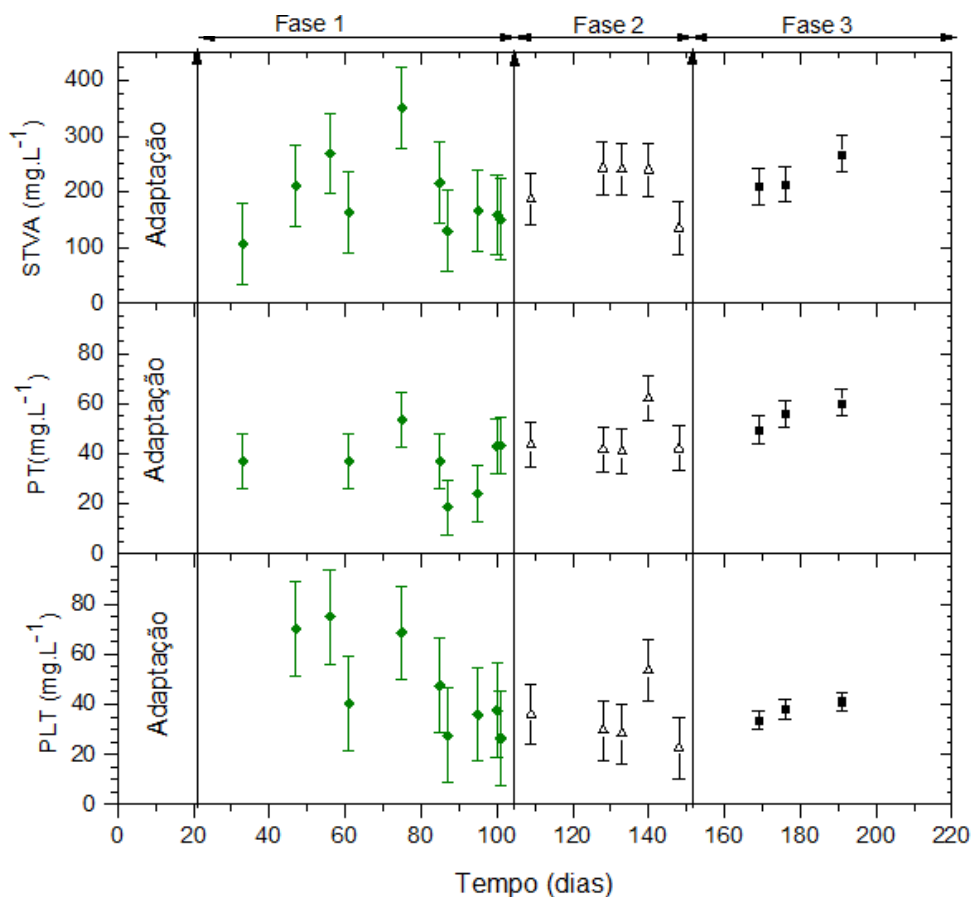


Figura 10. Concentração média de PLT, PT e STVA durante as 3 fases trabalhadas.
Fonte: Autoria própria.

A quantidade de biomassa fixa ao MS não é proporcional à atividade do biofilme, porém a atividade deste pode elevar-se com o aumento da biomassa aderida até um determinado nível, chamado de espessura ativa. Acima desta espessura o consumo de substrato pode ser prejudicado ao longo do biofilme, dificultando a difusão de substratos e OD, ao longo das camadas, diminuindo por consequência sua atividade. Com isto ocorre o enfraquecimento da matriz e fragmentos podem desprender-se desta (LAZAROVA E MANEN, 1995; TELGMANN et al., 2004).

Do exposto aponta-se que esta pode ter sido uma das causas para a diminuição na concentração da biomassa aderida ao MS em alguns pontos,

durante as análises. Outros fatores ambientais também podem ter afetado o destacamento do biofilme e diminuição da biomassa aderida, como os fatores biológicos, físicos e químicos.

4.4 MICROSCOPIA

Na Figura 11 são apresentadas imagens obtidas na MEV do MS ao fim de cada Fase. Na superfície externas do MS foi observada grande quantidade de microrganismos aderidos em todas as fases (Figura 11A). A superfície interna (Figura 11B) também estava totalmente recoberta, porém havia menos microrganismos aderidos do que na superfície externa.

Materiais suporte com superfícies de contato irregulares e porosas, com elevada área de contato superficial potencializam a excreção de polissacarídeos pelos microrganismos, proporcionando condições perfeitas para o estabelecimento do biofilme (SUTHERLAND, 2001).

O crescimento e espessura do biofilme normalmente são influenciados pelas condições hidrodinâmicas e pelas cargas orgânicas aplicadas. A presença de MS pode favorecer a distribuição das bactérias que apresentam taxa de crescimento mais acelerado nas camadas superiores do biofilme (onde a passagem do substrato e o desprendimento dos microrganismos é maior) (OKABE, et al.1996).

Em todas as fases na superfície externa do MS visualizou-se protozoários ciliados fixos (Figura 11B e 11C), semelhantes à *Vorticella* e *Epistyllis*. Os ciliados como *Vorticella* são capazes de se desenvolver em retransias no biofilme, ficando protegidos da abrasão (FRIED e LEMMER, 2002). Estes organismos segundo Jenkins et al. (1993), quando encontrados formando colônias apontam que o sistema está operando estavelmente e com TRC elevado. Os ciliados fixos do gênero *Epistyllis* segundo Canals et al., (2013) pode ser considerado como um bom bioindicador de nitrificação em sistemas de tratamento.

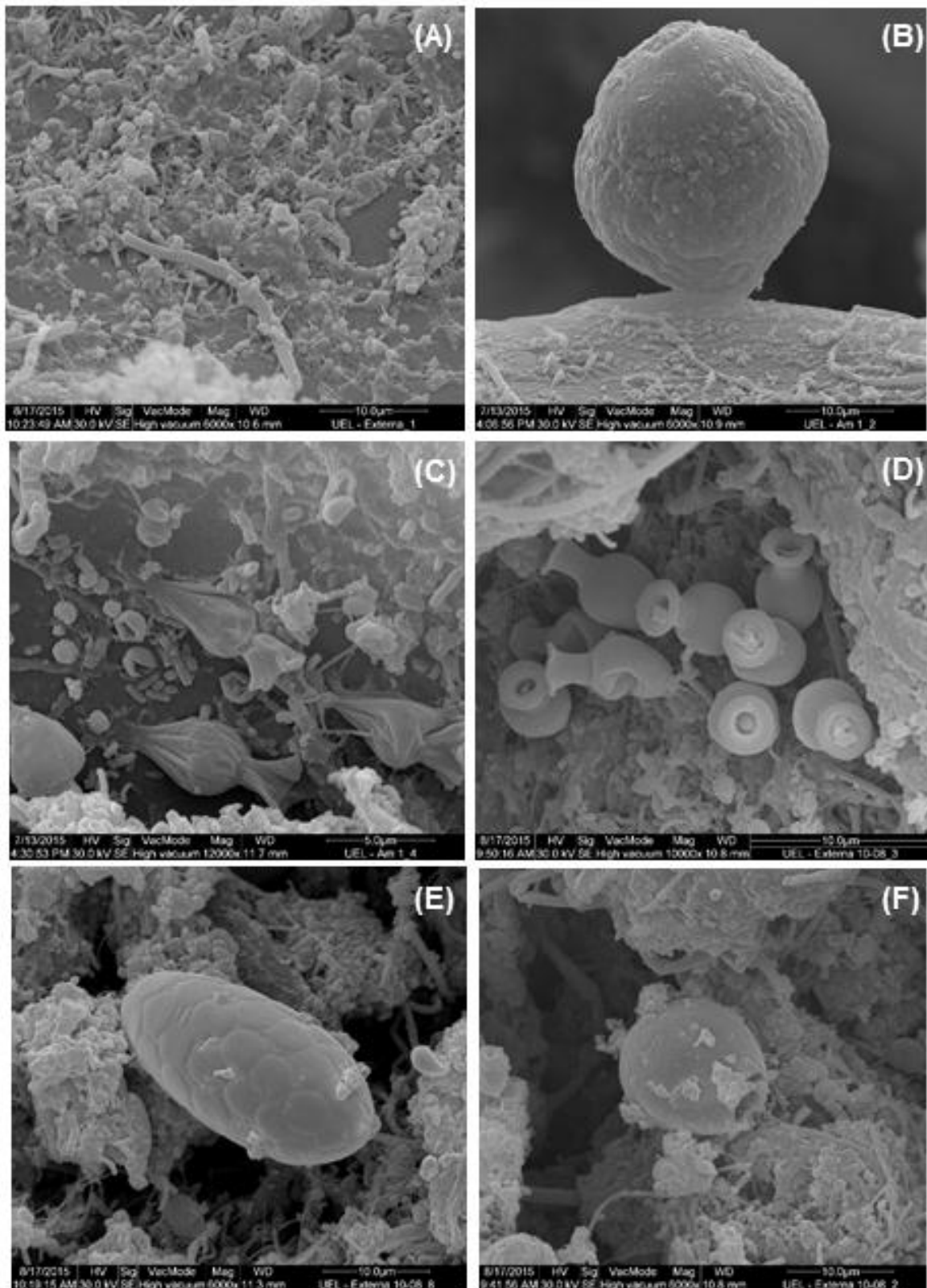


Figura 11. MEV realizada na superfície externa (A, C, D, E e F) e interna (B) do material suporte.

Legenda: (A) superfície interna (B) superfície externa com protozoário fixo (C) ciliado fixo (Possivelmente *Vorticella*) (D) ciliado fixo (*Epistyllis*) (E) Tecameba (*Euglypha tuberculata*) (F) Tecameba (*Arcella*).

Fonte: Autoria própria.

Na Fase 1 e 2 foram observados na superfície externa do biofilme além de protozoários ciliados fixos, amebas semelhantes ao gênero *Euglypha tuberculata* (Figura 11E) e *Arcella* (Figura 11F). Encontrar estes organismos no sistema indica boas condições de depuração, elevado TRC e condições favoráveis a nitrificação (SASAHARA e OGAWA, 1983; MADONI et al., 1993; BENTO et al., 2005).

Na microscopia à fresco do LD foi notada elevada diversidade de microrganismos em todas as análises. Foram observadas com frequência bactérias filamentosas, ciliados fixos e livres, amebas com teca e micrometazoários como rotíferos.

Estes organismos assinalam que o sistema operou sob boas condições de depuração, com ocorrência de nitrificação (FIGUEIREDO e DOMINGUES, 1997; BENTO et al., 2005). Nas Fases 2 e 3 foi possível ver além dos microrganismos citados, anelídeos e *Aspidisca*.

O aparecimento dos organismos citados como as tecamebas (*Arcella* e *Euglypha*) e *Aspidisca* mostra que nas Fases 2 e 3 o sistema operou com alto grau de estabilidade biológica, elevado TRC e boas condições de remoção de matéria orgânica (BENTO et al., 2005).

5 CONCLUSÃO

Dos resultados conclui-se que o tipo de reator estudado (reator de leito estruturado) foi eficiente em termos de remoção de N-NH_4^+ (acima de 70%) e matéria orgânica (acima de 80%) em todos os ciclos de AI trabalhados. A Fase 2 foi a que apresentou as menores concentrações médias efluente de NKT, N-NH_4^+ e N-NO_2^- , tendo como resultado os maiores percentuais de remoção de NKT, N-NH_4^+ e NT. Possivelmente o maior percentual de remoção destes compostos está relacionado à maior concentração de OD durante o ciclo de AI na Fase 2 (2 h AE/ 1 AN) e da maior relação C/N obtida nesta fase

Obteve-se houve diferença significativa entre a concentração $(\text{NMP} \cdot 100\text{mL}^{-1})^{1/2}$ dos organismos analisados (nitrificantes e desnitrificantes) nos diferentes ciclos de AI trabalhados, porém a análise estatística aponta que

as diferenças entre os valores obtido não depende de fatores isolados e sim de quais meios, fases e grupos estão sendo considerados.

Os microrganismos observados na microscopia indicaram que o sistema operou sob condições estáveis de depuração e nitrificação durante todo o seu período operacional.

REFERENCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standards Methods for the Examination of Water e Wastewater. Washington, D.C; 2005.

AHN, Y, H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process biochemistr**, v. 41, 1709–1721p, 2006.

ARAÚJO J.R., ZAIAT, M. An upflow fixed-bed anaerobiceaerobic reactor for removal of organic matter and nitrogen from L-lysine plant wastewater. **Can. J. Civ. Eng.** v.36, p. 1085 -1094, 2009.

ASADI, A., ZINATIZADEH, A.A., HASNAIN, I.M. Performance of intermittently aerated up-flow sludge bed reactor and sequencing batch reactor treating industrial estate wastewater: a comparative study. **Bioresour. Technol.** v.123, p. 495-506, 2012.

BARANA, A.C., LOPES, D.D., MARTINS, T.H., POZZI, E., DAMIANOVIC, M.H.R.Z., DEL NERY, V., FORESTI, E. Nitrogen and organic matter removal in an intermittently aerated fixed-bed reactor for post-treatment of anaerobic effluent from a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Journal of Environmental Chemical Engineering.** v.1, p.453-459, 2013.

BENTO, A. P., SEZERINO, P. H., PHILIPPI, L. S., REGINATTO, V., LAPOLLI, F. R. Caracterização da microfauna em estação de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados: um instrumento de avaliação e controle do processo. **Eng. sanit. Ambient**, v.10, n. 4, p. 329-338, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry.** v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMMAROTA, M. C. Produção de exopolímeros e adesão microbiana, Tese de D.Sc, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998.

CAMPOS, J.L., CARVALHO, S., PORTELA, R., MOSQUERA, A., MENDEZ, R. Kinetics of denitrification using sulphur compounds: effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. **Bioresource Technology.** v.99, p.1293–1299, 2008.

CANALS, O; SALVADO, H., AUSET, M., HERNÁNDEZ, C., MALFEITO, J.J. Microfauna communities as performance indicators for an A/O Shortcut Biological Nitrogen Removal moving-bed biofilm reactor. **Water research**.v. 47, p.3141-3150, 2013.

CAPODICI, M., DI BELLA, G., DI TRAPANI, D., TORREGROSSA, M. Pilot scale experiment with MBR operated in intermittent aeration condition: Analysis of biological performance. **Bioresour Technol.** p.177, 398-405, 2015. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.075.

CHANG, Y.J., TSENG, S.K. A novel double-membrane system for simultaneous nitrification and denitrification in a single tank. **Lett Appl Microbiol.** v.28, n.6, p.453-6, 1999.

COLLIVIGNARELLI, C., BERTANZA, G. Simultaneous nitrification-denitrification processes in activated sludge plants: Performance and applicability. **Water Science and Technology.** v.40, p.187–194, 1999. doi:10.1016/S0273-1223(99)00575-2.

DANIEL L.M.C., POZZI, E., FORESTI, E., CHINALIA, F.A.. Removal of ammonium via simultaneous nitrification-denitrification nitrite-shortcut in a single packed-bed batch reactor. **Bioresour Technol.** v.100, n.30, p.1100-1107, 2009. doi:10.1016/j.biortech.2008.08.003.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K. ET AL. Colorimetric method for determination of sugars and substances. **Analytical Chemistry.** v.28, n.3, p.350-356, 1956..

ECKENFELDER. W.W. Industrial water pollution control. 2 ed, McGraw-Hill, Singapura,1986.

EPA. Manual: Nitrogen Control. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1993.

FAN, J., WANG, W., ZHANG, B., GUO, Y., NGO, H. H., GUO, W., ZHANG, J., WUA H. Nitrogen removal in intermittently aerated vertical flow constructed wetlands: Impact of influent COD/N ratios. **Bioresour Technol.** v.143, p.461–466, 2013. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.038.

FIGUEIREDO, M. G., DOMINGUES, V. B. Microbiologia de Lodos Ativados. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo: CETESB, 1993.

FLEMMING, H.C., WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* v.8, p.623–633, 2010.

FRIED, J., LEMMER, H. On the dynamics and function of ciliates in Sequencing Batch Biofilm Reactors (SBBR). (2002). In: International Specialized Conference on Biofilm Monitoring. Porto- Portugal. Edition électronique, p.299-302, 2002.

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.* v.26, n.11, p.1981- 1990, 2010. doi: 10.1007/s11274-010-0382-y.

GUADIE, A., XIA, S., ZHANG, Z., ZELEKE, J., GUO, W., NGO, H.H., HERMANOWICZ S.W. Effect of intermittent aeration cycle on nutrient removal and microbial community in a fluidized bed reactor-membrane bioreactor combo system. *Bioresour Technol.* v.156, p. 195-205, 2014. doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.008.

GUELLI, U., SOUZA, S.M.A. Application of biofilm in the degradation of contaminants in industrial effluents—a review. *Open J. Biochem. Biotechnol.* 1, p.1–10, 2012.

GULIS G., CZOMOPOLYOVA, M., CERHAN, J.R. An ecology study of nitrate in municipal drinking water and cancer incidence in Tarnava district, Stovakia. *Environmental Research.* v.88, p.182-187, 2002.

GUO, J., ZHANG, L., CHENG, W., MA, F., LIU, H., TIAN, Y.. The regulation and control strategies of a sequencing batch reactor for simultaneous nitrification and denitrification at different temperatures. *Bioresour Technol.* v.133, p.59–67, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.026.

HENZE, M., HARREMOES, P., ARVIN, E., JANSEN, J.L.E. **Wastewater treatment: biological and chemical processes.** Berlin, Springer-Verlag, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Atlas de saneamento. 2011.

JENKINS, D., RICHARD, M. D., DAIGGER G. T. Manual on the causes and control of activated bulking and foaming. Lewis Publishers: United States, 1993

KIM, Y.M., PARK, H., CHO, K. H., PARK, J. M. Long term assessment of factors affecting nitrifying bacteria communities and N-removal in a full-scale biological process treating high strength hazardous wastewater. **Bioresour. Technol.** v.13, p.180–189, 2013.

KOTLAR, E., TARTAKOVSKY, B., ARGAMAN, Y., SHEINTUCH, M. The nature of interaction between immobilized nitrification and denitrification bacteria. **Journal of Biotechnology.** v.51, p.251-258, 1996.

LAMEGO NETO, L. G.; COSTA, R. 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). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.16, n.4, p. 411-420, 2011.

LAZAROVA, V., MANEM, J. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. **Water Science and Technology.** v.29, n.10, p. 2227-2245, 1995.

LEYVA-DÍAZ J.C., CALDERÓN, K., RODRÍGUEZ, F. A., GONZÁLEZ-LÓPEZ, J., HONTORIA, E., POYATOS, J. M. Comparative kinetic study between moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor and membrane bioreactor systems and their influence on organic matter and nutrients removal. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p.28-40, 2013.

LIU, G., WANG, J. Probing the stoichiometry of the nitrification process using the respirometric approach. **Water ReSearch.** v.46, p.5954-5962, 2012.

MADONI, P., DAVOLI, D., CHIERICI, E. Comparative analysis of the Activated Sludge Microfauna in Several Sewage Treatment Works. **Wat.Res.** v. 27, n.9, p.1485-1491, 1993.

MANSER, R., GUJER, W. SIEGRIST, H. Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers. **Water Res.** v.39, n.19, p.4633-42, 2005.

MAYER, M., SMEETS, W., BRAUN, R.E., FUCHS, W. Enhanced ammonium removal from liquid anaerobic digestion residuals in an advanced sequencing batch reactor system. **Water Sci Technol.** v.60, n.7, p.1649-60, 2009. doi: 10.2166/wst.2009.546.

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

MOCKAITIS, G., PANTOJA, J.L.R., RODRIGUES, J.A.D., FORESTI, E., ZAIAT, M., Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess Biosyst Eng.** v.37, p.1361–1368, 2014. doi: 10.1007/s00449-013-1108-y.

MOURA, R.B., DAMIANOVIC, M. H. R. Z., FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. **J. Environ. Manage.** v.98, p.163 – 167, 2012. doi:10.1016/j.jenvman.2012.01.009

NOGUEIRA, L.R., MELO, L. F., PURKHOLD, U., STEFAN, W., WAGNER, M. Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. **Water Research.** v.36, p.469–481, 2003.

OHASHI A., VIRAJ DE SILVA, D. G., MOBARRY, B., MANEM, J. A., STAHL, D. A., RITTMANN, B. E. Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. **Water Science and Technology.** v.32, n.8, p.75–84, 1995. doi:10.1016/0273-1223(96)00010-8.

OKABE, S., HIRATIA, K., OZAWA, Y., WATANABE, Y. Spatial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms. **Biotechnology and Bioengineering.** v.50, p.24-35, 1996.

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

OLIVEIRA, A. C. DEL G., BLAICH, C. I., LOPES, D. D., SANTANA, S. V., PRATES, K. P. NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes e sua relação com os parâmetros físico-químicos em lodo ativado para remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário. **Revista DAE.** v.192, p.60-69, 2013.

PALMA, M. J., MANGA, J. Simulación de un sistema de lodos activados en discontinuo (SBR) para el tratamiento de aguas residuales con altos contenidos de nitrógeno. **Ingeniería Desarrollo.** v.18, p.61–71, 2005.

PAREDES, D., KUCHK, P., MBWETTE, T.S.A., STANGE, F., MULLER, R.A., KOSER, H. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment – A Review. **Eng. Life Sci.** v.7, n.1, p.13–25, 2007.

REBOLEIRO-RIVAS, P., MARTÍN-PASCUAL J., JUÁREZ-JIMÉNEZ, B., POYATOS, J. M., HONTORIA, E., RODELAS, B., GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Enzymatic activities in a moving bed membrane bioreactor for real urban wastewater treatment: effect of operational conditions. *Ecol. Eng.* v.61, p.23–33, 2013.

RITTMANN B. E. AND SNOEYINK V. L. Achieving bio-logically stable drinking water. **J. Amer. Wat. Works Assoc.** v.76, p.106-114, 1984.

RODRÍGUEZ, D. C, RAMÍREZ, O., MESA, G. P. Behavior of nitrifying and denitrifying bacteria in a sequencing batch reactor for the removal of ammoniacal nitrogen and organic matter. v.73, n. 2-3, p.447–452, 2011
doi:10.1016/j.desal.2011.01.068

SASAHARA, T., OGAWA, T. Treatment of brewery effluent. Part VIII: protozoa and metazoa found in the activated sludge process for brewery effluent. **Monats. Brauwiss.** v.11: p.443-448, 1983.

SCHMIDT, E. L. E BELSER, L. W. Nitrifying Bacteria, **In: Methods of Soil Analysis – Chemical and Microbiological Properties**, Wisconsin, Estados Unidos, 1984.

SHANAHAN, J. W.; SEMMENS, M. J. Alkalinity and pH effects on nitrification in a membrane aerated bioreactor: An experimental and model analysis. *water research*, v. 74, p.10 e 22, 2015.

SEDLAK, R.L. Phosphorus and Nitrogen Removal From Municipal Wastewater. 2. Edição, United States of America, 1991.

SHUVAL, H.; GRUNER, N. Infant methemoglobinemia and other health effects of nitrates in drinking water. *Prog. Water Technology.* v 8, p.183-193, 1977.

SOUZA, S. J. DE., FORESTI, E. Utilização de lodo anaeróbico como fonte externa de carbono no processo de desnitrificação de águas residuárias. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** v.3, n.1, p.69-73, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. **Water Science and Technology**. v.43, p.77-83, 2001.

TELGEMANN, U., HORN, H., MORGENROTH, E. Influence of growth history on sloughing and erosion biofilms. **Water Research**. v.38, n.17, p.3671-3684, 2004

TIEDJE, J. DENITRIFICATION. In: Methods of soil Analysis- Chemical and Microbiological Properties. Wisconsin, Estados Unidos, 1984.

VIRDIS, B., READ, S.T., RABAEY, K., ROZENDAL, R.A., YUAN, Z., KELLER, J. Biofilm stratification during simultaneous nitrification and denitrification (SND) at a biocathode. **Bioresource Technology**. v.102, n.1, p.334-41, 2011. doi: 10.1016/j.biortech. 2010.06.155.

VIRDIS, B., RABAEY, K., ROZENDAL, R.A., YUAN, Z., KELLER, J. Simultaneous nitrification, denitrification and carbon removal in microbial fuel cells. **Water Research**. v.44, n.9, 2970–2980, 2010. doi:10.1016/j.watres.2010.02.022.

XIA, J., LI, J., WANG, R., LI, J., ZHANG, Z. Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE and combining FISH with flow cytometry. **Biochemical Engineering Journal**. v.49, n.3, 2010. 370–378. doi:10.1016/j.bej.2010.01.013.

ZHANG, S., WANG, Y., HE, W., WU, M., XING, M., YANG, J., GAO, N., YIN, D. Responses of biofilm characteristics to variations in temperature and NH₄⁺ - N loading in a moving-bed biofilm reactor treating micro-polluted raw water. **Bioresource Technology**. v.131, p.365–373, 2013.

WATANABE Y., MASUDA S. AND ISHIGURO M. Simultaneous nitrification and denitrification in microaerobic biofilms. **Wat. Sci. Technol.** v26, p.511-522, 1992.

WHANG, L-M., CHIEN, I-C., YUAN, S-L., WU, Y-J. Nitrifying community structures and nitrification performance of full-scale municipal and swine wastewater treatment plants. **Chemosphere**. v.75, p.234–242, 2009.

WANG, J., PENG, Y., WANG, S., GAO, Y. Nitrogen Removal by Simultaneous Nitrification and Denitrification via Nitrite in a Sequence Hybrid Biological Reactor. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. v.16, n.5, p.778-784, 2008. doi:10.1016/S1004-9541(08)60155-X.

Water Environmet Fedeeral, American Society of Civil Enginneers,
Environmental and Water Resource Institute (WEF, EWRI, ASCE), 2005.
Biological nutrient removal (BNR) operation in wastewater treatment plants. 29.
New York.

WOSIACK, P.A., LOPES, D D., DAMIANOVIC, M.H.R.Z., FORESTI, E.,
GRANATO, D., BARANA, A. C. Removal of COD and nitrogen from animal food
plant wastewater in an intermittently-aerated structured-bed reactor. *Journal of
Environmental Management*. v.154, p.145-150, 2015.
doi:10.1016/j.jenvman.2015.02.026.

YILMAZ, G., LEMAIRE, R., KELLER, J., YUAN, Z.. Simultaneous nitrification,
denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater
using granular sludge. ***Biotechnology and Bioengineering***. v.100, n.3, p.529–541,
2008.