

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

**EDGAR AUGUSTO ALIBERTI**

**RESPOSTA DA ATIVIDADE BACTERIANA EM REATOR DE LEITO  
ESTRUTURADO SOB DIFERENTES CARGAS ORGÂNICAS  
VOLUMÉTRICAS (COV)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**LONDRINA  
2020**

EDGAR AUGUSTO ALIBERTI

**RESPOSTA DA ATIVIDADE BACTERIANA EM REATOR DE LEITO  
ESTRUTURADO SOB DIFERENTES CARGAS ORGÂNICAS  
VOLUMÉTRICAS (COV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana e Londrina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental. Linha de Pesquisa: Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates

Coorientadora: Profa. Dra. Deize Dias Lopes

**LONDRINA  
2020**

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

A398r Aliberti, Edgar Augusto

Resposta da atividade bacteriana em reator de leito estruturado sob diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV) / Edgar Augusto Aliberti. – Londrina: [s.n.], 2020.

108 f. : il.; 30 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kátia Valéria Marques Cardoso Prates

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deize Dias Lopes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Londrina, 2020.

Bibliografia: f. 89-108

1. Resíduos Industriais. 2. Matéria Orgânica. 3. Biofilmes. 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



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



## TERMO DE APROVAÇÃO

### **RESPOSTA DA ATIVIDADE BACTERIANA EM REATOR DE LEITO ESTRUTURADO SOB DIFERENTES CARGAS ORGÂNICAS VOLUMÉTRICAS (COV)**

por

**EDGAR AUGUSTO ALIBERTI**

Dissertação de Mestrado apresentada no dia 17 de fevereiro de 2020, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana e Londrina, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O(A) mestrando(a) foi arguido(a) pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após avaliação da Dissertação, a Banca Examinadora considerou a Dissertação **Aprovada**. O presente termo assinado ficará depositado na Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental – PPGEA.

Prof(a). Dr(a). Katia Valeria Marques Cardoso Prates - Orientador(a)  
(Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Londrina)

Prof(a). Dr(a). Ana Cláudia Barana - Membro Titular  
(Universidade Estadual de Ponta Grossa - Câmpus Ponta Grossa)

Prof(a). Dr(a). Ajadir Fazolo - Membro Titular  
(Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Londrina)

Prof. Dr. Alesandro Bail  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

**“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado em Engenharia Ambiental”**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão, aos meus amigos e a minha namorada.

## **AGRADECIMENTOS**

À orientadora, amiga e “mãe científica” Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Valéria Marques Cardoso Prates, pela competência, respeito, atenção e carinho com que conduziu este processo, do início da ideia até a sua concretização.

À Professora e coorientadora Dr<sup>a</sup>. Deize Dias Lopes, pelo aceite e pelas valiosas contribuições com o presente trabalho.

Às Professoras Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Barana e Dr<sup>a</sup>. Joseane Debora Peruço Theodoro, pelas valiosas contribuições no Exame de Qualificação.

Aos alunos de iniciação científica (Alex e Janaina), companheiros de todos os momentos no laboratório, pela compreensão, ajuda e carinho ao longo do período de elaboração deste trabalho.

A aluna de doutorado e minha amiga Camila, por toda ajuda e companheirismo, fundamental para a criação e desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem prontamente o nosso convite.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

ALIBERTI, Edgar Augusto. **Resposta da atividade bacteriana em reator de leito estruturado sob diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV)**. 2020. 109p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2020.

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar a resposta da atividade bacteriana em reator de leito estruturado, de fluxo contínuo e ascendente na remoção de matéria orgânica e nitrogênio de águas residuárias de laticínios (concentração bruta de  $5.326 \text{ mg.L}^{-1}$  de DQO e  $39 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4^+$ ) sob diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV). Utilizou-se um reator construído em acrílico em escala de bancada com volume total de 2,27 L e útil de 1,32 L. O leito estruturado foi composto por quatro estruturas cilíndricas de espuma de poliuretano fixadas no interior do reator. O reator foi operado com três fases experimentais: Fase I com COV de  $1,2 \text{ kg DQO.m}^3.\text{d}^{-1}$ ; Fase II com COV de  $1,4 \text{ kg DQO.m}^3.\text{d}^{-1}$  e Fase III com COV de  $1,8 \text{ kg DQO.m}^3.\text{d}^{-1}$ . O tempo de detenção hidráulica (TDH) foi mantido em 16h durante todo período experimental. O reator possuía sistema de recirculação interna de efluente, com razão igual a 3. A temperatura do sistema foi mantida a  $28^\circ\text{C}$ , com ciclos de aeração e não aeração de 2/1 (aeração intermitente). O monitoramento foi realizado por meio de análises de pH, alcalinidade, Demanda Química de Oxigênio (DQO), nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ), nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ), Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT), série de sólidos. Foram realizadas análises para estimar o número mais provável (NMP) de bactérias oxidadoras de amônia (BOA), bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e desnitrificantes, bem como a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias heterotróficas. Dos resultados obteve-se remoções de  $\text{DQO}_T$  e  $\text{DQO}_F$  superiores a 90 e 91%, respectivamente em todas as fases. Na Fase I obteve-se as maiores remoções de NKT e NT, 81 e 74% respectivamente, enquanto nas Fases II e III foram obtidas as menores remoções de NKT e NT, 74 e 70% para a Fase II e 54% e 37% para a Fase III, seguindo a ordem. O aumento da COV influenciou a remoção de nitrogênio por interferir diretamente no processo de amonificação. As concentrações de NMP das BOA e BON sofreram redução com o aumento da COV, do mesmo modo, notou-se com a microscopia eletrônica de varredura (MEV) que a abundância dos microrganismos decaiu havendo predominância de fungos. Quanto aos valores de ST e SSV as remoções também foram influenciadas pelo aumento da COV. As velocidades obtidas nos ensaios cinéticos foram para nitrificação via  $\text{N-NH}_4^+$  de 0,11 a  $0,21 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , de nitrificação via  $\text{N-NO}_2^-$  foi de 0,08 a  $0,09 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e de desnitrificação via  $\text{N-NO}_3^-$  de 0,78 a  $0,85 \text{ mg N-NO}_3^-.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para as Fases II e III, respectivamente. Desta forma, concluiu-se que o sistema composto por um reator de leito estruturado operado com recirculação e aeração intermitente no tratamento de águas residuárias de laticínios sob diferentes COVs pode ser vantajoso principalmente para a remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio, bem como promover um ambiente estável e favorável para processos combinados quando aliado a condições adequadas de operação.

**Palavras-chave:** Recirculação. Aeração intermitente. Ensaios cinéticos. Remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio.

ALIBERTI, Edgar Augusto. **Response of bacterial activity in a structured bed reactor under different volumetric organic loads (VOL)**. 2020. 109p. Dissertation (Master in Environmental Engineering). - Graduate Program in Environmental Engineering, Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the response of bacterial activity in a structured bed reactor, of continuous and ascending flow in the removal of organic matter and nitrogen from wastewater from dairy products (crude concentration of  $5.326 \text{ mg.L}^{-1}$  of COD and  $39 \text{ mg.L}^{-1}$  of  $\text{N-NH}_4^+$ ) under different volumetric organic loads (VOL). A reactor built in acrylic on a bench scale with a total volume of 2,27 L and a useful volume of 1,32 L was used. The structured bed was composed of four cylindrical polyurethane foam structures fixed inside the reactor. The reactor was operated with three experimental phases: Phase I with VOL of  $1,2 \text{ kg COD.m}^3.\text{d}^{-1}$ ; Phase II with VOL of  $1.4 \text{ kg COD.m}^3.\text{d}^{-1}$  and Phase III with VOL of  $1.8 \text{ kg COD.m}^3.\text{d}^{-1}$ . The hydraulic detention time (HDT) was maintained at 16h during the whole experimental period. The reactor had an internal effluent recirculation system, with a ratio of 3. The temperature of the system was maintained at  $28^\circ\text{C}$ , with 2/1 aeration and non-aeration cycles (intermittent aeration). Monitoring was carried out by analyzing pH, alkalinity, Chemical Oxygen Demand (COD), ammonia nitrogen ( $\text{N-NH}_3$ ), nitrite ( $\text{N-NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{N-NO}_3^-$ ), Total Kjeldahl Nitrogen (NKT), series of solids. Analyzes were performed to estimate the most probable number (MPN) of ammonia oxidizing bacteria (AOB), nitrite oxidizing bacteria (NOB) and denitrifying bacteria, as well as the colony forming units (CFU) count of heterotrophic bacteria. From the results,  $\text{DQO}_T$  and  $\text{DQO}_F$  removals greater than 90 and 91% were obtained, respectively, in all phases. In Phase I the largest removals of NKT and NT were obtained, 81 and 74% respectively, while in Phase II and III the smallest removals of NKT and NT were obtained, 74 and 70% for Phase II and 54% and 37% for Phase III, following the order. The increase in VOL influenced nitrogen removal by directly interfering with the ammonification process. The MPN concentrations of AOB and NOB decreased with the increase in VOL, in the same way, it was noted with scanning electron microscopy (SEM) that the abundance of microorganisms declined with a predominance of fungi. Regarding TS and VSS values, removals were also influenced by the increase in VOL. The speeds obtained in the kinetic tests were for nitrification via  $\text{N-NH}_4^+$  from 0,11 to 0,21  $\text{mg N-NH}_4^+.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , from nitrification via  $\text{N-NO}_2^-$  was 0,08 to 0,09  $\text{mg N-NO}_2^-.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$  and denitrification via  $\text{N-NO}_3^-$  from 0,78 to 0,85  $\text{mg N-NO}_3^-.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$  for Phases II and III, respectively. Thus, it was concluded that the system composed of a structured bed reactor operated with intermittent recirculation and aeration in the treatment of dairy wastewater under different VOLs can be advantageous mainly for the simultaneous removal of organic matter and nitrogen, as well as promoting a stable and favorable environment for combined processes when combined with adequate operating conditions.

**Keywords:** Recirculation. Intermittent aeration. Kinetic tests. Simultaneous removal of organic matter and nitrogen.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de formação do biofilme. ....	20
Figura 2 - Representação do biofilme com o gradiente de OD em função da remoção de nitrogênio.....	29
Figura 3 - Representação do sistema de tratamento da indústria de laticínios em que se realizou a coleta. ....	34
Figura 4- Sistema de tratamento utilizado nos procedimentos experimentais. ....	36
Figura 5 - Preparação das amostras do efluente para quantificação de BOA, BON, Desnitrificantes e Heterotróficas. ....	40
Figura 6 - Preparação das amostras do material suporte para quantificação das BOA, BON, Desnitrificantes e Heterotróficas. ....	41
Figura 7 - Procedimento de preparação da amostra de lodo para quantificação das BOA, BON, Desnitrificantes e Heterotróficas. ....	42
Figura 8 - Procedimento de extração do EPS total das amostras de lodo e material suporte. ....	45
Figura 9 – Preparação das amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura.....	46
Figura 10 - Esquema da preparação dos ensaios cinéticos realizados nas Fases II e III. ....	47
Figura 11 - Diagrama <i>Box-plot</i> de distribuição dos dados de pH afluente e efluente durante cada fase.....	54
Figura 12 - Diagrama <i>box-plot</i> da alcalinidade afluente e efluente ao longo de cada fase. ....	55
Figura 13 - Diagrama <i>box-plot</i> do monitoramento da eficiência de remoção de NKT (A), remoção de NT (B), da eficiência de desnitrificação (C) e da eficiência de amonificação (D) ao longo de cada fase. ....	58
Figura 14 - Diagrama <i>box-plot</i> de distribuição dos dados de eficiência de remoção de DQO <sub>T</sub> (A) e de DQO <sub>F</sub> (B) ao longo de cada fase.....	61
Figura 15 - Gráfico em barras do NMP inicial e final das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) durante cada fase. ....	66

Figura 16 - Gráfico em barras do NMP inicial e final das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) ao longo de cada fase. ....	66
Figura 17 - Gráfico em barras do NMP inicial e final das bactérias desnitrificantes durante cada fase.....	69
Figura 18 - Gráfico em barras da UFC inicial e final das bactérias heterotróficas ao longo de cada fase. ....	71
Figura 19 - Concentração inicial e final de PT no MS e LD durante cada fase estudada.....	74
Figura 20 - Concentração inicial e final de PS no MS e LD ao longo de cada fase experimental. ....	75
Figura 21 - Microscopia Eletrônica de Varredura realizada na Fase I. ....	77
Figura 22 - Microscopia Eletrônica de Varredura realizada na Fase II. ....	79
Figura 23 - Microscopia Eletrônica de Varredura realizada na superfície externa do material suporte (MS) na Fase III. ....	80
Figura 24 - Ajuste do modelo cinético de ordem zero para a reação de nitrificação via N-amoniaco (A), via nitrito (B) e desnitrificação via nitrato (C) na Fase II.....	82
Figura 25 - Variação da concentração de N-amoniaco, nitrito e nitrato para nitrificação via N-amoniaco na Fase II.....	83
Figura 26 - Ajuste do modelo cinético de ordem zero para a reação de nitrificação via N-amoniaco (A), via nitrito (B) e desnitrificação via nitrato (C) na Fase III.....	84
Figura 27 - Variação da concentração de N-amoniaco, nitrito e nitrato para nitrificação via N-amoniaco na Fase III. ....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características dos efluentes de laticínios. ....	16
Tabela 2 - Principais características dos efluentes de laticínios. ....	17
Tabela 3 - Fases experimentais no reator de leito estruturado. ....	37
Tabela 4 - Médias e desvio padrão do pH e da alcalinidade afluente e efluente durante a operação do reator nas três fases estudadas. ....	53
Tabela 5 - Médias das concentrações de nitrogênio afluente e efluente. ....	56
Tabela 6 - Médias das eficiências de desnitrificação, amonificação e das remoções de NKT e NT. ....	56
Tabela 7 - Médias e desvio padrão da DQO total e filtrada afluente e efluente. ....	60
Tabela 8 - Valores médios de sólidos totais, sólidos totais fixos e sólidos totais voláteis durante as três fases estudadas. ....	62
Tabela 9 - Médias e desvio dos sólidos em suspensão totais, sólidos em suspensão fixos e sólidos em suspensão voláteis. ....	62
Tabela 10 - Médias e desvio da eficiência de remoção de sólidos. ....	62
Tabela 11- Médias do NMP.100mL <sup>-1</sup> das BOA e BON nos meios analisados (EF, MS e LD) ....	64
Tabela 12 - Médias do NMP.100mL <sup>-1</sup> das bactérias desnitrificantes nos meios analisados (MS, EF e LD). ....	68
Tabela 13 - Médias do UFC.mL <sup>-1</sup> das bactérias heterotróficas nos meios analisados (MS, EF e LD). ....	70
Tabela 14 – Concentração média de proteínas e polissacarídeos durante cada fase experimental. ....	73
Tabela 15 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ensaio durante a Fase II. ....	85
Tabela 16 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ensaio durante a Fase III. ....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

BOA	Bactérias Oxidadoras de Amônia
BON	Bactérias Oxidadoras de Nitrito
COV	Carga Orgânica Volumétrica
CPP	Contagem Padrão em Placa
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EF	Efluente
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
LD	Lodo
MS	Material Suporte
NKT	Nitrogênio Kjeldahl Total
NMP	Número Mais Provável
NT	Nitrogênio Total
OD	Oxigênio Dissolvido
S.S.	Solução Salina
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TRC	Tempo de Retenção Celular
UASB	Reatores Anaeróbios de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>ESPECÍFICOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS EFLUENTES DE LATICÍNIOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>TRATAMENTO DE EFLUENTES DE LATICÍNIOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>FORMAÇÃO DE BIOFILME .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO SIMULTÂNEOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>EFLUENTE DE LATICÍNIOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE TRATAMENTO .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>FASES EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5.1</b>	<b>PREPARO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO NMP.mL<sup>-1</sup> DE BOA, BON, DESNITRIFICANTES E HETEROTRÓFICAS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5.1.1</b>	<b>Quantificação das bactérias oxidadoras de amônia e nitrito (BOA e BON) .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.1.2</b>	<b>Quantificação das bactérias desnitrificantes .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5.1.3</b>	<b>Quantificação das bactérias heterotróficas .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6</b>	<b>EXTRAÇÃO DO EPS TOTAL.....</b>	<b>44</b>

4.6.1	DETERMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E PROTEÍNAS DO LODO (LD) E DO MATERIAL SUPORTE (MS) .....	45
4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	45
4.8	ENSAIOS CINÉTICOS DE CONSUMO DE AMÔNIA, NITRITO E NITRATO ..	47
4.9	CÁLCULO DAS EFICIÊNCIAS DO REATOR .....	51
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	53
5.1	pH E ALCALINIDADE .....	53
5.2	REMOÇÃO DE NITROGÊNIO .....	56
5.3	REMOÇÃO DE DQO .....	60
5.4	SÉRIE DE SÓLIDOS .....	62
5.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	63
5.6	RESULTADOS DE PT E PS.....	72
5.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	76
5.8	CINÉTICA DE NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO .....	81
6	CONCLUSÕES .....	88
	REFERÊNCIAS.....	89

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem sobressaindo-se na produção e processamento de leite e derivados no âmbito mundial nos últimos anos. Segundo as pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)/Pesquisa da Pecuária Municipal (2018), em 2017 o país alcançou uma produção de aproximadamente 33,5 bilhões de litros de leite, sendo o sexto maior produtor mundial.

Dentre todos os Estados brasileiros destacam-se Minas Gerais com produção anual de 8,9 bilhões de litros de leite, seguido pelo Rio Grande do Sul, com 4,5 bilhões de litros, ainda os estados do Paraná e Goiás, com as produtividades de 4,4 e 3,0 bilhões de litro de leite por ano, respectivamente (IBGE, 2018). A produção do Estado do Paraná representa 13,1% da produção nacional.

Segundo dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA, 2018), as exportações brasileiras de leite e derivados chegaram a 141 milhões de litros, que correspondem à 0,42% da produção nacional. Assim, mais de 99% do leite que é produzido no Brasil permanece no mercado interno, onde ocorre o processamento deste para diferentes produtos nas indústrias de laticínio, como leite, leite em pó, iogurtes, sorvetes, sobremesas, manteiga e queijo.

A indústria de laticínios gera grande quantidade de águas residuárias, especialmente devido à lavagem e sanitização de suas instalações, além da parcela gerada nas várias etapas no processamento de produtos (Martínez-Suller et al., 2010). Desta forma, as características físicas e químicas destes efluentes variam de acordo com o tipo e a quantidade do produto fabricado (Gough et al., 2000; Martínez-Suller et al., 2010) e dos produtos químicos utilizados na limpeza e desinfecção (Martínez-Suller et al., 2010; Kushwaha et al., 2011). Estima-se que a geração de efluentes neste tipo de indústria varie de 0,2 a 10 litros por litro de leite processado (VOURCH et al., 2005; KOLHE e PAWAR, 2011).

Além disso, como a maioria das agroindústrias, a de laticínios gera efluentes caracterizados por alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), que representam seu conteúdo orgânico elevado, pH variável, bem como cargas elevadas de nutrientes, principalmente o nitrogênio presente em suas

diversas formas, além de conter sólidos em suspensão e dissolvidos, componentes orgânicos solúveis, lactose, gorduras, sulfatos e cloretos (YONAR et al., 2018).

Diante disso, torna-se necessário buscar novas alternativas para o tratamento dessas águas residuárias visando atender as exigências da legislação (BEGNINI e RIBEIRO, 2014).

Considerando os resultados obtidos por Moura et al. (2012), Barana et al. (2013), Wosiack et al. (2015) e Correa et al. (2018) utilizando um reator de leito estruturado em escala de laboratório sob aeração intermitente e recirculação de efluente para tratar águas residuárias, notou-se elevado potencial para remoção de matéria orgânica e nitrogênio em um único reator. Com base nisso, decidiu-se estudar o comportamento dos microrganismos envolvidos no processo, de modo a verificar até onde é viável o aumento da carga orgânica para permitir uma remoção eficiente de nitrogênio e matéria orgânica.

Neste contexto, o presente trabalho visa o estudo da resposta da atividade bacteriana em reator de leito estruturado sob diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Avaliar a resposta da atividade bacteriana em reator de leito estruturado sob diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV).

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Analisar o percentual de remoção de matéria orgânica e de nitrogênio total no reator de leito estruturado em três condições de carga orgânica volumétrica aplicada;

- Estimar a concentração de bactérias nitrificantes e desnitrificantes utilizando a técnica do Número Mais Provável (NMP) e as bactérias heterotróficas por meio da técnica de contagem padrão em placas;

- Avaliar a cinética de consumo de amônia, nitrito e nitrato no final das fases II e III de operação do sistema.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS EFLUENTES DE LATICÍNIOS

A indústria de laticínios é um dos exemplos, dentre as indústrias de alimentos, que são consideradas grandes consumidoras de água (JAGANMAI e JINKA, 2017). Diversos setores na indústria utilizam água em diferentes processos, como lavagem de equipamentos e tanques (MUNAVALLI e SALER 2009; HAMERSKI, 2012), de tubulações e pisos, incorporação ao produto, entre outros serviços, o que faz com que a vazão de efluente gerado nesse setor industrial seja elevada considerando a quantidade de leite processado (BEGNINI e RIBEIRO, 2014). Na Tabela 1 são apresentados os consumos de água das indústrias de laticínios de acordo com as atividades realizadas e os tipos produtos gerados.

**Tabela 1 - Principais características dos efluentes de laticínios.**

Produtos obtidos após processamento do leite	Consumo de água/litro de leite processado (L.L <sup>-1</sup> )		
	Vourch et al., 2005	Kolhe e Pawar (2011)	Koca et al. (2018)
Leite	0,2 a 10	6 a 10	-
Iogurte	-	-	5,15 a 10
Manteiga	-	-	1
Queijo muçarela	-	-	1,55
Queijo ricota	-	-	0,2
Coalhada	-	-	1,4
Requeijão	-	-	1,39
Doce de leite	-	-	9,14

**Fonte: Autoria própria (2020).**

As características dos efluentes de laticínios podem variar em função do tipo de sistema, métodos de operação utilizados e tipos de produtos processados tais como: leite, manteiga, iogurte, sorvetes, sobremesas e queijos (KHOJARE et al., 2002; JAGANMAI e JINKA, 2017). A vazão de efluente também varia de acordo com a produção e com a época do ano. A variação de vazão ao longo do ano está relacionada à sazonalidade destas indústrias, uma vez que sua produção é afetada pelo volume de leite recebido para processamento que,

geralmente, é maior nos meses mais quentes e menor nos meses mais frios (KOLARSKI e NYHUIS, 1995).

As águas residuárias de laticínios possuem elevadas cargas orgânicas e de nutrientes e são ricas em gordura, óleos e graxas, que podem gerar problemas para o sistema de tratamento (DROGUI et al., 2008; FARIZOGLU e UZUNER, 2011).

Outrossim, estas águas residuárias apresentam em sua composição concentrações elevadas de caseína, lactose, sais inorgânicos e detergentes e sanitizantes, os quais são utilizados no processo de lavagem (KOLHE et al., 2009), sendo esse, outro fator que afeta a característica dessa água residuária, resultando em um pH altamente variável (DEMIREL e YENIGUN, 2003). Na Tabela 2 são apresentadas as principais características dos efluentes de indústrias de laticínios.

**Tabela 2 - Principais características dos efluentes de laticínios.**

Parâmetros	Autores		
	Demirel et al. (2005)	Castillo et al. (2017)	Erkan et al. (2018)
pH	6 – 11	-	5,59
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	320 – 970	-	1225
Demanda Bioquímica de Oxigênio (mg.L <sup>-1</sup> )	-	4.000	4900
Demanda Química de Oxigênio (mg.L <sup>-1</sup> )	1.150 – 9.000	7.000	7136
Sólidos em suspensão Totais (mg.L <sup>-1</sup> )	340 – 1.730	1.300	1820
Nitrogênio Total Kjeldahl (mg N.L <sup>-1</sup> )	14 – 272	40	95
Fósforo Total (mg P.L <sup>-1</sup> )	8 – 68	8	3,29
Óleos e Gorduras (mg.L <sup>-1</sup> )	-	950	-

**Fonte: Autoria própria (2020).**

Os dados da Tabela 2 mostram que as concentrações de poluentes são elevadas e, dependendo dos produtos que são processados pela indústria, necessitam de um sistema de tratamento com a combinação de processos biológicos e físico-químicos para atender às exigências da legislação CONAMA 430/2011 (BRASIL, 2011).

### 3.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES DE LATICÍNIOS

O tratamento das águas residuárias de produtos lácteos pode ser realizado por processos físico-químicos, biológicos ou uma combinação destes (TAWFIK et al., 2008). Na maioria das indústrias os métodos físico-químicos são utilizados como um tratamento preliminar para retirar sólidos em suspensão e gordura por meio de peneiras e flutuadores já os processos biológicos como tratamento secundário para remoção de matéria orgânica e/ou nutrientes dissolvidos. Os métodos biológicos são utilizados por não empregarem reagentes e por serem aplicáveis a diversos tipos de efluentes, tanto industriais como domésticos, com elevados volumes e cargas orgânicas variáveis (AHMAD et al., 2019).

Os processos biológicos podem ser anaeróbios ou aeróbios, com diversas configurações de reatores (TAWFIK et al., 2008). Malina e Pohland (1992) realizaram estudos sobre tratamento da água residuária proveniente de laticínios utilizando reatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB). Além de reatores UASB, filtros anaeróbios, digestores híbridos e reatores anaeróbios em batelada sequencial (ASBR) também são empregados no tratamento de efluentes de laticínios (STRYDOM et al., 1995).

No caso dos processos aeróbios, o que mais se destaca é o sistema de lodos ativados, pois possui alta eficiência e possibilidade de remoção de nutrientes (SHENG et al., 2008).

Nos sistemas biológicos de tratamento de águas residuárias os microrganismos podem ser encontrados em suspensão ou aderidos. Nos sistemas de crescimento em suspensão há um mecanismo para que esses microrganismos se mantenham em suspensão no líquido, no caso dos lodos ativados esse mecanismo é a agitação/aeração. Já nos sistemas de crescimento aderido os microrganismos permanecem fixos a um meio suporte presente no interior do reator formando biofilmes (METCALF e EDDY, 2015).

De acordo com Wolff et al. (2010) para que um material seja utilizado como material suporte esse deve ser inerte e apresentar algumas características, como elevada superfície específica, rugosidade e porosidade necessárias para melhor adesão da biomassa, esse material pode ser de origem mineral ou sintético.

Diversos estudos têm utilizado a espuma de poliuretano como material suporte (MOURA et al., 2012; BARANA et al., 2013; WOSIACK et al., 2015; SANTOS et al., 2016; CORREA et al., 2018). Este material proporciona a imobilização da biomassa e boa retenção de sólidos no reator, isso se deve ao fato da espuma ser altamente porosa, propiciando a imobilização da biomassa em sua superfície e em seu interior (DENG et al., 2016). Por isso, é possível eliminar a etapa de decantação e permite a redução do tempo de detenção hidráulico, pois além de aumentar o tempo de retenção celular favorece o maior contato da biomassa com o líquido a ser tratado, conseqüentemente, resultando em boa eficiência de remoção dos poluentes (CIRJA et al., 2008)

Os reatores de crescimento aderido podem ser de leito fixo ou móvel. Nos de leito fixo, o material suporte está fixado no interior do reator, enquanto nos de leito móvel, o material suporte pode se movimentar no interior do reator (MOURA et al., 2012).

Dentre os reatores de crescimento aderido que vêm se destacando no tratamento biológico de efluentes, está o reator de leito estruturado, esse nome é dado por apresentar internamente um material suporte, organizado de maneira ordenada, com o intuito da biomassa crescer aderida. Para este meio suporte podem ser utilizados diversos tipos de materiais como: argila expandida, carvão vegetal, cerâmica porosa, polietileno de baixa densidade (JÚNIOR et al., 2015) e espuma de poliuretano (MOURA et al., 2018)

Neste tipo de reator a biomassa pode crescer aderida ou encontrar-se em suspensão no meio, garantindo alta concentração de biomassa no reator, resultando em idade do lodo elevada (CORREA et al., 2018),

Além disso, este tipo de reator pode ser operado sob aeração intermitente, ou seja, com ciclos de aeração e não aeração, fazendo com que esse sistema se torne vantajoso, por operar tanto em condições aeróbias como anóxicas (MOURA et al., 2012; BARANA et al., 2013; WOSIACK et al., 2015; CORREA et al., 2018).

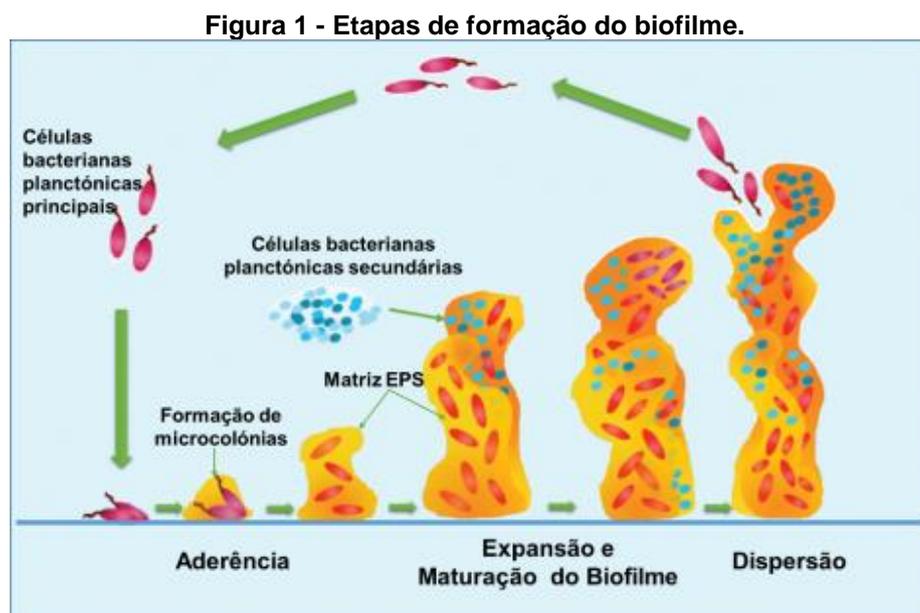
Nos sistemas de tratamento que tem por objetivo a remoção de nitrogênio, um reator com biomassa aderida se torna vantajoso, uma vez que propicia uma condição favorável para o crescimento de bactérias nitrificantes as quais possuem um crescimento lento, e também impede que estes microrganismos sejam arrastados para fora do sistema (MOURA et al., 2018). O

crescimento aderido também favorece a ocorrência de zonas anóxicas no interior do biofilme, permitindo assim o crescimento de bactérias desnitrificantes, pois conforme o oxigênio dissolvido (OD) penetra no biofilme a concentração do mesmo decresce a zero ao atingir as camadas mais internas, ou seja, cria uma condição propícia para ocorrer a nitrificação e desnitrificação simultâneas (ZHANG et al., 2008; WOASIACK et al., 2015).

### 3.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME

O biofilme é um agregado organizado de microrganismos que se desenvolvem em uma matriz polimérica extracelular (HURLOW et al., 2015). Esta matriz produzida pelos microrganismos fornece força à interação microrganismo-microrganismos e do biofilme a uma superfície inerte, sólida ou não (BRANDA et al., 2005).

A formação de biofilme é complexa, mas pode ser resumida em três passos principais: contato inicial e aderência à superfície, seguida do crescimento e maturação do biofilme e, por fim, o desprendimento do biofilme (SUTHERLAND, 2001). Cada uma destas etapas será descrita a seguir, e podem ser visualizadas na Figura 1.



Fonte: Adaptado de TREMBLAY et al. (2014).

Na etapa de aderência e formação do biofilme, as células microbianas se fixam à superfície por meio de seus apêndices, como pili ou fímbria ou pelos e flagelos, e também podem se unir por outras forças físicas como as forças de Van der Waals e interações eletrostáticas. Outros fatores também afetam a fixação bacteriana a uma superfície, como por exemplo, a adesão, que é a fixação de células microbianas a uma superfície, e a coesão, que é a interação ou ligação dentro das células, que ocorre na formação de biofilme (GARRETT et al., 2008).

Depois que ocorre a ligação dos microrganismos a uma superfície, biótica ou abiótica, esta ligação se torna estável, então tem início, por meio de sinalização química particular das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), um processo de multiplicação e divisão de células microbianas. Este processo leva à formação de microcolônias (COSTERTON et al., 1999). As colônias bacterianas em um biofilme geralmente consistem em muitos tipos de microcomunidades, que se coordenam entre si em múltiplos aspectos. Esta coordenação desempenha papel crucial na troca de substrato, distribuição de importantes produtos metabólicos e excreção de produtos metabólicos finais (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

A produção de EPS é de suma importância para a formação de flocos microbianos, agregados e biofilmes, as EPS são gelatinosas e altamente hidratadas. São constituídas principalmente de proteínas (PT), polissacarídeos (PS), ácido húmico, ácido nucléico e de fosfolipídios. A presença de EPS influencia diretamente nas propriedades físico-químicas do lodo, desfavorecendo a agregação e sedimentação do lodo (SHENG et al., 2010; ZENG et al., 2016). As EPS normalmente são representadas por duas camadas, uma interna e outra externa, a camada interior é composta por EPS firmemente ligado (Tightly Bound-EPS), enquanto a exterior é composta por EPS fracamente ligado (Lightly Bound-EPS) (LI e YANG, 2007).

O EPS pode se acumular por diversos mecanismos distintos, incluindo excreção, secreção, lise celular e sorção. Foi relatado que o principal constituinte dos biofilmes é o EPS, e que a proporção de EPS pode variar de 50% a 80% (p/p) do peso total de biofilmes (FLEMMING e WINGENDER, 2010; LENG et al., 2016).

As EPS contribuem para a formação de agregados, elevar a difusividade do substrato, influenciar a morfologia agregada pela hidrofobicidade das EPS e aumentar a atividade enzimática extracelular (FLEMMING e WINGENDER, 2010; VLAEMINCK et al., 2010). Os microrganismos podem aumentar a liberação de EPS como estratégia de sobrevivência sob condições ambientais estressantes, como: tipo de substrato limitante (carbono, nitrogênio e fósforo), temperaturas extremas, limitação de oxigênio, espécies microbianas e fase de crescimento (LIU et al., 2004).

Na fase de crescimento e maturação do biofilme, as células microbianas comunicam-se por meio de sinais auto indutores (VASUDEVAN, 2014). A comunicação célula a célula é um processo importante, no qual as bactérias utilizam sinais químicos para detectar a densidade celular microbiana (PARSEK e SINGH, 2003). Nesta fase, as células microbianas dentro do biofilme se multiplicam e se dispersam convertem-se de sésil em forma móvel (COSTERTON et al., 1999). No entanto, alguns tipos de bactérias não produzem polissacarídeo extracelular e as células bacterianas se dispersam diretamente no meio ambiente, mas às vezes as alterações no ambiente também podem estar envolvidas nesse processo (MENOITA et al., 2012).

### **3.4 REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO**

Os processos de remoção biológica de matéria orgânica em sistemas de tratamento de efluentes retratam os mecanismos naturais que ocorrem nos corpos d'água logo após o despejo de águas residuárias. Nos corpos d'água a matéria orgânica biodegradável é oxidada a produtos mineralizados ou inertes, por meio de microrganismos, no processo conhecido por autodepuração (VON SPERLING, 1996).

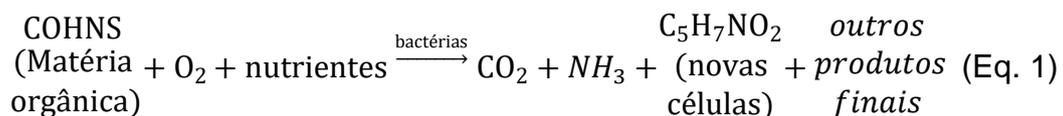
Nos processos biológicos utilizados no tratamento de águas residuárias há grande diversidade de microrganismos envolvidos, entre eles bactérias, protozoários, fungos, arqueias e rotíferos (METCALF e EDDY, 2015). Os microrganismos heterotróficos que fazem a degradação da matéria orgânica podem ser aeróbios, anaeróbios ou facultativos. A decomposição da matéria orgânica é realizada pelas enzimas desses microrganismos, as quais atuam

como catalisadoras extra ou intracelular. Além disso, as condições do meio como pH, concentração do substrato e temperatura afetam essas enzimas (QASIM, 1985).

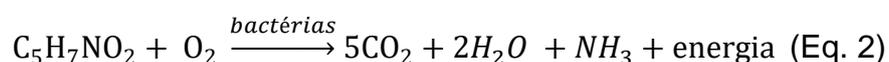
Os microrganismos, envolvidos nos processos biológicos de tratamento, removem a matéria orgânica via respiração celular, aeróbia ou anaeróbia e fermentação (TORTORA et al., 2012).

Na respiração celular por meio de reações de oxidação-redução os microrganismos obtêm energia para seu crescimento e manutenção celular. Basicamente, essas reações possuem um doador e um receptor de elétrons, onde o doador de elétrons e a fonte de carbono para os microrganismos quimiorganotróficos é a matéria orgânica. Quanto ao receptor final de elétrons, sob condições aeróbias, por meio da respiração aeróbia os microrganismos utilizam o oxigênio ( $O_2$ ), enquanto em condições anóxicas, por meio da respiração anaeróbia, utilizam outros receptores de elétrons como o nitrito, nitrato, sulfato e o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (RITTMAN e MCCARTY, 2001).

No processo aeróbio há a conversão completa da matéria orgânica em produtos mais oxidados, formando subprodutos e novas células. Metcalf e Eddy (2015) apresentam a equação estequiométrica da oxidação da matéria orgânica, representada pela Equação 1.

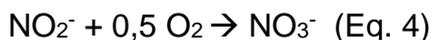
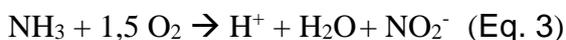


Ao mesmo tempo em que os microrganismos fazem a degradação e a estabilização da matéria orgânica, oxidando-a em  $CO_2$  e água para manutenção celular e funções vitais, eles realizam reações de síntese, onde parte da energia é utilizada para formação de novas células (Equação 1). Quando o material orgânico disponível é totalmente consumido, esses microrganismos utilizam seu próprio material celular, oxidando-o para obtenção de energia para suas atividades metabólicas, ou seja, ocorre uma reação endógena, como mostra a Equação 2 (METCALF e EDDY, 2015).



Ao mesmo tempo em que estão presentes no sistema bactérias que utilizam o oxigênio para a remoção da matéria orgânica, também há microrganismos que utilizam esse oxigênio para oxidar o nitrogênio presente no meio, que são as bactérias nitrificantes.

A nitrificação convencional é um processo sequencial de oxidação biológica que ocorre em duas etapas, a nitritação (Equação 3), onde o N-NH<sub>3</sub> é oxidado a nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e, posteriormente, a nitratação (Equação 4), etapa em que o N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> é oxidado a N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A nitrificação é um processo intermediado por diversas espécies microbianas (ANGNES et al., 2013, GE et al., 2015).



A etapa de nitritação é feita pelas bactérias que oxidam amônia (BOAs) e a nitratação pelas bactérias oxidadoras de nitrito (BONs). As BOAs são classificadas pela morfologia celular em cinco gêneros distintos: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus*, enquanto no caso das BONs o gênero mais presente no processo é *Nitrobacter*, mas os gêneros *Nitrococcus*, *Nitrospira* e as *Nitrospina* também são encontrados (RITTMANN & MCCARTY, 2001, VYMAZAL, 2007).

VAN KESSEL et al. (2015) e DAIMS et al. (2015) relatam a ocorrência da oxidação completa da amônia a nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) realizado por uma bactéria, cujo o novo processo foi chamado de camammox. Bactérias do gênero *Nitrospira* são exemplos de microrganismos capazes de realizar este tipo de processo.

Para que aconteça o processo de nitrificação, as concentrações de OD, relação carbono/nitrogênio, alcalinidade, pH e temperatura necessitam estar em uma faixa ótima. Van Haandel e Van Der Lubbe (2007) e Metcalf e Eddy (2015) descrevem que para que esse processo ocorra, é necessária uma quantidade mínima de OD no meio, pois na nitrificação são necessários 4,57 mg de O<sub>2</sub>/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oxidado, sendo 3,43 mg de O<sub>2</sub> na nitritação e 1,14 mg de O<sub>2</sub> para a nitratação. Todavia, a presença de matéria orgânica no meio faz com que haja

competição pelo oxigênio entre as bactérias heterotróficas e as nitrificantes que são autótrofas (CÁCERES et al., 2006; ZENG et al. al., 2012).

A relação carbono/nitrogênio (C/N) influencia diretamente na nitrificação. Beg et al. (1997) e Chiu et al. (2007) relataram que quanto maior a relação C/N menor a taxa de nitrificação, pois altas concentrações de matéria orgânica tornam o meio favorável para o desenvolvimento de bactérias heterotróficas, sendo essas bactérias de crescimento mais rápido que as nitrificantes. A velocidade média de crescimento das BOAs é de  $0,77 \text{ dia}^{-1}$  e das BONs de  $1,08 \text{ dia}^{-1}$ , enquanto para os microrganismos heterotróficos é em média de  $7,2 \text{ dia}^{-1}$  (BELTRAN., 2008).

Ao mesmo tempo em que há necessidade de ter OD no meio, também é preciso ter alcalinidade a bicarbonatos, pois esta vai manter o pH tamponado próximo a 7, uma vez que durante a nitrificação ocorre a liberação de íons  $\text{H}^+$  e, conseqüentemente, um consumo da alcalinidade. São necessários 7,14 g de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3^-$ ) ou 8,64 g de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) para cada grama de  $\text{N-NH}_3$  oxidada (SEDLAK, 1991; CÁCERES et al., 2015; METCALF e EDDY, 2015).

Segundo a EPA (1993) e Sáez et al. (2017) o processo de nitrificação ocorre principalmente em temperaturas mesófilas (20 a 35 °C), quando a temperatura está acima ou abaixo desta faixa o processo de nitrificação é reduzido (DE GUARDIA et al., 2010). Quanto ao pH ótimo da nitrificação, Metcalf e Eddy (2015), apresentam a faixa de 7,5 a 8,0, a mesma indicada por Zou et al. (2016). Ge et al. (2015) relatam que a variação do pH é influenciada pela oxidação de  $\text{N-NH}_3$  e pela perda de  $\text{CO}_2$ . Metcalf e Eddy (2015) ainda relatam que para valores de pH inferiores a 7,0 a taxa de nitrificação é reduzida significativamente.

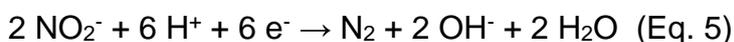
Anthonisen et al. (1976) e Kim et al. (2006) relataram que elevadas concentrações de amônia livre no meio também podem interferir na taxa de nitrificação, inibindo as bactérias nitrificantes. Na faixa de 0,1 a 1,0 mg de  $\text{N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$  começa a ocorrer a inibição na atividade das *Nitrobacter*, enquanto para o gênero *Nitrosomonas* a inibição ocorre na faixa de 10 a 150 mg de  $\text{N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ . Bitton (2005) e Sant'Anna Jr (2013) relataram que outras substâncias, como metais pesados, também são mais tóxicas para as *Nitrosomonas* que para as *Nitrobacter*.

Tempos de retenção celular (TRC) beneficiam o crescimento de bactérias altamente especializadas e de crescimento lento, como as nitrificantes, resultando, portanto, em maior eficiência de remoção (TRAN et al., 2013). Ao mesmo tempo, TRCs muito altos, proporcionam acúmulo de bactérias mortas e inativas no sistema, diminuindo a eficiência do tratamento e causando problemas de redução do volume útil (KAYA et al., 2013).

Tempos de detenção hidráulica (TDH) muito altos podem prejudicar as bactérias nitrificantes, pois pode reduzir a relação alimento microrganismo, além de aumentarem os gastos com energia. Por outro lado, caso o TDH seja muito baixo poderá acarretar em sobrecarga hidráulica ou orgânica no sistema, com conseqüente diminuição de eficiência, em ambos os casos interfere diretamente na relação Alimento/Microrganismo (A/M) (CYDZIK-KWIATKOWSKA e WOJNOWSKA-BARYŁA, 2015; METCALF e EDDY, 2015). Além do mais, quando o sistema possui altas cargas orgânicas também há a predominância de bactérias heterotróficas, e essas competem pelo oxigênio com as nitrificantes (SCHMIDT et al., 2003).

A carga orgânica elevada pode influenciar diretamente na remoção de DQO e na eficiência de nitrificação, ou seja, conforme as cargas orgânicas aplicadas aumentam no sistema, a eficiência de remoção de DQO e N-amoniacal são reduzidas, porém os processos aeróbios e anaeróbios suportam cargas diferentes. Em geral os processos anaeróbios suportam cargas orgânicas superiores aos aeróbios (KHANITCHAIDECHA et al., 2010).

A desnitrificação biológica convencional é a etapa seguinte após a nitrificação no processo de remoção de nitrogênio (METCALF e EDDY, 2015). Este processo é conduzido por microrganismos que utilizam o nitrito e o nitrato como receptores finais de elétrons, e para o crescimento microbiano utilizam substâncias orgânicas como doadoras de elétrons e fonte de energia - organismos heterotróficos (GHAFARI et al., 2008; VAN RIJN et al., 2006). A redução do nitrito (Equação 5) ou nitrato (Equação 6) ao gás dinitrogênio (N<sub>2</sub>) ocorre de maneira sequencial, gerando intermediários gasosos, como óxido nítrico e óxido nitroso (KNOWLES, 1982).





Quando ocorre a redução dos nitratos o oxigênio é liberado, o que torna o processo vantajoso. E esse oxigênio fica disponível no sistema para ser utilizado no processo de nitrificação ou de oxidação biológica da matéria orgânica, trazendo economia no consumo de energia devido aos aeradores no sistema de tratamento. De acordo com Van Haandel e Van Der Lubbe (2007) a desnitrificação do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> tem uma capacidade de oxidação igual a uma fração 5/8 do oxigênio necessário na nitrificação. Em outras palavras, aproximadamente 2,86 mgO.mgN<sup>-1</sup> de oxigênio pode ser recuperado no processo de desnitrificação.

Ainda, há a economia por conta da alcalinidade (BITTON, 2005), pois conforme o N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é reduzido vai gerando alcalinidade no meio, mantendo o pH dentro da faixa ideal para a nitrificação acontecer. Para cada miligrama de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que é convertido a gás nitrogênio são gerados 3,57 mg de CaCO<sub>3</sub> o equivalente a 50% do que é consumido na nitrificação (EPA, 1993; METCALF & EDDY, 2015).

Rittmann e McCarty (2001) e Sant'Anna Jr (2013). descreveram os microrganismos que realizam a desnitrificação como, predominantemente, bactérias gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*, pertencentes às classes alfa e beta das *Proteobactérias*. Entretanto, há também microrganismos gram-positivos como as bactérias do gênero *Bacillus* e, em menor quantidade, as arqueas halofílicas (*Halobacterium*), as quais são muito eficientes no processo de desnitrificação, bem como alguns tipos de fungos e arqueas.

Assim como na nitrificação, o processo de desnitrificação também sofre influência de fatores ambientais. A temperatura, influencia diretamente no crescimento microbiano, a desnitrificação segundo Van Haandel, Kato e Von Sperling (2009) aumenta conforme o aumento da temperatura até o valor ótimo de 40°C. O que corrobora com Metcalf e Eddy (2015), que descrevem que o valor ótimo de temperatura para que ocorra a desnitrificação está em torno de 30 a 40°C.

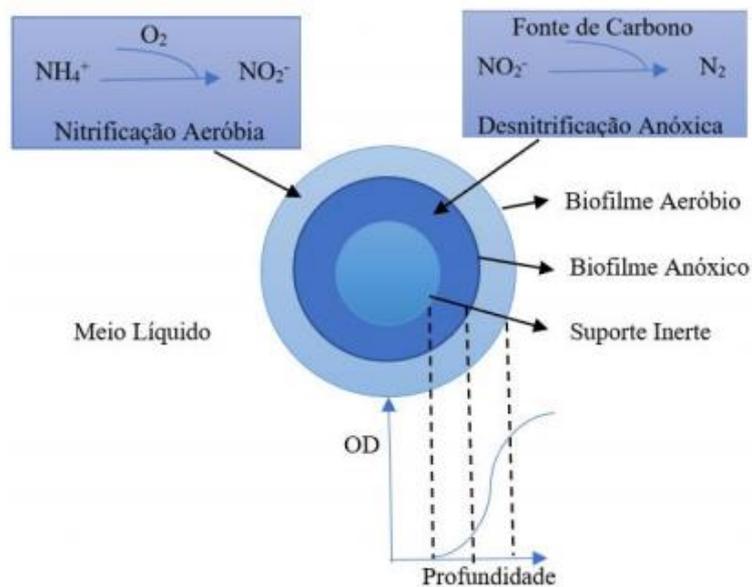
Quanto ao pH, Hwang et al. (2006) relatam que a desnitrificação não possui tanta sensibilidade às variações deste parâmetro, e que esta pode ocorrer

em valores de pH entre 6,5 e 8,5. Os autores realizaram uma análise filogenética e constataram que houve maior diversidade e uniformidade da comunidade microbiana quando o pH caiu de 9 para a faixa ótima estabelecida entre 6,5 a 7,5.

Entre os parâmetros que influenciam o processo de desnitrificação o OD é considerado o mais importante, tendo em vista que a maioria das bactérias desnitrificantes são anaeróbias facultativas, ou seja, elas utilizam o nitrato como um receptor terminal de elétrons na ausência de oxigênio livre, em meio anóxico (VAN RIJN et al., 2006; METCALF e EDDY, 2015).

A presença de oxigênio dissolvido, que é um aceptor de elétrons mais eficiente em termos de energia, pode suprimir o processo de desnitrificação por competição direta ou por inibição enzimática. Em sistemas de crescimento aderido onde as bactérias crescem aderidas ao meio suporte, havendo a presença de microambientes anóxicos no interior do biofilme, isso ocorre pelo fato de que o oxigênio pode ser consumido por bactérias facultativas ao longo do transporte por difusão (Figura 2). Algumas pesquisas tem apresentado o processo de desnitrificação em concentrações de OD de 4,0 a 5,0 mg.L<sup>-1</sup>, porém a taxa de desnitrificação é reduzida com o aumento dessa concentração (GUTIERREZ-WING et al., 2012). Além do mais, a presença de OD no meio permite aumentar o consumo das fontes de carbono no sistema, pois uma parcela desse carbono orgânico será consumida pela respiração aeróbia e não pela desnitrificação (BOLEY e MULLER, 2005, GUTIERREZ-WING et al., 2012).

Figura 2 - Representação do biofilme com o gradiente de OD em função da remoção de nitrogênio.



Fonte: Mezzomo (2019).

### 3.5 NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS

A partir do trabalho de Pochana e Keller (1999) outras pesquisas foram realizadas como as de Do Canto et al. (2008) e Correa et al. (2018), a fim de avaliar a viabilidade da remoção de nitrogênio de águas residuárias em um único reator, tal processo é denominado como nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS). A NDS refere-se ao processo de nitrificação e desnitrificação acontecendo simultaneamente (CHANG et al., 2019).

Os processos de nitrificação e desnitrificação simultâneas acontecem em virtude de fenômenos físicos e biológicos. O fenômeno físico desse processo ocorre em maior abundância, havendo uma taxa de variação da concentração de oxigênio dissolvido no interior do floco ou biofilme, sendo consequência da redução da capacidade do oxigênio se propagar até o centro (Figura 2). Com isso, as bactérias nitrificantes se desenvolvem na superfície do floco e as desnitrificantes no núcleo, pois é a região que possui menor concentração de oxigênio dissolvido (HU et al., 2009).

Uma possível explicação biológica para o processo NDS e também um fator que torna esse processo vantajoso quando comparado ao processo

convencional, é o fato deste acontecer em um único reator sob condição aeróbia/anóxica. No caso do fenômeno biológico a explicação pode estar relacionada a presença de nitrificantes heterotróficas e desnitrificantes autotróficas ou, ainda, a coexistência da nitrificação e desnitrificação em baixas concentrações de OD, não necessitando, assim, de um segundo tanque anóxico (JOO et al., 2006; ZHAO et al., 2017); além da redução de custos de operação do sistema e redução na demanda de oxigênio (DO CANTO et al., 2008).

Zhao et al. (2017) destaca que o processo NDS, pode economizar espaço (área, volume) e simplificar o processo de remoção de nitrogênio. Em função disso, diversos estudos têm sido desenvolvidos utilizando reatores de crescimento aderido visando a remoção de nitrogênio de águas residuárias (MOURA et al., 2012; BARANA et al., 2013; WOSIACK et al., 2015; CORREA et al., 2018).

Estudos indicam que alguns microrganismos possuem funções diferentes durante a remoção de nitrogênio. Um exemplo são as bactérias oxidantes de nitrito, como *Nitrospira defluvii* que se mostraram capazes de realizar oxidação completa de  $N-NH_3$  a  $N-NO_3^-$  (van Kessel et al., 2015). Além dessas, as *Cupriavidus sp. S1* apresentaram a capacidade de oxidar  $N-NH_3$  diretamente para  $N_2$  (Sun et al., 2016).

Há fatores que podem influenciar o processo de NDS. Um desses é a presença de uma fonte biodegradável de carbono, que é crucial para a realização da etapa de desnitrificação. Outro fator importante está relacionado ao tamanho do floco/biofilme que influencia diretamente na eficiência do processo, devido à criação de uma zona anóxica no interior do floco/biofilme pelo fenômeno de difusão do OD. A concentração de OD no meio é outro fator que afeta a NDS, (Pochana e Keller, 1999; Zhu et al., 2007). A concentração de OD ideal está em uma faixa de micro aeração entre 0,1 e 1,5  $mg.O_2.L^{-1}$  (Bueno et al., 2018; Feng et al., 2018; Yan et al., 2019).

Algumas pesquisas mostraram que a relação DQO/N também pode afetar o desempenho do mecanismo NDS (Liu et al., 2013; Lin et al., 2016; Wang et al., 2019). Quando a proporção de DQO é muito alta em relação ao nitrogênio, há o acúmulo de bactérias heterotróficas que competem pelo OD com bactérias autotróficas, por conseguinte resulta em menor eficiência de nitrificação. E quando a situação é invertida, ou seja, a proporção de nitrogênio é muito alta em

relação à DQO, a falta de matéria orgânica acarreta na redução da eficiência da desnitrificação. Portanto, a relação DQO/N é um parâmetro fundamental para o sistema (Ding et al., 2018; Pelaz et al., 2018).

De acordo com Yoo et al. (1999) e Bernat et al. (2011) os sistemas NDS possuem a capacidade de manter o pH do reator sem que haja adição de uma fonte externa de ácidos ou bases. Isso ocorre devido aos processos de nitrificação e desnitrificação ocorrerem simultaneamente, onde na nitrificação há o consumo de alcalinidade, enquanto na desnitrificação há produção.

### **3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A combinação de sistemas de tratamento de biomassa aderida com aeração intermitente (ou seja, tornar o sistema aeróbio-anóxico) e recirculação de efluente, traz algumas vantagens como, por exemplo, na fase aeróbia requer baixa potência de aeração, reduz o custo de operação, há menor produção de lodo biológico, quando comparado a sistemas de lodos ativados.

Além disso, a recirculação proporciona a diluição e retratamento dos poluentes e estabiliza o sistema quanto ao pH e alcalinidade. A fase aeróbia propicia a remoção de matéria orgânica e sólidos remanescentes, além de oxidar o nitrogênio a nitrito e nitrato, enquanto a anóxica promove remoção de matéria orgânica e redução dos nitritos e nitratos.

No caso das águas residuárias de laticínios o processo pode ser vantajoso, já que possibilita remoção de matéria orgânica e nitrogênio, os quais podem apresentar altas concentrações dependendo dos tipos de produtos que são processados na indústria.

Ainda faltam estudos sobre o comportamento altas cargas orgânicas volumétricas sobre o reator de leito estruturado em sistema aeróbio-anóxico, principalmente sobre concentrações limite que o sistema de tratamento suporta, de modo a evitar choque de carga à biomassa e a inibição da ação dos microrganismos.

Além da busca em atender as exigências da legislação quanto aos padrões de lançamento do efluente, o aperfeiçoamento de pesquisas e metodologias favoráveis para o tratamento de águas residuárias de laticínios

possibilita o desenvolvimento de sistemas com melhor custo-benefício em seu tratamento.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Considerando que o objetivo da pesquisa foi avaliar a influência da variação da carga orgânica na atividade das bactérias nitrificantes, desnitrificantes e heterotróficas em um reator de leite estruturado com aeração intermitente e recirculação do efluente no tratamento de águas residuárias de laticínio.

Esta consistiu da operação do sistema experimental e o monitoramento dos parâmetros físico-químicos foram realizadas no Laboratório de Hidráulica e Saneamento da UEL, e das análises microbiológicas foram feitas no Laboratório de Microbiologia da UTFPR – Câmpus Londrina.

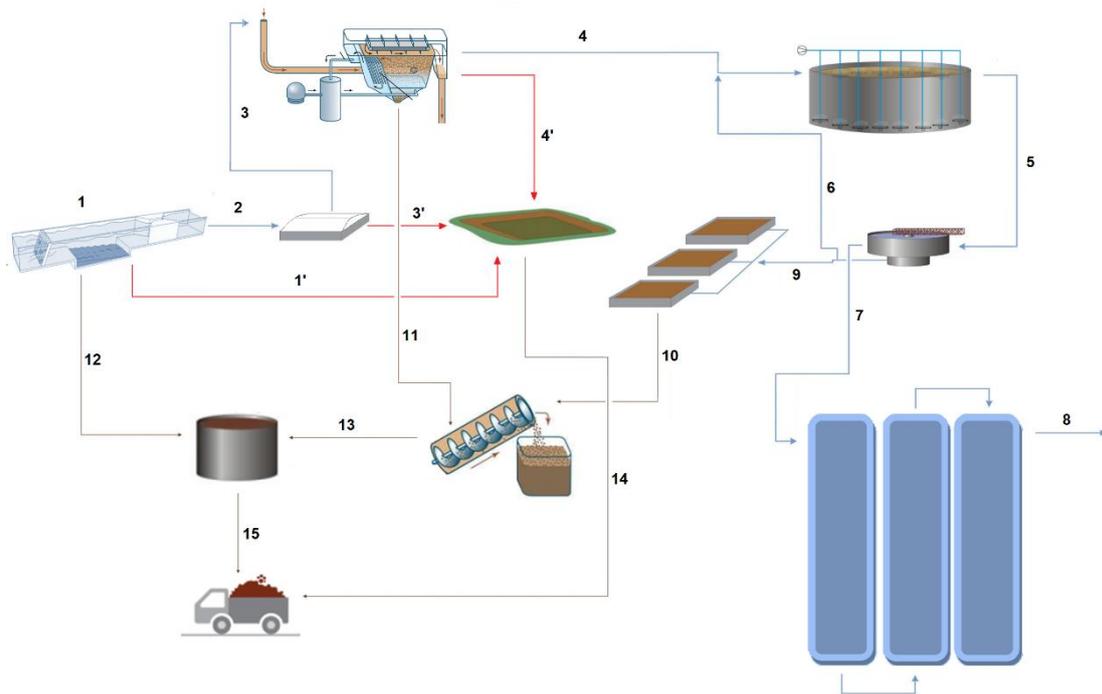
### **4.1 EFLUENTE DE LATICÍNIOS**

O efluente utilizado para alimentar o sistema de tratamento foi coletado em uma indústria de laticínios localizada na região Norte do Estado do Paraná.

Tal indústria produz diversos tipos de produtos, como bebidas lácteas, creme de leite, iogurtes, leite pasteurizado, leite em pó e integral e também compostos lácteos.

A indústria possui um sistema de tratamento preliminar (calha parshall, gradeamento e caixa de areia), seguido de um tanque de equalização enclausurado e de um sistema de flotação que promove 70% de remoção dos sólidos sedimentáveis, gorduras e matéria orgânica (onde a coleta foi realizada). O tratamento secundário é composto por um sistema de lodos ativados seguido de duas lagoas facultativas para polimento (Figura 3). As coletas foram realizadas no início de cada fase experimental para garantir a homogeneidade do efluente. O efluente foi armazenado sob refrigeração (4°C) para manter as características físico-químicas até o momento de sua utilização.

**Figura 3 - Representação do sistema de tratamento da indústria de laticínios em que se realizou a coleta.**



**Legenda:** 1 - Tratamento preliminar (gradeamento, desarenador e calha Parshall); 1', 3' e 4' - "fulga" para o tanque pulmão; 2 - entrada do tanque de equalização; 3 - entrada do sistema de flotação por ar dissolvido; 4 - entrada do tanque de aeração (lodos ativados); 5 - entrada do decantador secundário; 6 - recirculação de lodo; 7 - entrada das lagoas facultativas de polimento; 8 - saída do efluente para o corpo receptor; 9 - descarte de lodo para os leitos de descarte; 10 - lodo levado para a centrífuga; 11 - descarte de lodo e gordura do flotor para a centrífuga; 12 - descarte dos sólidos grosseiros; 13 - descarte do lodo seco; 14 e 15 coleta e destinação dos rejeitos para aterro sanitário.

Fonte: Autoria própria (2020).

## 4.2 DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE TRATAMENTO

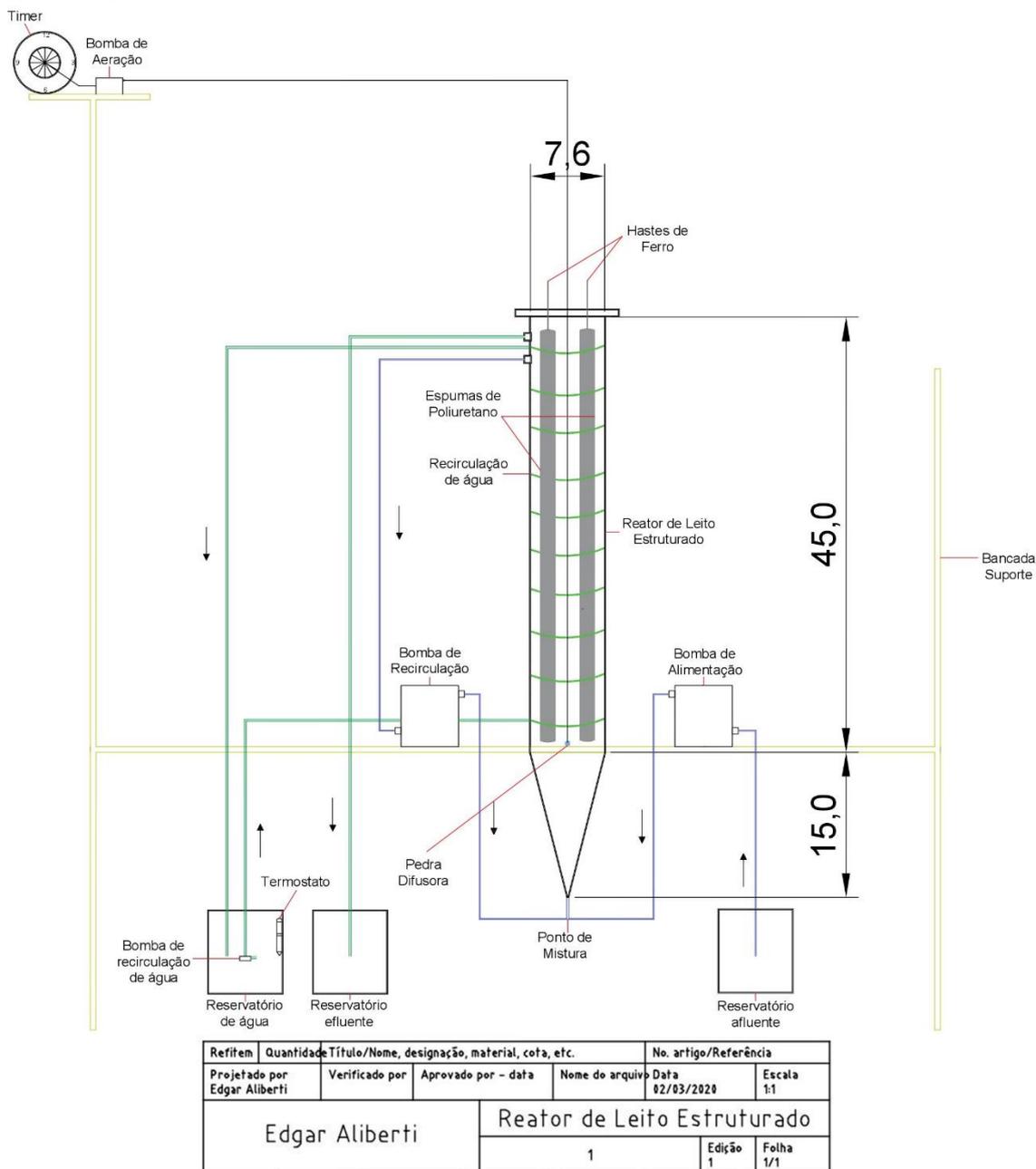
O sistema de tratamento foi composto por um reator construído em acrílico, com material suporte fixo, com volume total de 2,27 L, cujo volume útil é de 1,32 L, volume de lodo de 0,20 L e 0,75 L de material suporte, este reator possuía um diâmetro interno de 7,6 cm e altura total de 60 cm.

Quanto ao material suporte foram utilizadas espumas de poliuretano recortadas em forma de cilindros com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e 48 cm de altura. O sistema possuía 4 cilindros fixados por meio de hastes de ferro presas na parte superior do reator.

O reator era alimentado em fluxo contínuo por meio de uma bomba dosadora (ProMinent modelo GALA). A recirculação de efluente, realizada por bomba dosadora similar à usada na alimentação, foi de 3 vezes a vazão de entrada ( $Q_r = 3Q_e$ ), portanto não houve necessidade de adição de alcalinidade. A aeração do sistema era realizada por meio de uma bomba de ar para aquário com duas saídas (Panther II), com vazão total de ar aproximada de  $6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  e potência de 3,5 W. O sistema experimental está ilustrado na Figura 4.

A temperatura do reator era mantida em  $28^\circ\text{C}$  por meio de um termostato (ROXIN) utilizando um sistema de recirculação de água no entorno do reator. A manutenção da temperatura teve por objetivo proporcionar as melhores condições para o crescimento e atividade microbiana e, concomitantemente, melhor eficiência no tratamento.

**Figura 4- Sistema de tratamento utilizado nos procedimentos experimentais.**



**Fonte: Autoria própria (2020).**

### 4.3 FASES EXPERIMENTAIS

O estudo foi desenvolvido em três fases experimentais definidas pela variação das cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas no sistema de tratamento, como apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3 - Fases experimentais no reator de leito estruturado.**

<b>Fase</b>	<b>TDH (h)</b>	<b>Aeração intermitente (aeração/não aeração) (h)</b>	<b>COV (KgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>
I	16	2/1	1,2
II	16	2/1	1,4
III	16	2/1	1,8

**Fonte: Autoria própria (2020).**

O ciclo de aeração intermitente e o TDH utilizados foram definidos com base nos trabalhos de Moura et al. (2012) e Correa et al. (2018). Para aumentar a carga, o efluente coletado foi caracterizado e misturado com leite em pó desnatado (1 g.L<sup>-1</sup>) também previamente caracterizado. A utilização do leite em pó foi de acordo com Sung e Dague (1995).

#### **4.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS**

Os parâmetros físico-químicos monitorados, bem como as frequências das análises são apresentados no Quadro 1. As análises foram realizadas conforme os procedimentos analíticos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

**Quadro 1 Parâmetros e frequências das análises para monitoramento do reator.**

Parâmetro	Sigla/Unidade	Frequência semanal	Método	Número
Potencial hidrogeniônico	pH	3	Potenciométrico	4500-H <sup>+</sup> B
Alcalinidade	Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	3	Titulométrico	2320 B
Sólidos Totais	ST (mg.L <sup>-1</sup> )	2	Série de sólidos	2540 B
Sólidos Voláteis Totais	SVT (mg.L <sup>-1</sup> )	2	Série de sólidos	2540 E
Sólidos Fixos Totais	SFT (mg.L <sup>-1</sup> )	2	Série de sólidos	2540 E
Sólidos em Suspensão Totais	SST (mg.L <sup>-1</sup> )	2	Série de sólidos	2540 D
Sólidos em Suspensão Voláteis	SSV (mg.L <sup>-1</sup> )	2	Série de sólidos	2540 E
Sólidos em Suspensão Fixos	SSF (mg.L <sup>-1</sup> )	2	Série de sólidos	2540 E
Demanda Química de Oxigênio	DQO	3	Colorimétrico	5220 D
Nitrogênio Kjeldahl Total	NKT	*	Kjeldahl	4500- N <sub>org</sub> / 4500- NH <sub>3</sub> C
Nitrogênio Amoniacal	N-NH <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	2	Titulométrico	4500- NH <sub>3</sub> B/C
Nitrito (efluente)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.N.L <sup>-1</sup> )	2	Colorimétrico (FIA)	4500- NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> B
Nitrato (efluente)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.N.L <sup>-1</sup> )	2	Colorimétrico (FIA)	4500- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

\*Análises realizadas quinzenalmente

Fonte: A autoria própria (2020).

## 4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram realizadas no início e fim de cada fase experimental, com o intuito de quantificar as bactérias presentes no efluente (EF), material suporte (MS) e lodo (LD). Para isto, foram realizadas análises das concentrações de bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e bactérias oxidadoras de nitrito (BON), bem como das bactérias desnitrificantes e heterotróficas. Quanto às bactérias nitrificantes e desnitrificantes a quantificação era realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP), já as heterotróficas foram determinadas pelo método de Contagem Padrão em Placa (CPP). Além disso, foram realizadas análises quantitativas da biomassa aderida no MS pela estimativa da concentração de SSV.

### 4.5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO NMP.mL<sup>-1</sup> DE BOA, BON, DESNITRIFICANTES E HETEROTRÓFICAS

A preparação das amostras (EF, MS e LD) foi realizada de acordo com o descrito no trabalho de Correa et al. (2018).

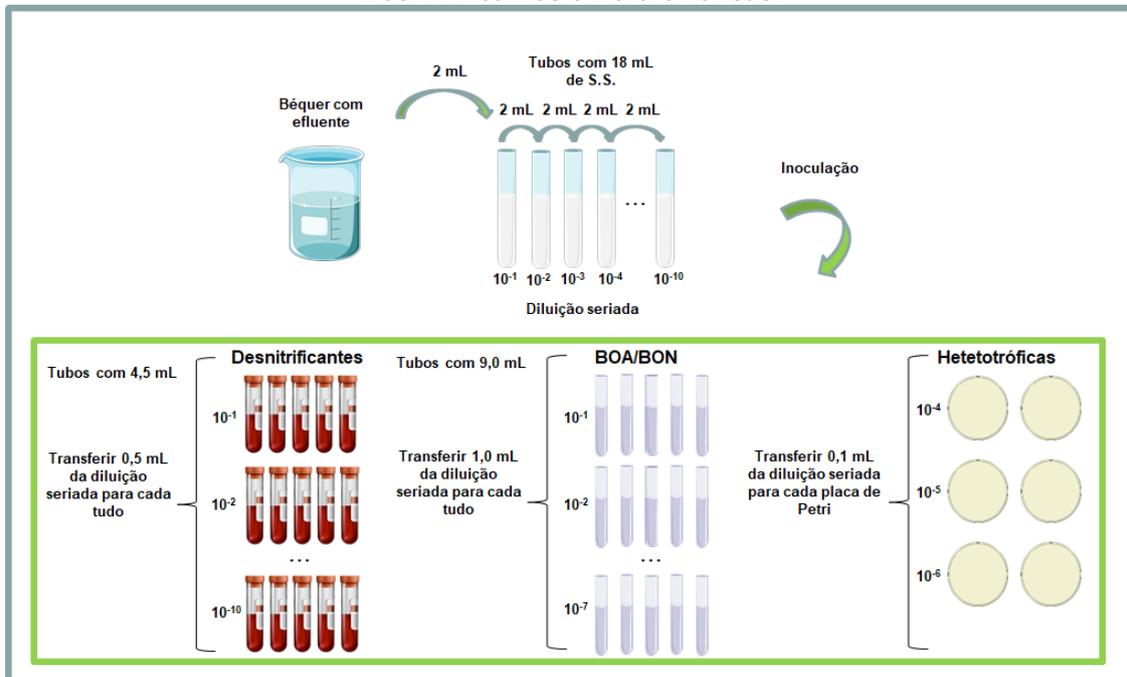
Para a quantificação dos microrganismos presentes no efluente, foi coletada uma amostra de 10 mL do meio líquido do reator, sendo uma alíquota de 2 mL utilizada na diluição em série em solução salina para posterior inoculação para determinação de NMP de BOA e BON e desnitrificantes e CPP de heterotróficas. O procedimento é ilustrado na Figura 5.

Quanto ao material suporte, foi coletada uma amostra aleatória de espuma de dentro do reator, com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura. Esta amostra era dividida em três partes de 0,4 cm<sup>3</sup> com formato de um prisma triangular. A primeira foi utilizada no processo de diluição em série, a segunda para estimar a concentração de SSV da biomassa aderida no material suporte e a terceira para extração de EPS total.

A amostra do MS (primeira parte) retirada para o procedimento de diluição em série, era inserida em um tubo Falcon de 50 mL, com 10 gramas de pérolas de vidro estéreis e 20 mL de água destilada estéril. Esse tubo Falcon era levado ao Vortex (Biomixer) para ser agitado por 10 minutos para desprender a biomassa aderida. O resultado desta agitação era considerado a primeira

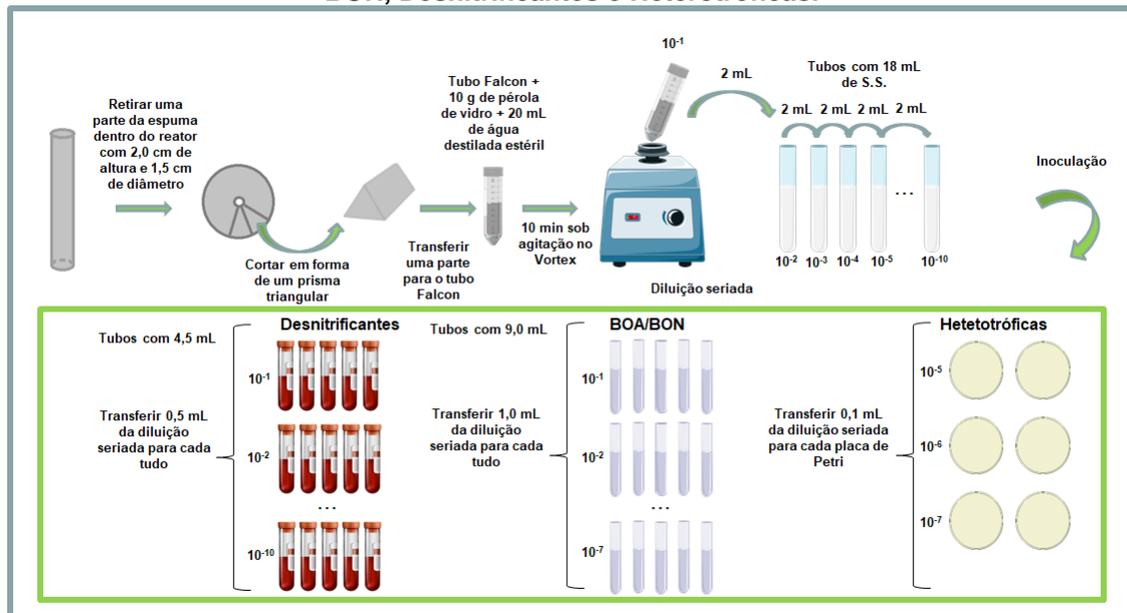
diluição do MS. A Figura 6 representa o procedimento de preparação da amostra para diluição em série e inoculação para determinação de NMP de BOA, BON, desnitrificantes e CPP de heterotróficas.

**Figura 5 - Preparação das amostras do efluente para quantificação de BOA, BON, Desnitrificantes e Heterotróficas.**



**Legenda:** BOA – bactérias oxidadoras de amônia; BON – bactérias oxidadoras de nitrito; S.S. – solução salina.  
**Fonte:** Autoria própria (2020).

**Figura 6 - Preparação das amostras do material suporte para quantificação das BOA, BON, Desnitrificantes e Heterotróficas.**



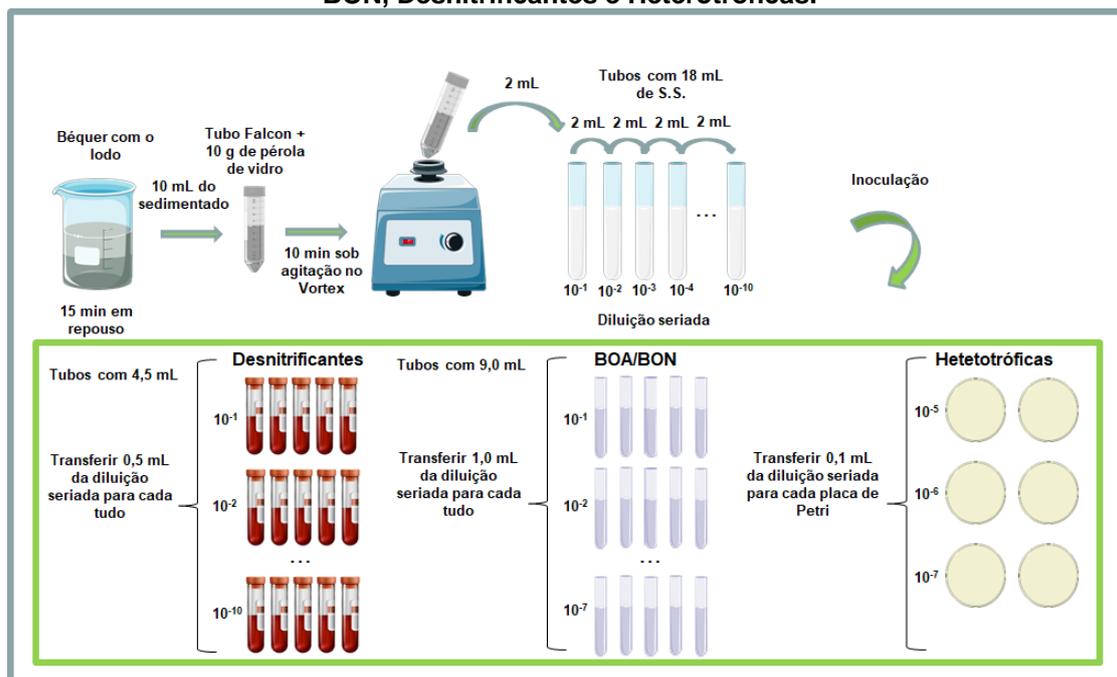
**Legenda:** BOA – bactérias oxidadoras de amônia; BON – bactérias oxidadoras de nitrito; S.S. – solução salina.

**Fonte:** Autoria própria (2020).

A segunda parte da amostra do material suporte era colocada em outro tubo Falcon, com 20 mL de água e levada para agitação em Vortex por um período de 5 min. Após transcorrido este tempo, o líquido era transferido para uma cápsula de porcelana calcinada. Este procedimento foi repetido quatro vezes para promover a remoção de toda a matéria orgânica retida no material suporte. A análise de SSV foi realizada de acordo com APHA (2012).

No caso das análises de quantificação do LD, uma amostra era coletada na entrada inferior do reator (aproximadamente 50 mL). A amostra coletada ficava em repouso por um período de 15 minutos, após este procedimento coletava-se uma alíquota de 10 mL do material sedimentado que era transferida para um tubo Falcon de 50 mL com 10 gramas de pérola de vidro estéril e agitada por 10 minutos no Vortex, para que ocorresse a lise dos flocos. Após esse período no Vortex coletava-se 2 mL do material obtido para iniciar o processo de diluição seriada e inoculação para determinação de NMP de BOA, BON, desnitrificantes e CPP de heterotróficas (Figura 7).

**Figura 7 - Procedimento de preparação da amostra de lodo para quantificação das BOA, BON, Desnitrificantes e Heterotróficas.**



**Legenda: BOA – bactérias oxidadoras de amônia; BON – bactérias oxidadoras de nitrito; S.S. – solução salina.**

**Fonte: Autoria própria (2020).**

#### 4.5.1.1 Quantificação das bactérias oxidadoras de amônia e nitrito (BOA e BON)

Para determinação do Número Mais Provável (NMP) de BOA e BON foi utilizada a metodologia de Schmidt & Belser (1984) a qual foi adaptada para amostras de esgoto sanitário descrita em Mendonça (2002) com modificações.

Este procedimento foi realizado para EF, MS e LD, nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  (Figuras 5, 6 e 7). Ao finalizar a inoculação os tubos eram levados à estufa incubadora (BOD) por 20 dias, a uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ .

Após o período de incubação realizava-se testes seguindo o procedimento descrito em Mendonça (2002). A presença de BOA era verificada observando se havia presença de nitrito. No caso de BON, os testes permitiam verificar se havia presença de nitrato.

O cálculo do NMP de BOA e BON foi realizado a partir da Equação 7 e de acordo com a Tabela Padrão de Probabilidade, descritas no APHA (2012) a qual utiliza a combinação dos tubos positivos.

$$NMP = \frac{\text{Valor NMP (Tabela)} * 10}{\text{Maior diluição da combinação de tubos positivos}} \quad (\text{Eq. 7})$$

#### 4.5.1.2 Quantificação das bactérias desnitrificantes

Para quantificar NMP das bactérias desnitrificantes, foi utilizada a metodologia de Tiedje (1984) adaptada para amostras de esgoto sanitário, conforme descrita em Mendonça (2002), com modificações.

Este procedimento foi realizado para EF, MS e LD, nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  que foram inseridas em tubos vedados com tampas emborrachadas (Figuras 5, 6 e 7). Ao finalizar a inoculação os tubos eram levados à estufa incubadora (BOD) por 5 dias, a uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ .

Após o período de incubação a presença de desnitrificantes era constatada por meio de testes que permitiam verificar se o nitrato havia sido consumido, seguindo o procedimento descrito em Mendonça (2002).

O cálculo do NMP era feito da mesma forma adotada para as bactérias nitrificantes (BOA e BON).

#### 4.5.1.3 Quantificação das bactérias heterotróficas

Quanto à determinação das bactérias heterotróficas foi utilizada a metodologia de CPP descrita em Silva Filho e Oliveira (2004). O meio de cultura utilizado para essa análise foi o Plate Count Agar (Merck) (PCA) e o preparo segue as especificações do fabricante. Cada placa de Petri preparada tem em torno de 20 mL de meio de cultura sólido.

No processo de inoculação era utilizada uma alíquota de 0,1 mL em cada uma das placas de Petri, e o espalhamento era realizado por meio de um “swab”. A inoculação foi realizada para EF, MS e LD, nas diluições de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para o EF e  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  para MS e LD, como pode ser observado nas Figuras 5, 6 e 7. O procedimento foi feito em duplicata. Essas placas foram incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por um período de 24 horas.

A quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi realizada utilizando um contador de colônias (MARCONI). O cálculo foi realizado

conforme Silva Filho e Oliveira (2004) descrito na Equação 8 e o resultado expresso em UFC.mL<sup>-1</sup>.

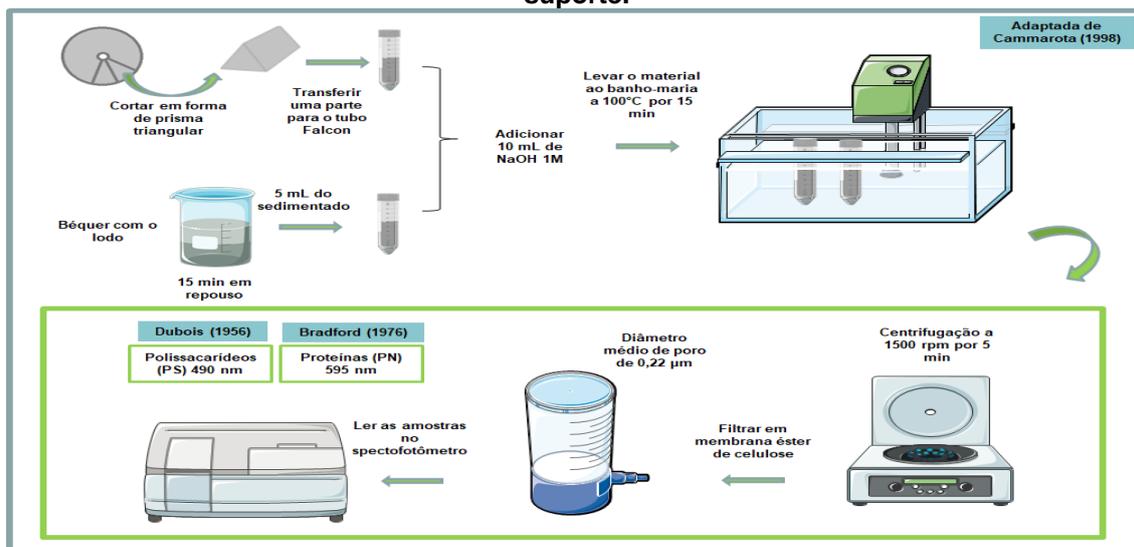
$$N^{\circ} \text{ de bactérias } \left( \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = (\text{média do n}^{\circ} \text{ de colônias} * \text{diluição} * 10^a) \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde, (a) multiplica-se por 10 visto que a metodologia utiliza apenas 0,1mL/placa.

#### 4.6 EXTRAÇÃO DO EPS TOTAL

A extração do EPS total foi determinada após a lise completa das células aderidas ao material suporte e ao lodo a partir de metodologia adaptada de Cammarota (1998). Para extração do EPS total do MS e do LD, utilizou-se dois tubos Falcon de 50 mL, um para o MS (a terceira parte do material suporte coletado) e outro para o LD (5mL de lodo sedimentado), após a colocação das amostras em ambos os tubos foram adicionados 10 mL de solução de NaOH 1 mol/L. Em seguida, os recipientes eram colocados em banho-maria à 100°C, durante 15 minutos. Ao finalizar este período, o material suporte era retirado e os tubos centrifugados por 5 minutos a 1.500 rpm e posteriormente filtrados em membrana éster celulose (diâmetro médio de poro de 0,22 µm). Os sobrenadantes foram submetidos à determinação de polissacarídeos totais (PS) e proteínas totais (PT) em espectrofotômetro (HACH), conforme a Figura 8.

**Figura 8 - Procedimento de extração do EPS total das amostras de lodo e material suporte.**



Fonte: Autoria própria (2020).

#### 4.6.1 DETERMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E PROTEÍNAS DO LODO (LD) E DO MATERIAL SUPORTE (MS)

Após as extrações, para determinação da concentração de PS foi utilizado o método colorimétrico de Dubois et al. (1956). Este método consiste na reação da amostra com fenol após ser aquecido com a adição de ácido sulfúrico. Ao término da reação, a amostra era resfriada com gelo e lida a 490 nm em espectrofotômetro. Para a construção da curva de calibração foi utilizada a glicose como padrão.

Para determinar a concentração das PT foi utilizado o método de Bradford (1976), que é baseado na reação das proteínas com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, após a reação foi feita a leitura de absorbância em 595 nm, em espectrofotômetro. Para a elaboração da curva de calibração foi utilizada a albumina de soro bovina como padrão.

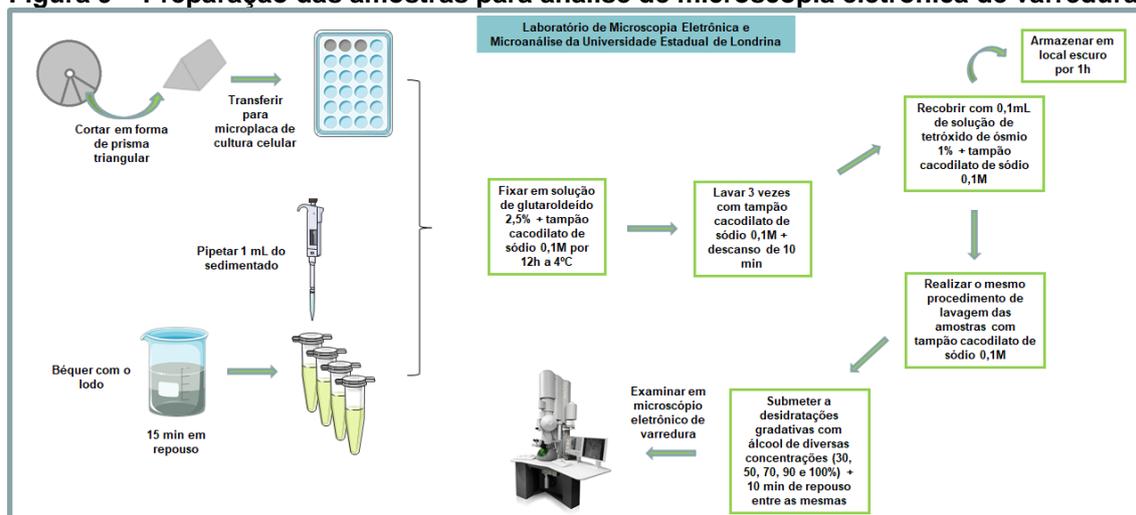
#### 4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O exame microscópico foi realizado no lodo e material suporte ao final de cada fase operacional utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Esta realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da

Universidade Estadual de Londrina em um microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

O preparado das amostras para a análise foi realizado de acordo com a metodologia utilizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, conforme a Figura 9.

**Figura 9 – Preparação das amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura.**



Fonte: Autoria própria (2020).

Foram coletadas quatro amostras de LD (após sedimentação) de 1 mL e três de MS de 50 cm<sup>3</sup> em forma de prisma triangular. As amostras de LD foram adicionadas em tubos *ependorf* de 2 mL, e as amostras de MS em microplaca de cultura celular de 24 poços. Feito isso as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Esse material ficou submerso na solução fixadora por 12 horas, a temperatura de 4°C.

Após o período de fixação, as amostras foram “lavadas” com tampão cacodilato de sódio 0,1M por três vezes, com pausas de 10 minutos a cada lavagem. Feita a última lavagem retirou-se o tampão das amostras e recobriu as mesmas com 0,1 mL de uma solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato de sódio 0,1M. Em seguida as amostras foram armazenadas em local escuro para o ósmio não oxidar por 1 hora.

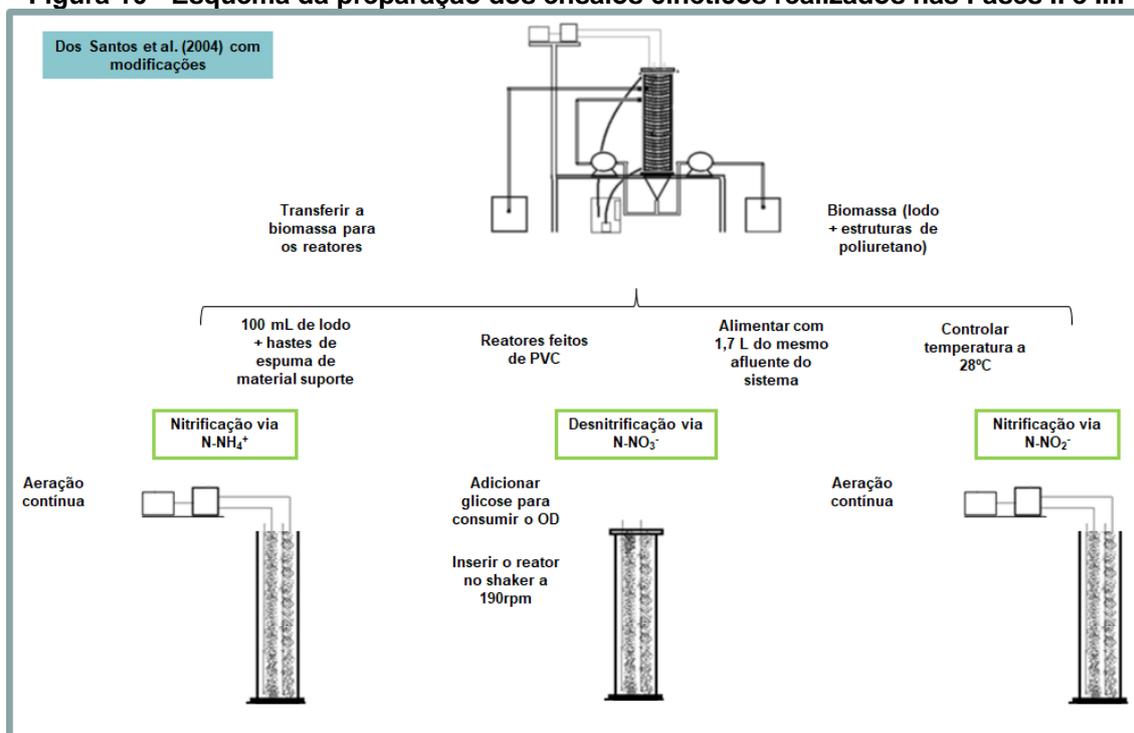
Finalizado esse tempo a solução foi retirada e realizou-se a lavagem das amostras para a retirada do ósmio, seguindo o mesmo procedimento de lavagem citado acima, com tampão cacodilato 0,1M.

Ao proceder a última lavagem para remoção do ósmio as amostras foram submetidas a desidratações gradativamente com álcoois de diversas concentrações (30, 50, 70, 90 e 100%), onde a cada lavagem as amostras permaneceram em repouso por 10 minutos com os álcoois, sendo a desidratação a 100% realizada três vezes.

#### 4.8 ENSAIOS CINÉTICOS DE CONSUMO DE AMÔNIA, NITRITO E NITRATO

Ao fim das Fase II e III, foram realizados ensaios cinéticos utilizando a biomassa proveniente do próprio reator de leito estruturado. A biomassa constituiu nas estruturas de poliuretano e de lodo, onde foram transferidos 100mL de lodo e duas hastes de espumas de material suporte do reator para cada um dos reatores em bateladas construídos em PVC, o reator para os testes cinéticos foi alimentado com 1,7L do mesmo afluente que alimentava o reator de leito estruturado na fase estudada (Figura 10), porém com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_2$  ou  $\text{NaNO}_3$ . Para os ensaios cinéticos o reator foi mantido em aeração contínua seguindo a metodologia de Dos Santos et al. (2004) com modificações.

**Figura 10 - Esquema da preparação dos ensaios cinéticos realizados nas Fases II e III.**



Fonte: Autoria própria (2020).

Eram realizados simultaneamente os ensaios de nitrificação via N-amoniacal (nitritação), e o ensaio de desnitrificação via N-nitrato, porém em reatores diferentes. Já o ensaio de nitrificação via N-nitrito (nitração) era realizado no dia seguinte no mesmo reator utilizado para o ensaio de nitrificação via N-amoniacal, porém com outro afluente. Durante os ensaios a temperatura dos reatores foi mantida em 28°C.

Para o ensaio de nitrificação via N-amoniacal, o afluente foi preparado contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de modo a se obter uma concentração final de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio na forma de amônia. Já no ensaio via N-nitrito, o afluente foi preparado contendo  $\text{NaNO}_2$ , com uma concentração de aproximadamente  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio na forma de nitrito.

No ensaio cinético de desnitrificação via N-nitrato, o afluente foi preparado contendo  $\text{NaNO}_3$ , resultando uma concentração de  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio na forma de nitrato.

Para os ensaios de nitrificação as amostras eram coletadas de um tempo zero (antes de iniciar os ensaios) até o tempo final (Quadro 2), que foi estabelecido pelo fim da concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  ou a partir do momento que o consumo cessou para a nitritação e o mesmo para o  $\text{N-NO}_2^-$  no ensaio de nitração. No tempo zero foram feitas análises de pH,  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NO}_3^-$ , DQO total e filtrada e NKT. Após o início dos ensaios, as análises de pH foram realizadas a cada 2h, as análises de  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  a cada 30 minutos, DQO total e filtrada e NKT somente ao fim de cada ensaio. As análises de  $\text{N-NH}_4^+$  foram realizadas a cada 1h para o ensaio de nitritação e a cada 2h para o de nitração. Estas análises foram realizadas conforme metodologia descrita em APHA (2012).

**Quadro 2 – Tempo em que as amostras eram coletadas em cada ensaio cinético.**

Tempo (h)	Nitrificação via N-amoniacal					Nitrificação via N-nitrito					Desnitrificação via N-nitrato				
	pH	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>x</sub>	NKT	DQO <sub>T/F</sub>	pH	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>x</sub>	NKT	DQO <sub>T/F</sub>	pH	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>x</sub>	NKT	DQO <sub>T/F</sub>
0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
0,5			X					X					X		
1,0		X	X					X					X		
1,5			X					X					X		
2,0	X	X	X			X	X	X					X		
2,5			X					X					X		
3,0		X	X					X					X		
3,5			X					X					X		
4,0	X	X	X			X	X	X					X		
4,5			X					X					X		
5,0		X	X					X					X		
5,5			X					X					X		
6,0	X	X	X			X	X	X					X		
6,5			X					X					X		
7,0		X	X					X					X		
7,5			X					X					X		
8,0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Fonte: Autoria própria (2020).

No ensaio cinético para avaliar a velocidade de desnitrificação via N-nitrato. Previamente, foi monitorado o consumo do OD por meio de um oxímetro e após ser consumido, o reator em bateladas foi inserido em um shaker com agitação de 190 rpm e temperatura e 28°C. No tempo zero foram feitas análises de pH, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, DQO total e filtrada e NKT. Após o início dos ensaios as amostras de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram coletas a cada 30 minutos enquanto os outros parâmetros foram analisados ao término do ensaio, como observado no Quadro 2. O fim do ensaio de desnitrificação foi estabelecido pelo consumo total do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou quando esse consumo fosse estabilizado. Ao final dos ensaios de nitrificação e desnitrificação, foram coletadas amostras de material suporte e lodo para a determinação da concentração de SST, SSV e SSF, com o intuito de realizar o cálculo das velocidades de nitrificação, nitratação e desnitrificação (APHA, 2012).

Tanto os dados dos ensaios de nitrificação, quanto os de desnitrificação, foram ajustados aos modelos de reação de ordem zero e primeira ordem, porém o ajuste foi melhor para o de ordem zero, no qual a velocidade da reação é independente da concentração dos substratos. A Equação 9 mostra a equação de enésima ordem.

$$(r_N) = \frac{dC}{dt} = KC^n \quad (\text{Eq. 9})$$

Ao considerar como uma reação de ordem zero, substitui-se “n” por 0, obtendo-se:

$$(r_N) = \frac{dC}{dt} = KC^0 \quad (\text{Eq. 10})$$

Ao integrar a Equação 10 para a concentração inicial de nitrogênio ( $C_{N_0}$ ) no tempo inicial  $t_0$  até a concentração  $C_N$ , no tempo  $t$ , obtém-se a expressão que indica a variação da concentração específica de nitrogênio linearmente com o tempo (Equação 11).

$$C_N = C_{N_0} - kt \quad (\text{Eq. 11})$$

Em que:

$k$  = constante cinética de ordem zero ( $\text{mgN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );

$t$  = tempo (h);

$C_N$  = concentração final do substrato ( $\text{mgN.L}^{-1}$ ); e

$C_{N0}$  = concentração inicial do substrato ( $\text{mgN.L}^{-1}$ ).

#### 4.9 CÁLCULO DAS EFICIÊNCIAS DO REATOR

Para análise das eficiências de remoção de nitrogênio total, NKT e eficiência de desnitrificação foram utilizadas as Equações 12, 13 e 14, respectivamente, conforme Barana et al. (2013), tanto para remoção de nitrogênio total (NT), quanto para remoção de nitrogênio Kjeldhal (NKT). Enquanto, a eficiência de amonificação foi calculada a parti da Equação 15.

$$NT (\%) = \frac{(NKT_{af} - NKT_{ef} - NO_2^- - NO_3^-) \times 100}{NKT_{af}} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$NKT (\%) = \frac{(NKT_{af} - NKT_{ef}) \times 100}{NKT_{af}} \quad (\text{Eq. 13})$$

$$\text{Desnitrificação} (\%) = \frac{(NKT_{af} - NKT_{ef} - NO_2^- - NO_3^-) \times 100}{(NKT_{af} - NKT_{ef})} \quad (\text{Eq. 14})$$

$$\text{Amonificação} (\%) = \frac{(NKT_{af} - NH_{4+af}) - (NKT_{ef} - NH_{4+ef}) \times 100}{(NKT_{af} - NH_{4+af})} \quad (\text{Eq. 15})$$

Em que:

NKT (%) é a porcentagem de remoção de NKT;

Desnitrificação (%) é a eficiência de desnitrificação;

NT (%) é a porcentagem de remoção de nitrogênio total;

$NKT_{af}$  é a concentração afluente de NKT;

$NKT_{ef}$  é concentração efluente;

$\text{NH}_4^+_{af}$  é a concentração afluyente de nitrogênio amoniacal;

$\text{NH}_4^+_{ef}$  é a concentração efluente de nitrogênio amoniacal;

$\text{NO}_2^-$  é a concentração de nitrito no efluente; e

$\text{NO}_3^-$  é a concentração de nitrato efluente.

Já a eficiência de remoção de DQO foi calculada a partir da Equação 16.

$$\text{Remoção de DQO (\%)} = \frac{(DQO_{af} - DQO_{ef}) \times 100}{DQO_{af}} \quad (\text{Eq. 16})$$

Sendo:

DQO (%) é a porcentagem de remoção de DQO;

$DQO_{af}$  é a concentração de afluyente de DQO; e

$DQO_{ef}$  é concentração efluente.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi aplicada nos resultados de pH, alcalinidade, nitrogênio, matéria orgânica e da série de sólidos com o objetivo de verificar se houve equivalência estatística entre os resultados, essa análise foi feita utilizando o software *OriginPro 8*, a partir da utilização do teste de hipótese ANOVA (um critério), com um nível de decisão de  $\alpha = 0,05$  (p-valor < 0,05).

Com o mesmo software foi utilizada uma ferramenta estatística denominada Box-Plot nos resultados dos parâmetros físico-químicos, que possibilita visualizar a distribuição dos pontos amostrados, pois o *box* apresenta o primeiro quartil (25%), a mediana (50%) e o terceiro quartil (75%) como medidas de variação, bem como os valores extremos dos dados (máximo e mínimo da distribuição). Neste tipo de representação, quanto maior a altura do *Box* (distância interquartilica), maior será a variação dos resultados, por conseguinte, maior será o desvio padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos da operação do reator de leito estruturado. O sistema foi operado em TDH de 16h e para COV de 1,2, 1,4 e 1,8 kgDQO.m<sup>3</sup>d<sup>-1</sup>, respectivamente fases I, II e III.

### 5.1 pH E ALCALINIDADE

Na Tabela 4 são apresentados os valores médios de pH e alcalinidade afluente (af) e efluente (ef) obtidos nas três fases estudadas.

**Tabela 4 - Médias e desvio padrão do pH e da alcalinidade afluente e efluente durante a operação do reator nas três fases estudadas.**

Fase	pH		Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	
	Af	Ef	Af	Ef
I	6,97±1,14 <sup>a</sup>	8,51±0,53 <sup>a</sup>	277±124 <sup>a</sup>	320±73 <sup>ab</sup>
II	6,15±0,91 <sup>b</sup>	8,23±0,26 <sup>ab</sup>	212±136 <sup>a</sup>	365±92 <sup>a</sup>
III	5,89±0,76 <sup>b</sup>	7,95±0,74 <sup>b</sup>	71±40 <sup>b</sup>	278±75 <sup>b</sup>

Nota: Letras iguais = valores estatisticamente iguais; Letras diferentes = valores estatisticamente diferentes ao nível de 5%; Af - Afluente; Ef - Efluente.

**Fonte: Aatoria própria (2020).**

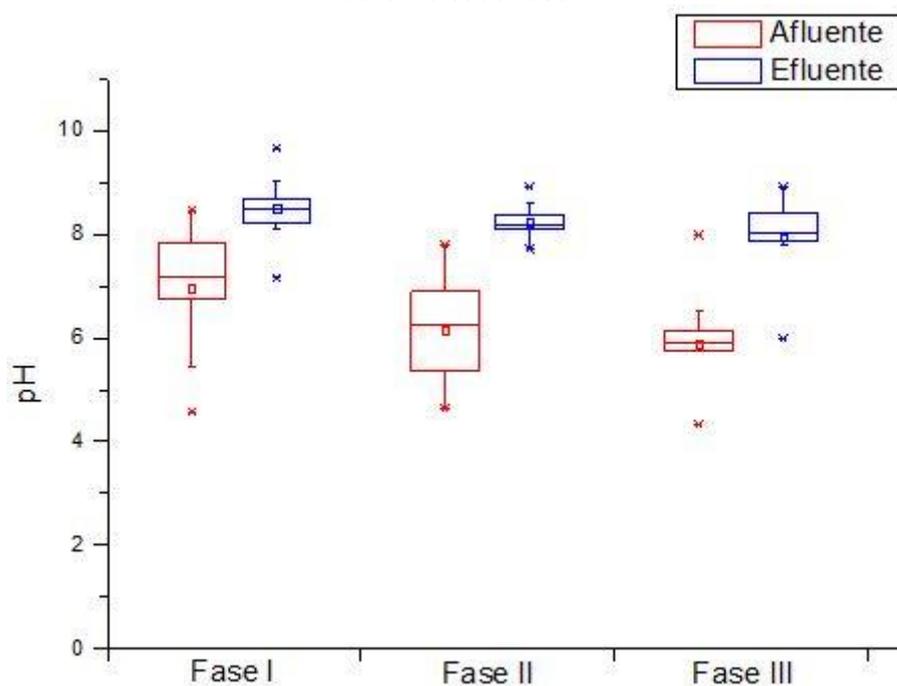
Analisando a Tabela 4, nota-se que as médias de pH e alcalinidade aumentaram do afluente para o efluente em todas as fases. Uma possível explicação para isso é a geração de alcalinidade nos processos de amonificação do nitrogênio orgânico e de desnitrificação. Corroborando assim com o descrito por Metcalf e Eddy (2015), onde para cada 1 mg de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> desnitrificado são gerados 3,57 mgCaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>, bem como para cada 1 mg de N-orgânico amonificado são gerados 3,57 mgCaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. A geração de alcalinidade pelos processos de desnitrificação e amonificação foi observada em outros estudos com o reator de leito estruturado (Moura et al., 2018). Comparando os valores médios de pH afluente entre as Fases I, II e III, verificou-se que houve uma diferença estatística entre eles, isto provavelmente ocorreu devido a variabilidade das características físico-químicas da água residuária coletada, cujas as coletas foram realizadas no início de cada uma das fases. Os valores de pH efluentes apresentaram semelhança estatística entre as Fases I e II, o que também ocorreu entre as Fases II e III.

Nos trabalhos de Silva (2018) verificou-se o aumento nos valores de pH do afluente para o efluente em todas as fases estudadas. O mesmo ocorreu no trabalho de Ferro (2018), porém o aumento é maior durante a fase anóxica. Sendo semelhante ao ocorrido no presente trabalho.

Os valores médios da alcalinidade do afluente nas Fases I e II foram estatisticamente iguais diferindo da Fase III, enquanto para o efluente os valores das Fases I e II foram semelhantes, bem como para as Fases I e III. Este aumento pode ser explicado pela degradação da matéria orgânica e amonificação da nitrogenada e pela desnitrificação (Speece, 1996). A recuperação da alcalinidade foi observada por Sun et al. (2015) na fase anóxica de um sistema anaeróbio-aeróbio utilizado para tratar lixiviado de aterro.

Na Figura 11 pode-se observar o diagrama *Box-plot* de distribuição dos resultados do pH afluente e efluente durante cada fase.

**Figura 11 - Diagrama *Box-plot* de distribuição dos dados de pH afluente e efluente durante cada fase.**



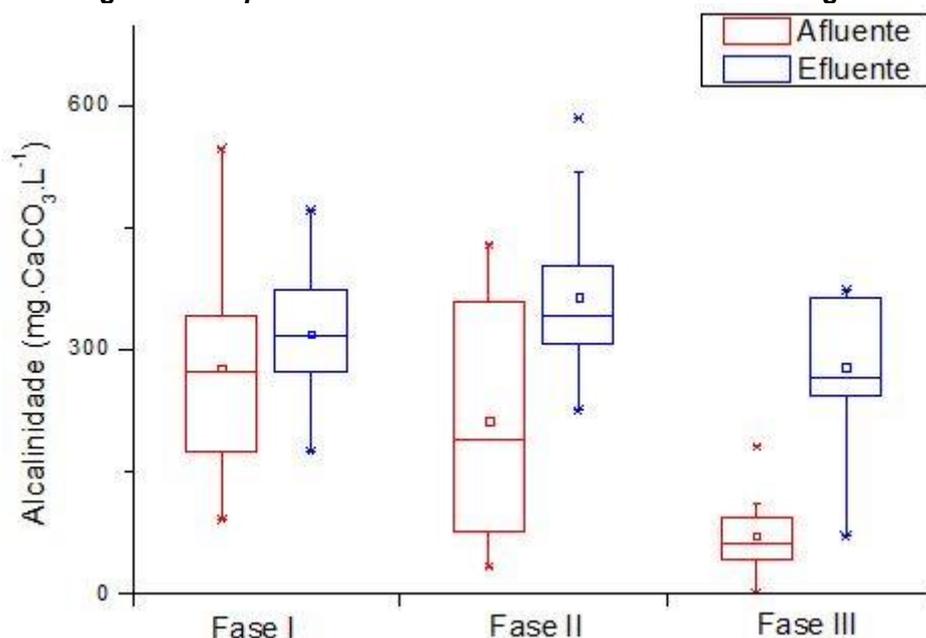
Fonte: Autoria própria (2020).

A partir da análise da Figura 11, é possível observar que houve pouca variação nos dados de pH efluentes quando as cargas foram alteradas de 1,2 para 1,4 kgDQO.m<sup>3</sup>d<sup>-1</sup> e de 1,4 para 1,8 kgDQO.m<sup>3</sup>d<sup>-1</sup>. Além disso, percebe-se que todos os dados do *box plot* possuem valores atípicos (*outliers*), e que os

valores afluentes, encontram-se mais próximos a mediana com assimetria a esquerda, enquanto os valores efluentes, encontram-se próximos a mediana com assimetria a direita para a Fase II e a esquerda para a Fase III, na Fase I os dados são simétricos.

Na Figura 12 visualiza-se o diagrama *box-plot* de distribuição dos resultados alcalinidade afluente e efluente para todas as fases do estudo. Nesta figura nota-se grande dispersão nos dados de alcalinidade.

**Figura 12 - Diagrama *box-plot* da alcalinidade afluente e efluente ao longo de cada fase.**



**Fonte: Autoria própria (2020).**

A Fase II foi a que apresentou maior dispersão para a alcalinidade afluente, enquanto a III apresentou a menor dispersão. No caso do efluente a maior variabilidade foi na Fase III, cuja a COV (1,8 kgDQO.m<sup>3</sup>d<sup>-1</sup>) era a maior entre as fases, e a Fase II, com COV intermediária, apresentou menor variabilidade na alcalinidade.

Basicamente todos os boxes foram assimétricos a esquerda, com exceção do box de alcalinidade efluente da Fase I.

## 5.2 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

A Tabela 5 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações de NKT, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e a relação DQO/NKT obtidas.

**Tabela 5 - Médias das concentrações de nitrogênio afluente e efluente.**

Fase	NKT (mg/L)		N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)		N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Relação DQO/NKT
	Af	Ef	Af	Ef	Ef	Ef	
I	35,9±15,5 <sup>a</sup>	6,8±4,1 <sup>a</sup>	3,7±3,2 <sup>a</sup>	1,3±2,6 <sup>a</sup>	0,7±0,8 <sup>a</sup>	1,7±1,3 <sup>a</sup>	22±3
II	56,2±17,7 <sup>a</sup>	14,8±6,8 <sup>a</sup>	2,1±1,6 <sup>a</sup>	5,1±4,3 <sup>ab</sup>	0,7±0,5 <sup>a</sup>	1,5±1,1 <sup>a</sup>	16±2
III	57,1±9,3 <sup>a</sup>	31,9±22,0 <sup>b</sup>	1,8±1,8 <sup>a</sup>	7,1±7,7 <sup>b</sup>	1,0±1,9 <sup>a</sup>	3,0±2,2 <sup>b</sup>	21±1

Nota: Letras iguais = valores estatisticamente iguais; Letras diferentes = valores estatisticamente diferentes ao nível de 5%; Af - Afluente; Ef - Efluente.

**Fonte: Autoria própria (2020).**

A Tabela 6 apresenta as médias e desvio padrão das eficiências de desnitrificação, amonificação, remoção de NKT e NT obtidas.

**Tabela 6 - Médias das eficiências de desnitrificação, amonificação e das remoções de NKT e NT.**

Fase	Eficiência (%)			
	Remoção de NKT	Remoção de NT	Desnitrificação	Amonificação
I	81±11 <sup>a</sup>	74±4 <sup>a</sup>	92±5 <sup>ab</sup>	82±8 <sup>a</sup>
II	74±12 <sup>a</sup>	70±3 <sup>b</sup>	95±3 <sup>a</sup>	82±8 <sup>a</sup>
III	54±31 <sup>b</sup>	37±7 <sup>c</sup>	85±15 <sup>b</sup>	54±15 <sup>b</sup>

Nota: Letras iguais = valores estatisticamente iguais; Letras diferentes = valores estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

**Fonte: Autoria própria (2020).**

Observando a Tabela 5, constata-se que os valores de NKT do efluente foram semelhantes estatisticamente entre as Fases I e II, diferindo da Fase III, enquanto os valores de eficiência de remoção de NT diferiram-se estatisticamente para todas as fases, conforme a carga orgânica foi aumentando a eficiência de remoção de NKT e NT decresceu. As maiores eficiências de remoção de NKT e NT ocorreram para a Fase I e as menores para a Fase III

Quanto à eficiência de desnitrificação, houve equivalência estatística entre as Fases I e II e as Fases I e III, sendo a maior média obtida na Fase II e a menor na Fase III, o que indica que o aumento da COV até a carga intermediária estudada (COV de 1,4 kgDQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>) elevou a eficiência de desnitrificação, e ao aumentar para 1,8 kgDQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> a eficiência decaiu.

Ainda pode-se notar que não houve diferença estatística entre os valores médios de  $\text{N-NO}_2^-$ , porém para os valores médios de  $\text{N-NO}_3^-$ , as Fases I e II apresentaram semelhança estatística e diferiram-se da Fase III, ainda destaca-se que o sistema não apresentou acúmulo de nitrito e nitrato durante todo o estudo.

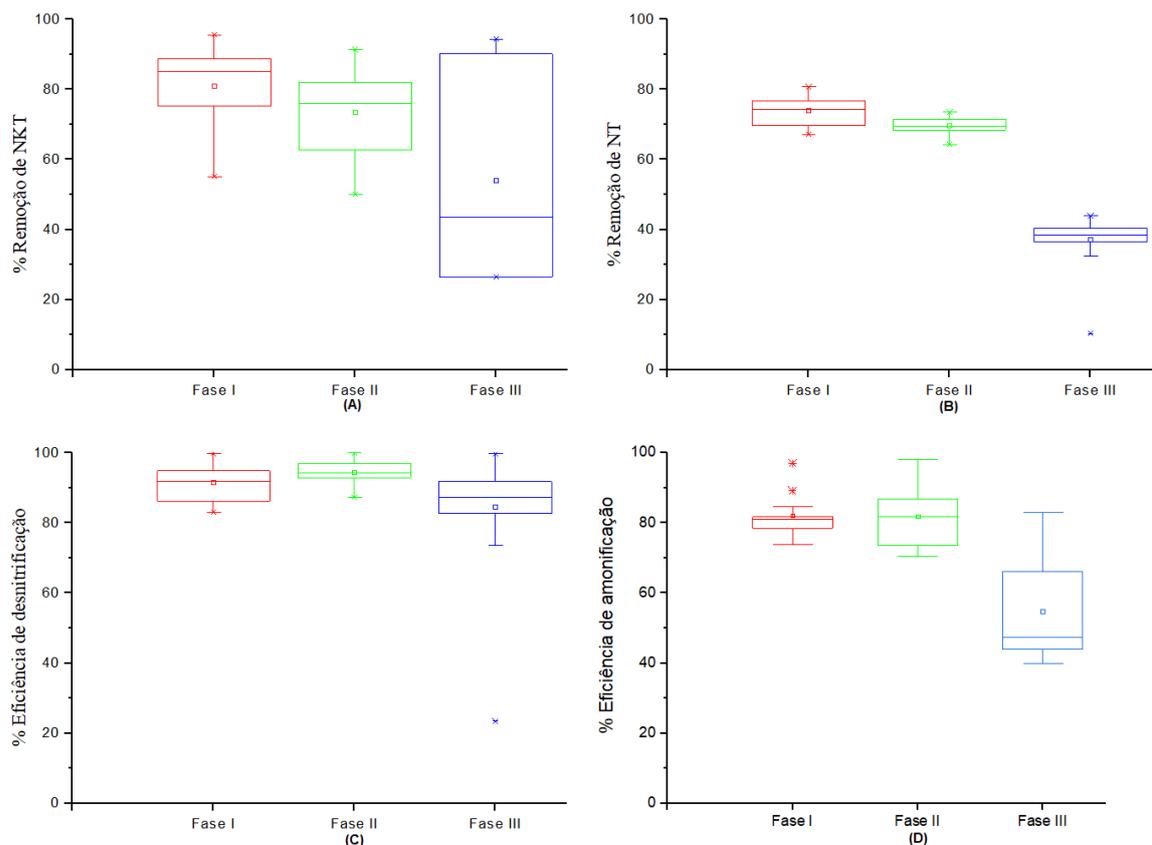
Ao analisar os dados efluentes da série de nitrogênio (Tabela 5) em conjunto com as eficiências de desnitrificação e amonificação e as eficiência de remoção de NKT e de remoção de NT (Tabela 6), nota-se que a COV de 1,8 kg de  $\text{DQO.m}^3.\text{d}^{-1}$  interfere diretamente na atividade dos microrganismos amonificantes, e conseqüentemente dos nitrificantes e desnitrificantes, ou seja, o fator limitante foi a amonificação do nitrogênio orgânico, porém houve redução na remoção de NKT e o  $\text{N-NH}_4^+$  foi maior no efluente para a COV de 1,8  $\text{kgDQO.m}^3.\text{d}^{-1}$ . Indicando interferência na atividade dos microrganismos nitrificantes também.

Corroborando com o estudo de Liu et al. (2010) que observaram que o aumento da carga afluyente de DQO reduz a eficiência de nitrificação, principalmente pela competição por OD entre bactérias heterotróficas e nitrificantes e com o estudo de Hui et al. (2019), onde os autores relataram que com a adição de carbono (aumento da relação C/N) houve aumento no crescimento celular, porém redução na liberação de  $\text{N-NH}_4^+$ .

Os resultados obtidos no presente estudo para a Fase III, em termos de remoção de NT foram distintos dos obtidos por Ferro (2018), no qual a autora obteve 55% de remoção de NT para a mesma condição de COV (1,8 kg de  $\text{DQO.m}^3.\text{d}^{-1}$ ) no tratamento de esgoto sanitário em um sistema composto por três reatores em série, sendo um reator anaeróbio híbrido, um reator aeróbio de leito fixo e um reator anóxico de leito fixo (anaeróbio-aeróbio-anóxico) submetido a variações de cargas orgânicas e hidráulicas. Essa menor remoção também está associada com a baixa remoção de NKT.

A distribuição dos resultados da eficiência de remoção de NKT e NT, bem como da eficiência de desnitrificação ao longo de cada fase podem ser observadas na Figura 13.

**Figura 13 - Diagrama *box-plot* do monitoramento da eficiência de remoção de NKT (A), remoção de NT (B), da eficiência de desnitrificação (C) e da eficiência de amonificação (D) ao longo de cada fase.**



**Fonte: Autoria própria (2020).**

Na Figura 13A nota-se que a remoção de NKT apresentou elevada dispersão na Fase III, e que apresentou a menor eficiência média de remoção de NKT. Enquanto as Fases I e II foram as que apresentaram menor variabilidade e maior média.

As eficiências médias de remoção de NKT, NT, e as eficiência de desnitrificação e amonificação foram inferiores a 81% para o NKT, 74% para o NT, 95% para a desnitrificação e 82% para a amonificação.

Pela análise da Figura 13B, pode-se verificar que a Fase I, apesar da maior variabilidade, apresentou maior eficiência média de remoção de NT, seguido pela Fase II, com menor variabilidade e segunda maior média, e por fim a Fase III com menor remoção e variabilidade intermediária. As médias foram inferiores a 80%, sendo decrescente da Fase I para a Fase III, indicando que o aumento da COV interfere diretamente na remoção de NT.

Como pode-se observar na Figura 13C, as eficiências de desnitrificação apresentam níveis médios diferentes, sendo crescente da COV 1 para a COV 2 e decrescente da COV 2 para a COV 3. Ainda, comparando o *box plot* da referida figura pode-se concluir que a eficiência de desnitrificação na Fase II apresenta menor variabilidade e maior média, e conforme aumenta a COV essa variabilidade também aumenta, ou seja, a Fase III possui a maior variabilidade e menor média.

Observa-se na Figura 13D, que as eficiências de amonificação apresentam níveis médios semelhantes entre as Fases I e II, as quais são diferentes da Fase III, sendo decrescentes das COV 1 e COV 2 para a COV 3. Ainda, comparando o *box plot* da referida figura pode-se concluir que a eficiência de amonificação na Fase III apresenta maior variabilidade e menor média, e a Fase I possui a menor variabilidade e maior média.

Comparando os resultados de remoção de NKT do presente trabalho com os de Silva (2018), que utilizou um reator particionado em três zonas anaeróbia-anóxica-aeróbia, é possível observar que os valores da Fase I e II do autor (COV de 1,0 e 1,5 kg.DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>) foram próximos ao da Fase I deste trabalho, onde a autora obteve 81 e 84% de remoção, respectivamente. No entanto, com o aumento da COV para 3,0 kg.DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> (Fase III) a média de remoção aumentou para 93%, diferentemente do presente trabalho onde o aumento da COV na Fase III reduziu a eficiência de remoção. Quanto a remoção de NT a autora obteve remoções de 29,6, 32,4 e 47,8%, para as Fases I, II e III, respectivamente. Sendo inferiores aos resultados das Fases I e II deste estudo. Pois as eficiências médias de desnitrificação obtidas pela autora ficaram na faixa de 36,3 a 68,1% sendo inferiores as deste trabalho.

Ferro (2018) obteve eficiências de remoção de NT na faixa de 43 a 55%, NKT de 68 a 71% e eficiência de desnitrificação de 68 a 79%, no tratamento de esgoto sanitário sintético. No entanto, inferiores aos resultados das Fases I e II do presente estudo. A partir disso, pode-se afirmar que as eficiências de remoção médias de NKT e NT, bem como a eficiência de desnitrificação do presente estudo foram boas quando comparadas com trabalhos da literatura em que o sistema foi submetido a variação de COV.

### 5.3 REMOÇÃO DE DQO

Os resultados de DQO (total e filtrada) obtidos para o afluente e efluente, bem como o percentual de remoção, podem ser visualizados na Tabela 7.

**Tabela 7 - Médias e desvio padrão da DQO total e filtrada afluente e efluente.**

Fase	DQO afluente (mg/L)		DQO efluente (mg/L)		Eficiência de remoção (%)	
	Total	Filtrada	Total	Filtrada	Total	Filtrada
I	800±126 <sup>a</sup>	436±197 <sup>a</sup>	59±40 <sup>a</sup>	29±18 <sup>a</sup>	92±6 <sup>a</sup>	91±8 <sup>a</sup>
II	921±96 <sup>b</sup>	473±142 <sup>a</sup>	87±59 <sup>ab</sup>	22±12 <sup>a</sup>	90±6 <sup>a</sup>	95±3 <sup>a</sup>
III	1.175±78 <sup>c</sup>	876±126 <sup>b</sup>	123±104 <sup>b</sup>	41±12 <sup>b</sup>	90±9 <sup>a</sup>	96±1 <sup>a</sup>

Nota: Letras iguais = valores estatisticamente iguais; Letras diferentes = valores estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

**Fonte: A autoria própria (2020).**

A partir da Tabela 7, nota-se que o aumento da COV não teve efeito negativo sobre a remoção de DQO, tanto para a total quanto para a filtrada. Isso pode ter ocorrido devido a maior disponibilidade de matéria orgânica no sistema. Segundo Liu et al. (2010) os organismos heterótrofos, têm sua atividade metabólica estimulada pelo aumento da carga de DQO e disponibilidade de O<sub>2</sub>.

Os resultados de DQO<sub>T</sub> foram semelhantes estatisticamente para todas as fases, o mesmo ocorreu para a DQO<sub>F</sub>, no entanto a Fase I foi a que apresentou o maior valor médio de eficiência de remoção de DQO<sub>T</sub> e o menor de DQO<sub>F</sub>, enquanto as Fases II e III os valores médios foram semelhantes para DQO<sub>T</sub>, já para DQO<sub>F</sub> a Fase III apresentou maior remoção.

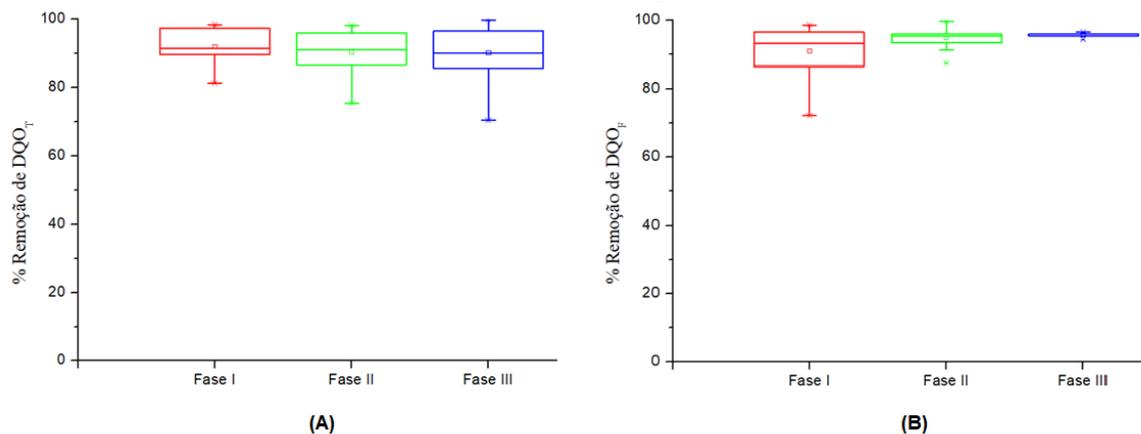
Os resultados de DQO<sub>T</sub> obtidos neste trabalho foram semelhantes aos de Ferro (2018), que obteve remoções na faixa de 95 a 97% para COVs de 1,4; 1,8; 3,3 e 3,4 kg de DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> no tratamento de esgoto sanitário em sistema anaeróbio-aeróbio-anóxico.

Silva (2018) variando a carga orgânica volumétrica aplicada no sistema (1,0; 1,6 e 3,6 kg de DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>) obteve remoções de DQO<sub>T</sub> superiores a 94%, em um reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo (RAALF), tratando efluentes de matadouro bovino, o que corrobora com os resultados de remoção de DQO do presente trabalho pois as eficiências foram muito próximas, mostrando que o aumento da COV não interfere na remoção de matéria orgânica.

Analisando a relação  $DQO_F/DQO_T$  obteve-se 55, 51 e 75 para as Fases I, II e III, respectivamente. Portanto na Fase III havia muito mais material particulado, o que leva mais tempo para hidrolisar.

Na Figura 14 são apresentadas as distribuições dos dados de  $DQO_T$  e  $DQO_F$  em diagrama *box-plot* ao longo de cada fase.

**Figura 14 - Diagrama *box-plot* de distribuição dos dados de eficiência de remoção de  $DQO_T$  (A) e de  $DQO_F$  (B) ao longo de cada fase.**



Fonte: Autoria própria (2020).

Como pode-se observar na Figura 14A, houve uma baixa variação nos dados de  $DQO_T$  aumentam conforme a COV aumenta, na Fase III os dados não apresentam assimetria, enquanto para as Fases I e II, houve assimetria a esquerda e a direita, respectivamente. Analisando em conjunto com os dados da Tabela 7, nota-se que os dados de remoção não diferem-se estatisticamente entre eles.

Pela análise da Figura 14B, os dados de  $DQO_F$  apresentam-se crescentes da COV 1 para a COV 3. Além disso, com o *box-plot* comparativo pode-se concluir, que os dados referentes a remoção de  $DQO_F$  na Fase I apresentam maior variabilidade, e essa variabilidade diminui com o aumento da COV. Para as Fases I e II houve assimetria a esquerda, enquanto que a Fase III não houve assimetria.

## 5.4 SÉRIE DE SÓLIDOS

Os resultados obtidos tanto para o afluente quanto para o efluente, dos parâmetros sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF), sólidos totais voláteis (STV), sólidos em suspensão totais (SST), sólidos em suspensão fixos (SSF) e sólidos em suspensão voláteis (SSV), são expostos nas Tabelas 8 e 9.

**Tabela 8 - Valores médios de sólidos totais, sólidos totais fixos e sólidos totais voláteis durante as três fases estudadas.**

Fase	Sólidos (mg.L <sup>-1</sup> )					
	ST af	STF af	STV af	ST ef	STF ef	STV ef
I	2.227±351 <sup>a</sup>	1.263±672 <sup>a</sup>	943±393 <sup>a</sup>	1.419±265 <sup>a</sup>	1.039±505 <sup>ab</sup>	381±414 <sup>a</sup>
II	2.147±963 <sup>a</sup>	1.160±728 <sup>a</sup>	973±423 <sup>a</sup>	1.196±502 <sup>a</sup>	1.051±520 <sup>a</sup>	173±38 <sup>a</sup>
III	1.585±293 <sup>a</sup>	660±346 <sup>a</sup>	925±218 <sup>a</sup>	766±130 <sup>b</sup>	514±122 <sup>b</sup>	252±158 <sup>a</sup>

Nota: Letras iguais = valores estatisticamente iguais; Letras diferentes = valores estatisticamente diferentes ao nível de 5%; Af - Afluente; Ef - Efluente; ST - Sólidos Totais; STF - Sólidos Totais Fixos; STV - Sólidos Totais Voláteis.

**Fonte: Aatoria própria (2020).**

**Tabela 9 - Médias e desvio dos sólidos em suspensão totais, sólidos em suspensão fixos e sólidos em suspensão voláteis.**

Fase	Sólidos (mg.L <sup>-1</sup> )					
	SST af	SSF af	SSV af	SST ef	SSF ef	SSV ef
I	511±259 <sup>a</sup>	179±81 <sup>a</sup>	339±244 <sup>a</sup>	65±25 <sup>a</sup>	26±20 <sup>a</sup>	40±22 <sup>a</sup>
II	488±376 <sup>a</sup>	151±124 <sup>a</sup>	338±305 <sup>a</sup>	91±36 <sup>a</sup>	25±18 <sup>a</sup>	65±34 <sup>ab</sup>
III	324±260 <sup>a</sup>	85±49 <sup>a</sup>	262±254 <sup>a</sup>	97±61 <sup>a</sup>	21±13 <sup>a</sup>	86±61 <sup>b</sup>

Nota: Letras iguais = valores estatisticamente iguais; Letras diferentes = valores estatisticamente diferentes ao nível de 5%; Af - Afluente; Ef - Efluente; SST - Sólidos em Suspensão Totais; SSF - Sólidos em Suspensão Fixos; SSV - Sólidos em Suspensão Voláteis.

**Fonte: Aatoria própria (2020).**

Os resultados de eficiência de remoção de sólidos são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10 - Médias e desvio da eficiência de remoção de sólidos.**

Fase	Eficiência de remoção (%)					
	ST	STF	STV	SST	SSF	SSV
I	36±8 <sup>a</sup>	30±33 <sup>a</sup>	76±10 <sup>a</sup>	87±5 <sup>a</sup>	85±10 <sup>a</sup>	86±8 <sup>a</sup>
II	44±12 <sup>ab</sup>	18±17 <sup>a</sup>	79±7 <sup>a</sup>	73±16 <sup>ab</sup>	79±14 <sup>a</sup>	70±21 <sup>ab</sup>
III	52±9 <sup>b</sup>	17±28 <sup>a</sup>	74±13 <sup>a</sup>	63±19 <sup>b</sup>	73±18 <sup>a</sup>	58±28 <sup>b</sup>

Nota: Letras iguais = valores estatisticamente iguais; Letras diferentes = valores estatisticamente diferentes ao nível de 5%; ST - Sólidos Totais; STF - Sólidos Totais Fixos; STV - Sólidos Totais Voláteis; SST - Sólidos em Suspensão Totais; SSF - Sólidos em Suspensão Fixos; SSV - Sólidos em Suspensão Voláteis.

**Fonte: Aatoria própria (2020).**

A partir da Tabela 10, nota-se que conforme a COV foi aumentada, a remoção de sólidos totais também aumentou, indicando que o sistema operado com reator de leito estruturado com biomassa aderida tem potencial de retenção de sólidos. Com exceção aos resultados de ST, SST e SSV os valores de STF, STV e SSF foram semelhantes estatisticamente entre todas as fases estudadas. No entanto, os valores de ST, SST e SSV apresentaram equivalência estatística entre as Fases I e II, e entre as Fases II e III, diferindo-se apenas entre as Fases I e III. Ao analisar os dados de remoção de STF e SSF em conjunto com os valores de remoção de SSV, notou-se que ao aumentar a COV reduz a eficiência de remoção de SSV, indicando que os materiais orgânicos e os microrganismos são arrastados no sistema.

De acordo com Mutamim e Noor (2017) a elevada idade do lodo leva ao acúmulo de matérias como sólidos orgânicos suspensos, compostos inertes, a biomassa morta e antiga. O descrito pelo autor corrobora com o presente trabalho, pois a idade do lodo é alta, o que explica o acúmulo desses materiais orgânicos e biomassa no sistema, levando a um arraste com o aumento da COV, ajudando a controlar possíveis problemas de incrustação devido ao alto tempo de retenção celular, que levam ao aumento de sólidos não biodegradáveis e de difícil biodegradação.

## **5.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS**

Os valores médios entre os dados iniciais e finais do NMP das BOA e BON durante cada fase são apresentados na Tabela 11, para as amostras do EF, MS e LD.

**Tabela 11- Médias do NMP.100mL<sup>-1</sup> das BOA e BON nos meios analisados (EF, MS e LD)**

Fases	BOA		
	EF	MS	LD
I	$7,1 \cdot 10^9 \pm 9,8 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^{12} \pm 1,9 \cdot 10^{12}$	$8,1 \cdot 10^{12} \pm 1,1 \cdot 10^{13}$
II	$7,6 \cdot 10^7 \pm 9,1 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^{10} \pm 8,8 \cdot 10^{10}$	$1,3 \cdot 10^{11} \pm 4,8 \cdot 10^{10}$
III	$1,8 \cdot 10^8 \pm 2,4 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^9 \pm 7,1 \cdot 10^9$	$3,2 \cdot 10^{10} \pm 4,9 \cdot 10^9$
Fases	BON		
	EF	MS	LD
I	$8,5 \cdot 10^9 \pm 1,2 \cdot 10^{10}$	$2,4 \cdot 10^{11} \pm 1,1 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11} \pm 6,4 \cdot 10^{10}$
II	$8,0 \cdot 10^{10} \pm 1,1 \cdot 10^{11}$	$5,9 \cdot 10^7 \pm 4,9 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^{10} \pm 5,5 \cdot 10^9$
III	$1,8 \cdot 10^6 \pm 2,5 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^7 \pm 1,2 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7 \pm 2,8 \cdot 10^7$

**Legenda: BOA – bactérias oxidadoras de amônia; BON – bactérias oxidadoras de nitrito; EF – efluente; MS – material suporte; LD – lodo.**

**Fonte: Autoria própria (2020).**

Analisando a Tabela 11, observa-se que para o MS e LD o NMP das BOA e BON apresentou redução conforme a carga foi aumentando. Sendo diferente apenas para o EF, onde o NMP das BOA foi reduzido da Fase I para a Fase II e sofreu um aumento na Fase III. Quanto as BON presentes no EF sofreram um aumento da Fase I para a Fase III, porém na Fase III apresentou um declínio no NMP. Confirmando assim a hipótese levantada sobre a competição das nitrificantes com as heterotróficas citada na análise de remoção de nitrogênio conforme ressaltou Liu et al. (2010), principalmente para as BOA.

Uma possível explicação para o aumento das BOA na Fase III e das BON na Fase II, pode ter ocorrido devido ao desprendimento das bactérias ligadas ao MS e como consequência se manterem livres no EF, quando submetidas ao aumento da carga. Isto pode ser corroborado por MENOITA et al. (2012), que descreveram que alterações no ambiente podem estar associado ao desprendimento das bactérias do biofilme.

Mediante esses resultados, uma analogia entre os resultados de remoção de NKT e NT (Tabela 6) e os de NMP das bactérias nitrificantes (Tabela 11) pode ser realizada. Na Fase I, que apresentou as melhores eficiências de remoção de NKT e NT e os maiores NMP das nitrificantes em praticamente todos os meios. Quando as eficiências de remoção de nitrogênio decrescem nas Fases II e III, o NMP demonstra que as BOA também decrescem, indicando que as bactérias presentes sofrem influência da COV diminuindo suas atividades, isso pode ser confirmado com os dados de  $N-NH_4^+$  da Tabela 5, onde o efluente

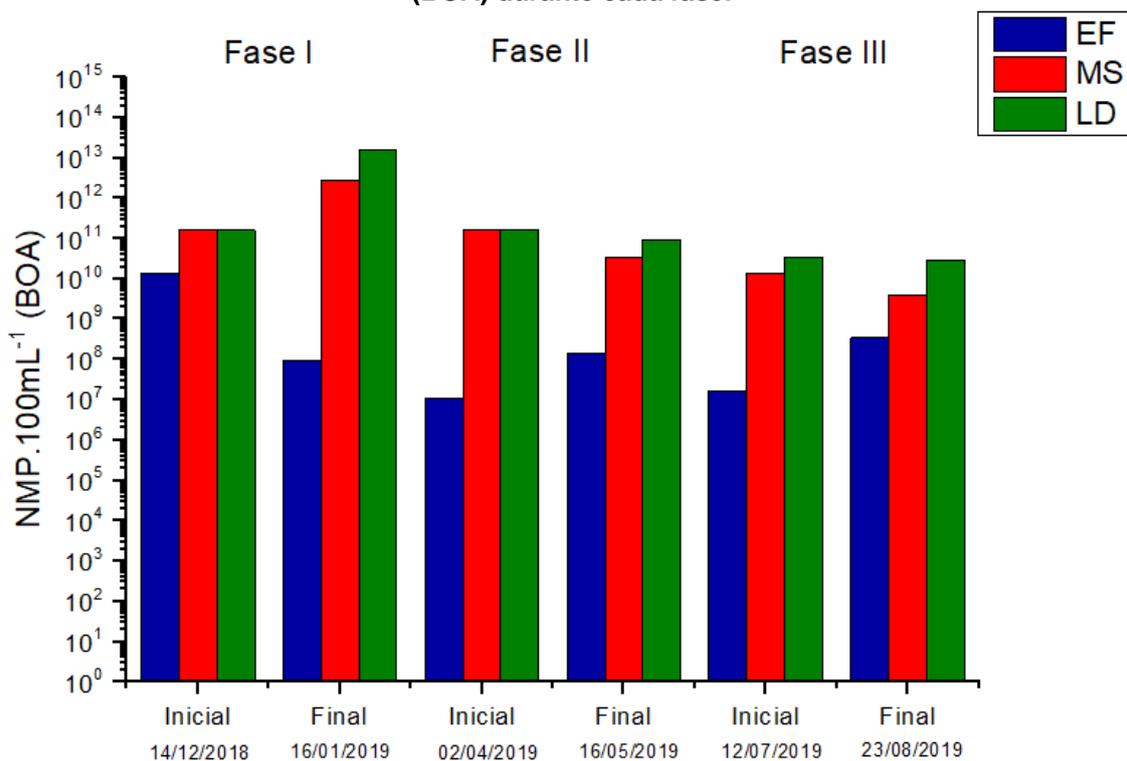
possui maior concentração dessa forma de nitrogênio. Já as BON apesar da redução não há diminuição significativa das taxas de oxidação de nitrito (Tabela 5).

Uma possível explicação para tal fato, é a influência da relação DQO/NKT (Tabela 5) utilizada, na atividade das nitrificantes, pois houve predomínio de fungos no sistema, conseqüentemente reduzindo o NMP das bactérias nitrificantes. De acordo com Zhang e Elser (2017) o crescimento desenfreado de fungos filamentosos, traz uma preocupação, principalmente pelos fungos apresentarem menor necessidade de nutrientes em comparação com bactérias, ainda segundo Mille-Lindblom et al. (2006) os fungos competem com as bactérias e podem reduzir a abundância destas na comunidade microbiana. Segundo o descrito por Chiu et al. (2007) quanto maior a relação C/N menor é a taxa de nitrificação, pois o meio fica favorável para os organismos heterotróficos, o que reforça as hipóteses levantadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho são distintos dos de Correa et al. (2018), que obtiveram para um ciclo de aeração e não aeração de 2/1 (mesmo ciclo de aeração durante todo experimento do presente trabalho) concentrações médias de BOA de  $3.10^{10}$  NMP.gSSV<sup>-1</sup> e BON de  $1.10^7$  NMP.gSSV<sup>-1</sup>, no tratamento de esgoto sanitário em reator de leito estruturado operado com COV de 0,6 kg.DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>.

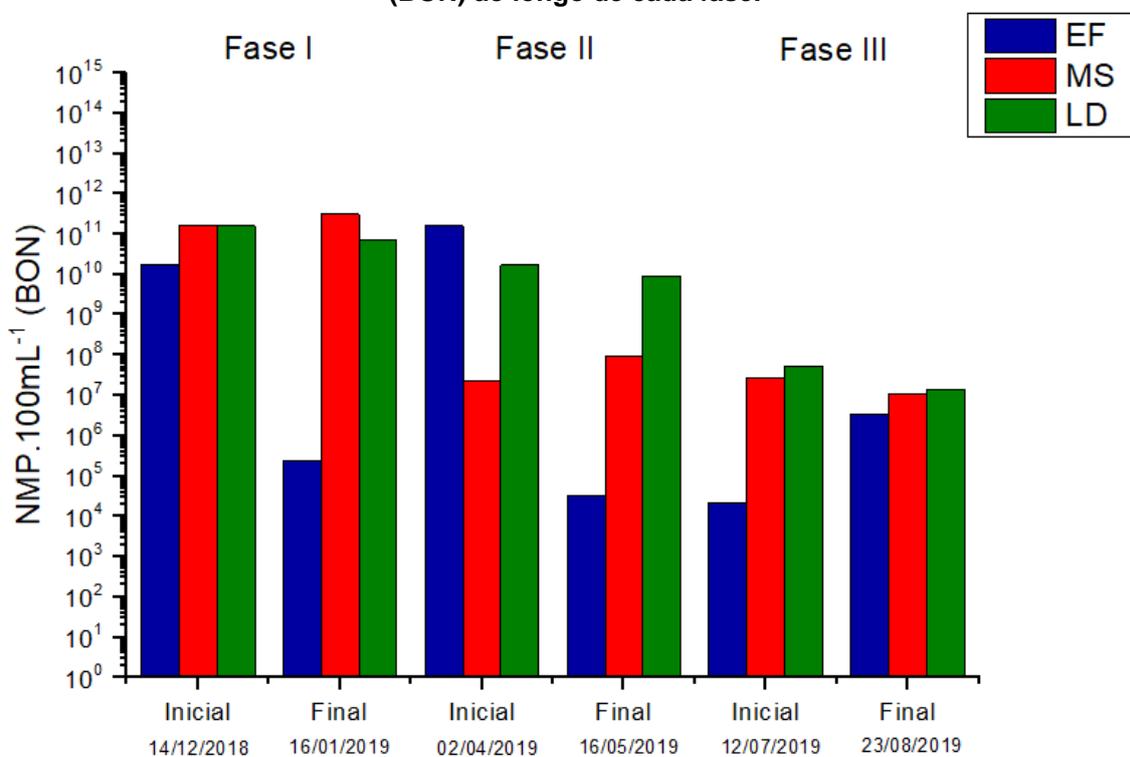
Os resultados do NMP iniciais e finais das BOA e BON nas fases experimentais são apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Figura 15 - Gráfico em barras do NMP inicial e final das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) durante cada fase.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 16 - Gráfico em barras do NMP inicial e final das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) ao longo de cada fase.



Fonte: Autoria própria (2020).

Observando-se as Figuras 14 e 15, é possível notar que a Fase I favoreceu o aumento da concentração das bactérias nitrificantes do início para o fim da fase, sendo favorável para as BOA presentes no MS e no LD, já para o EF houve redução da concentração, enquanto para as BON, houve aumento apenas na concentração das bactérias presentes no MS, os meios LD e EF apresentaram redução na concentração de BON. Uma possível explicação para isso é que as BOA do MS e LD e as BON do MS é que estas estavam adaptadas, fazendo com que a biomassa cresça com o passar do tempo, conseqüentemente há produção de EPS dificulta a transferência de OD e substrato. Tal fato é confirmado por Flemming e Wingender (2010) e Vlaeminck et al. (2010).

Para a Fase II, nota-se que o aumento da COV no início apresentou uma redução na concentração de bactérias nitrificantes em praticamente todos os meios quando comparados com a concentração final da Fase I. Ao fim da Fase II, apenas as BOA presentes no EF e as BON presentes no MS apresentaram aumento na concentração, o NMP das demais sofreram redução. Uma possível explicação para tal fato, é que as BOA presentes no LD e MS migraram e/ou desprendem-se para o EF, enquanto as BON presentes no EF deslocam-se para o MS. Esse desprendimento das BOA pode ser explicado pelo elevado tempo de retenção celular (TRC), pois após a maturação do biofilme/floco os microrganismos se desprendem se dispersando no meio, ainda pode estar associado as alterações no ambiente (MENOITA et al., 2012).

Do final da Fase II para o início da Fase III houve redução do NMP para todas as bactérias nitrificantes. Analisando o início e fim desta fase, nota-se que aumentou a concentração das BOA e BON apenas para o EF, nos meios MS e LD houve redução no NMP. Ou seja, o aumento da carga desfavorece as bactérias presentes nesses meios, fazendo com que as mesmas se desprendam e fiquem móveis no sistema. Isso pode ser explicado pela turbulência do fluxo de ar para manter a concentração de OD elevada no meio (EF), ou então pela redução do OD nos demais (MS e LD). Corroborando com ØDEGAARD et al. (2004), que descreveram que a turbulência devida ao alto fluxo de ar em reatores aeróbios que são operados com altas cargas orgânicas para manter a concentração de oxigênio em torno de  $3 \text{ mg.O}_2\text{.L}^{-1}$ , também é responsável por manter os biofilmes sempre finos, prevenindo o acúmulo excessivo de biomassa no material suporte.

Os resultados médios entre os dados iniciais e finais do NMP para as bactérias desnitrificantes no presente trabalho são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12 - Médias do NMP.100mL<sup>-1</sup> das bactérias desnitrificantes nos meios analisados (MS, EF e LD).**

Fases	Desnitrificantes		
	EF	MS	LD*
I	$1,1 \cdot 10^{12} \pm 1,6 \cdot 10^{12}$	$4,7 \cdot 10^{13} \pm 6,4 \cdot 10^{13}$	$1,6 \cdot 10^{14} \pm 0$
II	$8,0 \cdot 10^{13} \pm 1,1 \cdot 10^{14}$	$8,0 \cdot 10^{13} \pm 1,1 \cdot 10^{14}$	$1,6 \cdot 10^{14} \pm 0$
III	$2,0 \cdot 10^{13} \pm 2,2 \cdot 10^{13}$	$6,0 \cdot 10^{13} \pm 4,5 \cdot 10^{13}$	$1,6 \cdot 10^{14} \pm 0$

Nota: (\*) resultados superiores a  $1,6 \cdot 10^{14}$ ; EF – efluente; MS – material suporte; LD – lodo.

**Fonte: Autoria própria (2020).**

Analisando a Tabela 12, é possível observar que o NMP das bactérias desnitrificantes aumentou praticamente 800 vezes da Fase I para a Fase II no EF, e basicamente 20 vezes no MS. Durante a análise dos dados do LD todos os tubos apresentaram resultado positivo, indicando que o número de bactérias presentes no LD foram superiores a  $1,6 \cdot 10^{14}$  não sendo possível inferir se houve diferença entre as fases para este meio.

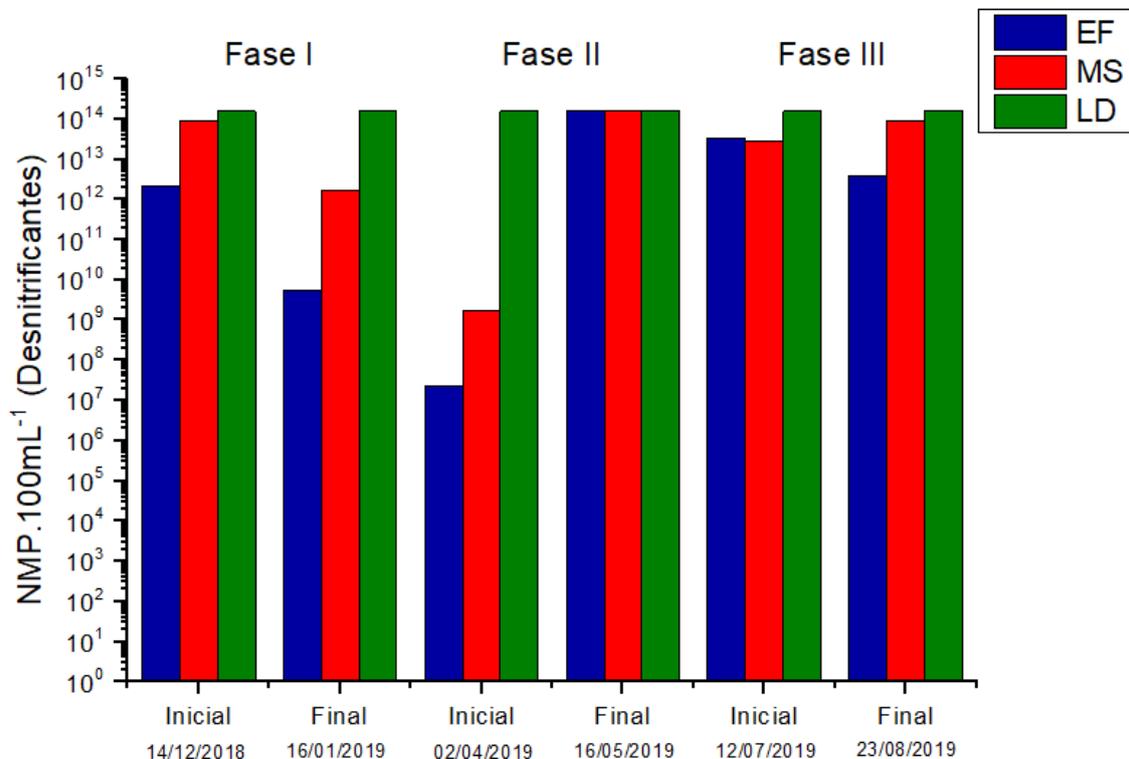
Por meio das Tabelas 6 e 12 constata-se que até a COV de 1,4 kg de DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> as bactérias desnitrificantes do meios EF e MS foram favorecidas, após o aumento da COV para 1,8 kg de DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> ocorreu o declínio no NMP para os meios EF e MS, indicando possível interferência da COV e consequentemente desfavorecimento dos microrganismos desnitrificantes. Provavelmente isto ocorreu devido ao aumento da população de fungos (MILLE-LINDBLOM et al., 2006) no sistema consequente do aumento da COV, pois ao observar a concentração de nitrato no meio, nota-se que não houve acúmulo, ou seja, as bactérias estavam desnitrificando com a pequena redução do NMP.

No trabalho de Zou et al. (2012) os autores obtiveram taxas de nitrificação na faixa de 79 a 86%, e taxas de desnitrificação entre 43,9 e 51%, para relações C/N de 4; 5,7; 8 e 10 estudando a influência da relação DQO/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na remoção de nitrogênio e estrutura do biofilme.

Os resultados médios de NMP de bactérias desnitrificantes que Correa et al. (2018) obtiveram ( $9 \cdot 10^{11}$  NMP.gSSV<sup>-1</sup>) tratando esgoto sanitário em reator de leito estruturado, são distintos do NMP médio de bactérias desnitrificantes obtidas no presente trabalho em todos os meios estudados.

Os resultados do NMP iniciais e finais das bactérias desnitrificantes nas fases experimentais são apresentados na Figura 17.

**Figura 17 - Gráfico em barras do NMP inicial e final das bactérias desnitrificantes durante cada fase.**



Fonte: Autoria própria (2020).

Na Figura 17, é possível verificar que na Fase I o NMP das bactérias desnitrificantes sofre um decaimento do início para o fim nos meios EF e MS. O mesmo decaimento continua com o aumento da COV no início da Fase II. No entanto, ao fim da Fase II o NMP das desnitrificantes sofre um grande aumento.

Na Fase I as bactérias nitrificantes foram favorecidas por uma COV menor e na Fase II as desnitrificantes foram favorecidas. Comparando com a Tabela 5, foi nessa fase que se obteve a maior eficiência de desnitrificação.

No início da Fase III, notou-se um pequeno decaimento nas concentrações de NMP quando comparado os resultados com os do final da Fase II. Em relação ao início e fim da Fase III, o meio MS apresentou um aumento de desnitrificantes, e o EF uma redução de praticamente 10 vezes.

A média da quantificação do início e fim das UFC.mL<sup>-1</sup> das bactérias heterotróficas durante cada fase experimental são apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 13 - Médias do UFC.mL<sup>-1</sup> das bactérias heterotróficas nos meios analisados (MS, EF e LD).**

Fases	Heterotróficas		
	EF	MS	LD
I	$3,6.10^7 \pm 4,1.10^7$	$3,5.10^8 \pm 4,2.10^8$	$1,4.10^{10} \pm 1,9.10^{10}$
II	$5,8.10^7 \pm 1,0.10^7$	$9,7.10^8 \pm 1,3.10^9$	$3,1.10^9 \pm 3,1.10^9$
III	$1,0.10^8 \pm 7,1.10^7$	$1,6.10^{10} \pm 2,2.10^{10}$	$1,3.10^{10} \pm 1,2.10^{10}$

**Legenda: EF – efluente; MS – material suporte; LD – lodo.**

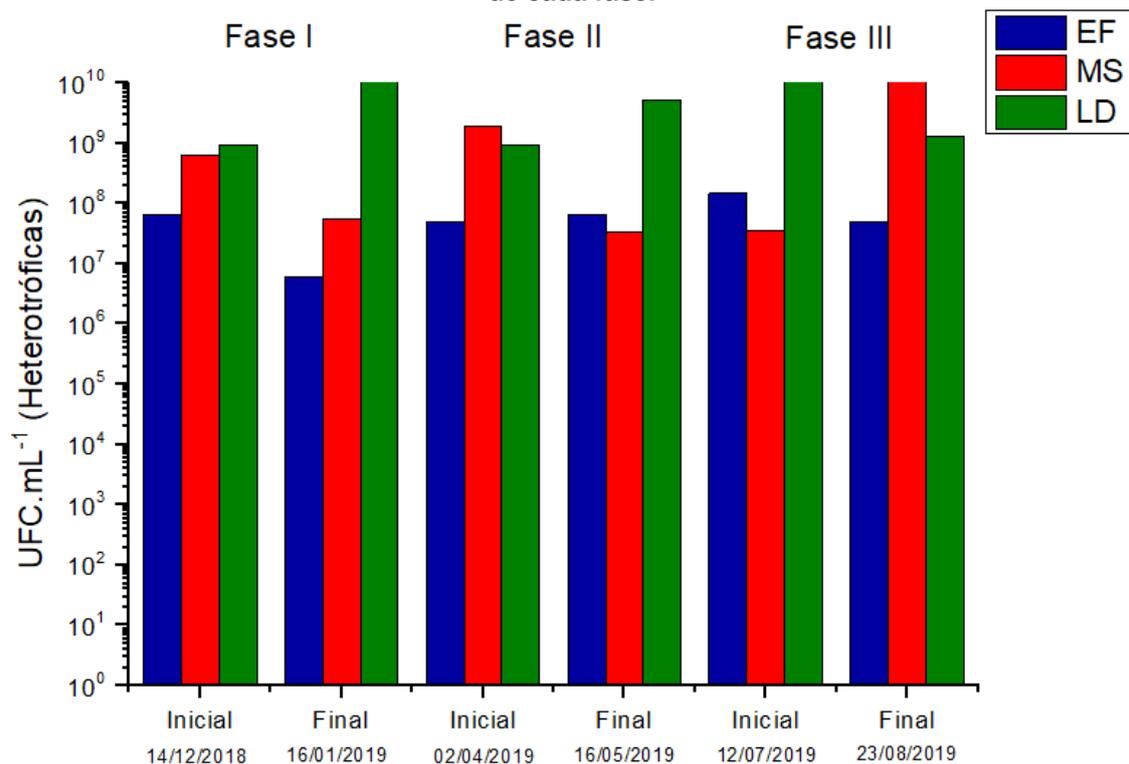
**Fonte: Autoria própria (2020).**

Com a Tabela 13 pode-se observar que para os meios EF e MS, conforme a COV é aumentada a UFC das bactérias heterotróficas também aumenta. No entanto, para o LD há uma redução da Fase I para a Fase II e depois se reestabelece na Fase III.

Uma suposição para a redução das bactérias heterotróficas presentes no LD, é que estas podem ter sido arrastadas do reator, corroborando com o descrito por Oliveira (2012). No entanto, a estimativa do UFC.mL<sup>-1</sup> foi muito menor do que a da autora que quantificou máximas de  $1,9.10^{13}$  e  $1,5.10^{13}$  para o líquido e para as biomédias (material suporte) pela mesma técnica (em meio nutriente PCA), tratando lixiviado de aterro de sanitário em reator aerado de leito móvel com recirculação de efluente.

A Figura 18 apresenta os resultados do UFC.mL<sup>-1</sup> iniciais e finais das bactérias heterotróficas nas fases experimentais.

Figura 18 - Gráfico em barras da UFC inicial e final das bactérias heterotróficas ao longo de cada fase.



Fonte: Autoria própria (2020).

A partir dos resultados de UFC.mL<sup>-1</sup> das bactérias heterotróficas da Figura 18, foi possível observar que do início para o fim da fase com COV de 1,2 Kg de DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> (Fase I) a concentração de bactérias heterotróficas reduziu para o EF e MS, sofrendo um aumento apenas para o LD. O mesmo ocorreu com o NMP das desnitrificantes.

Comparando o fim da Fase I com o início da Fase II (COV de 1,4 Kg de DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>) o UFC apresentou uma redução apenas para o LD, quanto aos outros meios (EF e MS) a concentração se elevou. Sendo diferente dos resultados das bactérias desnitrificantes em termos de redução ou aumento da concentração de bactérias. Uma possível explicação para isso, é que as bactérias desnitrificantes autotróficas estão presentes em sistemas NDS (ZHAO et al., 2017), sendo assim, os resultados de UFC das heterotróficas não podem ser analisadas em conjunto com as desnitrificantes sem ter uma análise específica desses microrganismos.

Do início para o fim da Fase II, houve um aumento do UFC das bactérias heterotróficas para os meios EF e LD, já para o MS houve uma redução. Isso pode ser uma indicação que nessa COV, os microrganismos preferem ficar livres

que aderidos. Fu et al. (2010) descreveram que a redução da carga afluyente de DQO, enquanto mantém-se a carga de nitrogênio constante, decresce a relação C/N, conseqüentemente contribui para a diminuição da população de bactérias heterotróficas. Isto pode estar relacionado aos resultados a redução das UFC nesta fase.

Com o aumento da COV (início da Fase III), as UFC se elevaram em todos os meios. Ao analisar os resultados das nitrificantes (Tabela 11), notou-se que quando as bactérias heterotróficas sofreram aumento, as nitrificantes reduziram, ou seja, podem ter competido entre si pelo OD, onde as heterotróficas levaram vantagem na utilização do OD. De acordo com Fu et al. (2010) a competição por OD entre essas bactérias resulta na estratificação da zona aeróbia do biofilme, ou seja, nas regiões mais externas há maior crescimento de bactérias heterotróficas, enquanto as nitrificantes ficam nas regiões mais internas. Sendo essa uma provável explicação para as elevadas remoções de  $DQO_T$  e  $DQO_F$ .

O mesmo aconteceu comparando o início e o fim da Fase III, onde o UFC aumentou para o MS, e reduziu para o EF e LD, o mesmo ocorreu com o EF e MS das bactérias desnitrificantes (Figura 17). Ainda, quando houve aumento das heterotróficas e desnitrificantes no MS, houve redução das nitrificantes. Para o EF, quando as bactérias desnitrificantes e heterotróficas apresentaram redução em suas concentrações (Fase III) as nitrificantes aumentaram.

## **5.6 RESULTADOS DE PT E PS**

As concentrações médias de PT e PS para MS e LD obtidas em cada uma das fases experimentais são apresentadas na Tabela 14.

**Tabela 14 – Concentração média de proteínas e polissacarídeos durante cada fase experimental.**

Fases	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )			
	PT		PS	
	MS	LD	MS	LD
I	43,5±30,1	58,8±9,3	55,2±42,4	84,7±48,4
II	10,3±10,4	39,3±14,7	95,3±19,3	153,6±75,5
III	6,0±4,9	9,7±0,1	141,3±26,6	177,9±89,2

**Legenda: EF – efluente; MS – material suporte; LD – lodo; PT – Proteínas; PS – Polissacarídeos.**

**Fonte: Aatoria própria (2020).**

Por meio da Tabela 14, notou-se que todas as concentrações médias tanto de PT como de PS foram superiores para o LD. Além disso, pode-se observar que as concentrações de PT decresceram enquanto as de PS aumentaram com o aumento da COV.

Tudo indica, que as bactérias formadoras de EPS quando em condição de estresse ambiental, aumentam a sua produção, e talvez essa produção dependa do tipo de estresse a qual são submetidas, como nesse caso aumento de COV, elas aumentam a produção de PS e reduzem a produção de PT.

A redução nos índices de PT pode estar relacionada com o excesso de nitrogênio no sistema. Sponza (2002) estudou os EPS e as propriedades físico-químicas em sistema de lodos ativados, e relataram que o aumento do teor de proteínas no EPS estava relacionado ao déficit de nitrogênio. Isso pode explicar os motivos pelos quais houve diminuição na produção de proteínas no EPS com o aumento da COV, sendo que ao aumentar a COV a remoção de NT era reduzida.

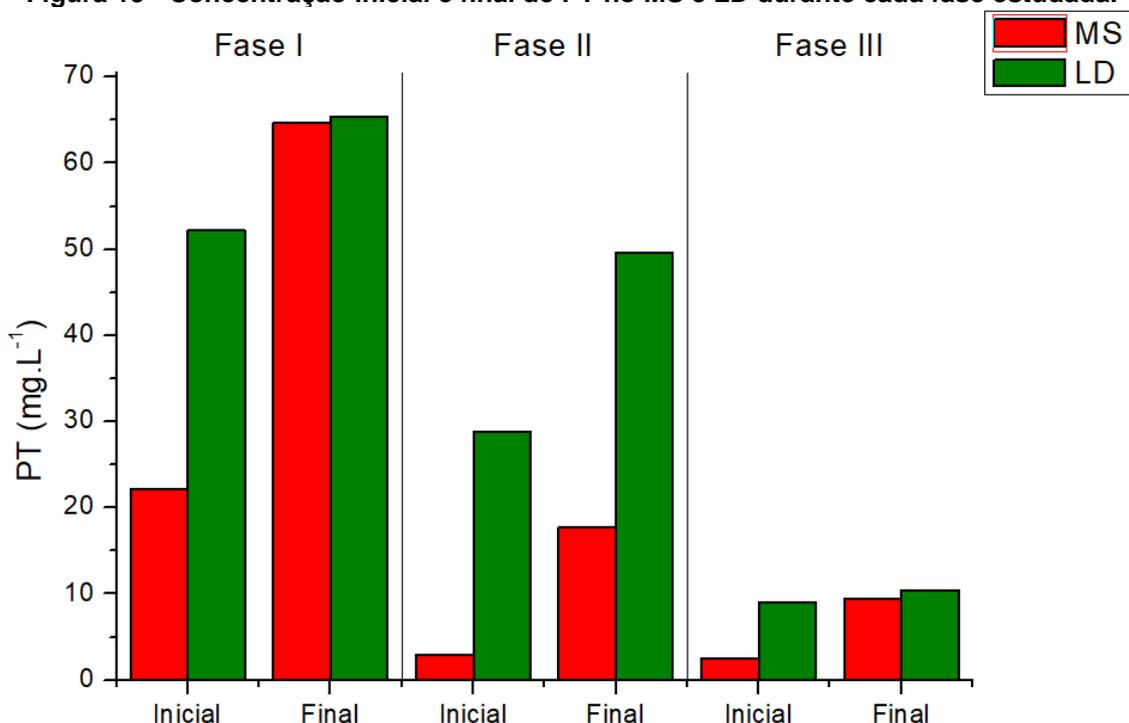
Outro fator que provavelmente está relacionado com a redução na concentração de PT, é a redução da eficiência de amonificação, como pode ser observado na Tabela 6. De acordo com (ASSUNÇÃO, 2009) os microrganismos utilizam o nitrogênio disponível para síntese de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, entre outras moléculas, assimilam principalmente as formas N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> para formar suas diversas estruturas celulares. Como o sistema apresentou redução na eficiência de amonificação o nitrogênio estava disponível apenas em sua forma orgânica, não sendo assimilado pelos microrganismos causando redução da concentração de PT.

Ainda como houve abundância de fungos e redução das bactérias consequentemente, ocorrendo provavelmente por competição entre os microrganismos (MILLE-LINDBLOM et al., 2006), o que afeta significativamente a produção das EPS estrutural produzidas por espécies específicas de bactérias (TAY et al., 2001; LIU et al., 2004 ; DING et al., 2015)

Além disso, o aumento de PS no EPS pode ser associado com o descrito no trabalho de Shin et al. (2001), no qual os autores detalham que o conteúdo de polissacarídeos no EPS aumentou com o aumento da taxa de fluxo de ar, enquanto o conteúdo de proteínas permaneceu quase inalterado, indicando que o cisalhamento pode estimular as bactérias a produzirem mais polissacarídeos. Comparando com os resultados de eficiência de remoção de SSV da Tabela 9, nota-se que com o aumento da COV a remoção de SSV reduz, indicando que os microrganismos foram arrastados do sistema.

As variações nas concentrações de PT e PS do início para o fim nas três fases podem ser observadas nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

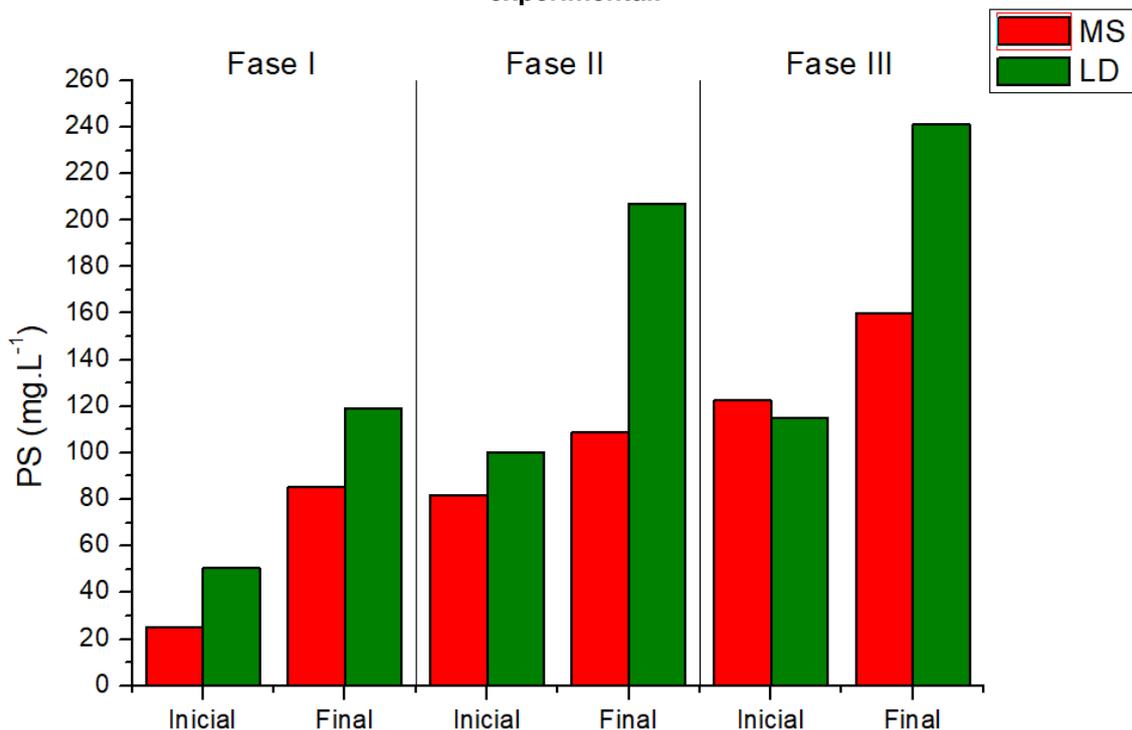
**Figura 19 - Concentração inicial e final de PT no MS e LD durante cada fase estudada.**



Nota: PT- Proteínas; MS - Material Suporte; LD - Lodo.

Fonte: Autoria própria (2020).

**Figura 20 - Concentração inicial e final de PS no MS e LD ao longo de cada fase experimental.**



Nota: PS - Polissacarídeos; MS - Material Suporte; LD - Lodo.

Fonte: Autoria própria (2020).

Nota-se na Figura 19, que a concentração inicial de PT sempre é menor que a final, tanto para o MS quanto para o LD. Entretanto, de uma fase para outra, ou seja, do final de uma fase para o início da próxima também há redução na concentração, e após isso ela se eleva novamente, porém numa proporção menor que a da fase anterior.

Analisando em conjunto as Figura 15, 16 e 19 nota-se que praticamente todos os dados de PT acompanham os dados das BOA e BON, e verifica-se que ocorre redução das concentrações de PT e do NMP de BOA e BOM no início de uma fase em relação ao final da anterior.

Na Figura 20, é possível verificar que ocorre praticamente a mesma coisa com a concentração de PS, entretanto, a diferença entre PT e PS, é que a concentração de PS aumenta quando comparada a concentração final de uma fase com a concentração final da próxima.

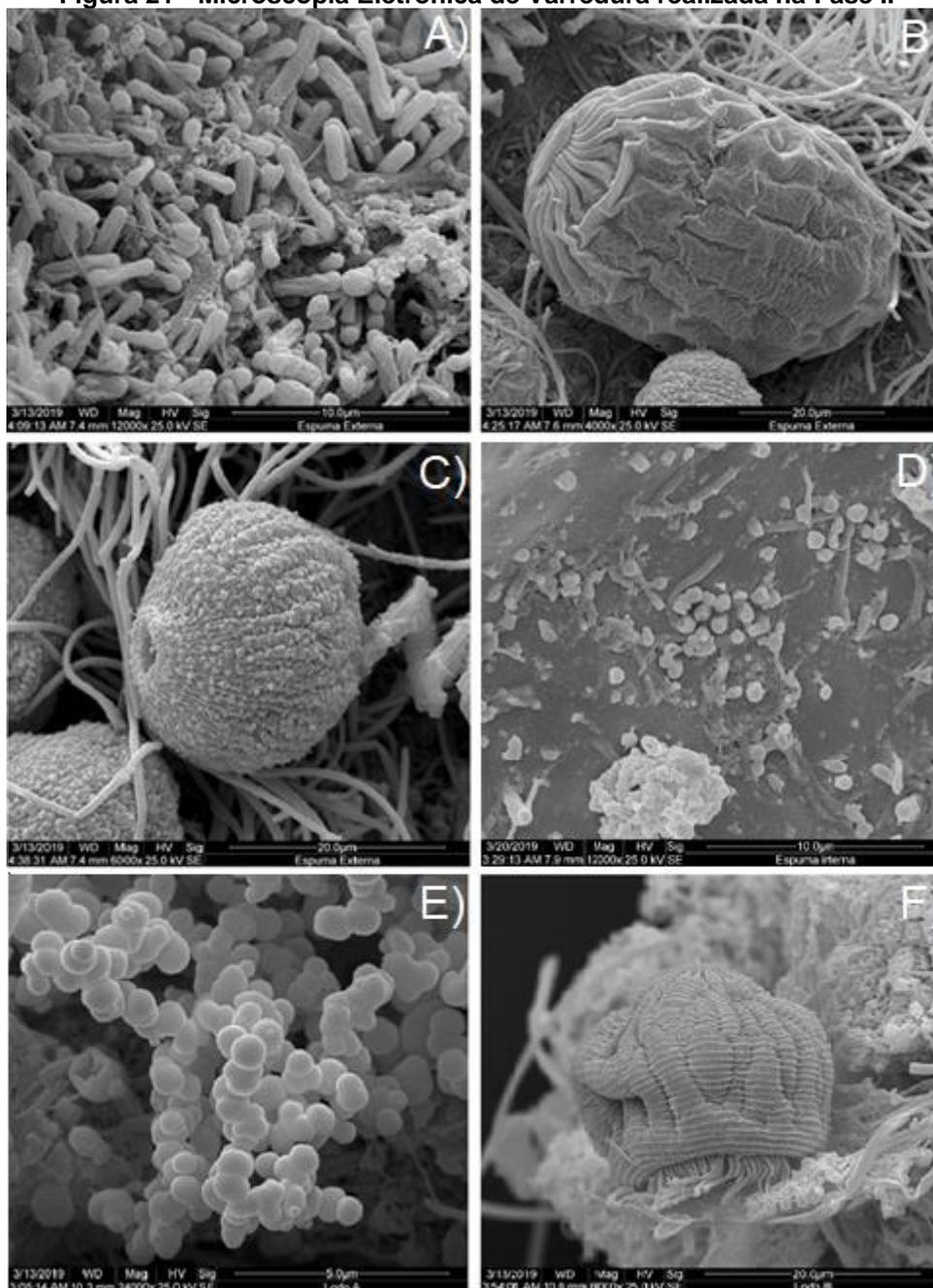
Ao analisar as Figuras 15, 16 e 20 conjuntamente, é possível verificar que na maioria quando o NMP das BOA e BON decresce a produção de PS aumenta, provavelmente essas bactérias produzem PS como mecanismo de defesa.

## **5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Na Figura 21 são apresentadas imagens obtidas na MEV na Fase I. As Figuras 21A, B e C do exterior do MS, a Figura 21D do interior do MS e as Figuras 21E e F do LD.

Uma grande quantidade de microrganismos aderidos a superfície externa ao MS podem ser observados nas Figuras 21A, B e C. Da mesma maneira, é possível observar que na superfície interna (Figura 21D) também havia muitos microrganismos, no entanto, em menor quantidade que na superfície externa.

Figura 21 - Microscopia Eletrônica de Varredura realizada na Fase I.



Legenda: (A) bactérias do tipo bacilos; (B) ciliado livre semelhante a *Euplotes sp.*; (C) ciliado semelhante a *Vorticella sp.*; (D) microrganismos no interior do MS; (E) bactérias do tipo cocos; e (F) microrganismo não identificado.

Fonte: Autoria própria (2020).

De acordo com Saar (2015) sistemas de tratamento biológico de efluentes possuem elevada abundância e riqueza de microrganismos que estão envolvidos em todas as etapas. Os principais na estabilização aeróbia, anaeróbia e/ou anóxica de efluentes são as bactérias, algas, protozoários e arqueas.

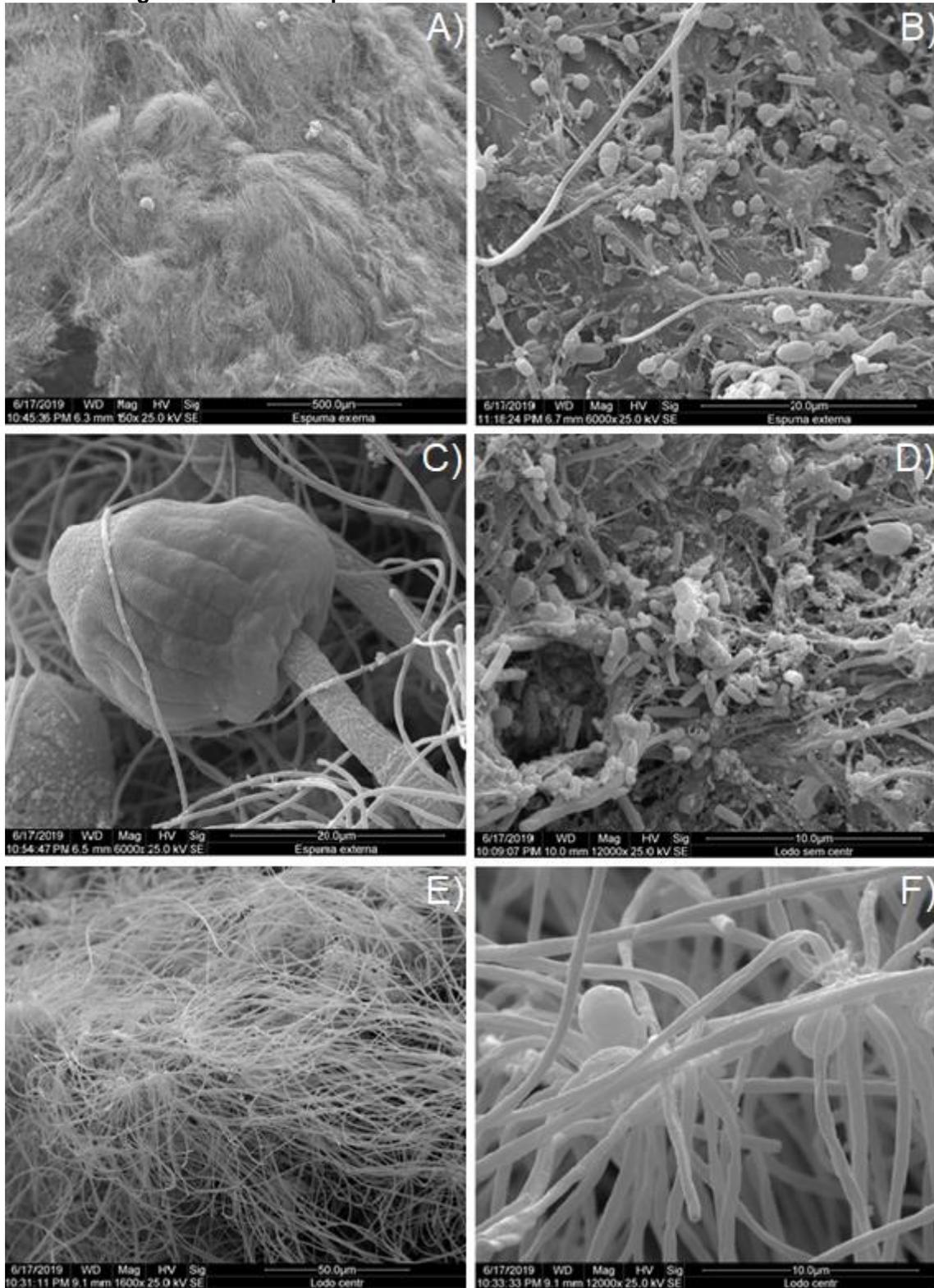
De acordo com Cybis e Pinto (1997) estudar microscopicamente os flocos e a microfauna do lodo é um indicador significativo de como estão o desempenho e a eficiência do sistema, o que permite fazer uma avaliação mais rápida das condições de depuração do processo, antes mesmo que as análises químicas convencionais. Este estudo é muito importante, principalmente em sistemas aeróbios de crescimento em suspensão, como nos lodos ativados.

Observando a Figura 21, verifica-se muitas bactérias do tipo bastonetes, ciliado semelhante ao *Euplotes sp.* e ciliado semelhante a *Vorticella sp.*, bem como de bactérias do tipo cocos. Os microrganismos ciliados citados indicam alta idade do lodo e boa estabilidade de operação. Hoffmann (2004) estudou o funcionamento de ETE de lodos ativados por meio de caracterização de microrganismos presentes nesses sistemas. O autor encontrou esses dois protozoários (*Euplotes sp.* e *Vorticella sp.*) em um sistema de baixa carga orgânica e com operação estável.

As imagens da MEV realizada na Fase II são apresentadas na Figura 22. As Figuras 22A, B e C apresentam a superfície exterior do MS e as Figuras 22D, E e F são amostras do LD.

Comparando as Figuras 21A e 22B, notou-se que houve uma redução na diversidade de espécies no sistema, ocorrendo um predomínio de fungos, estes presentes tanto no MS quanto no LD. Ainda houve a presença de protozoários semelhantes ao *Epistyllis*, que podem ser indicação de sobrecarga. Hoffmann (2004) analisou sistemas lodo ativado de tipo aeração prolongada com sobrecarga orgânica, encontrando protozoários da mesma espécie.

Figura 22 - Microscopia Eletrônica de Varredura realizada na Fase II.

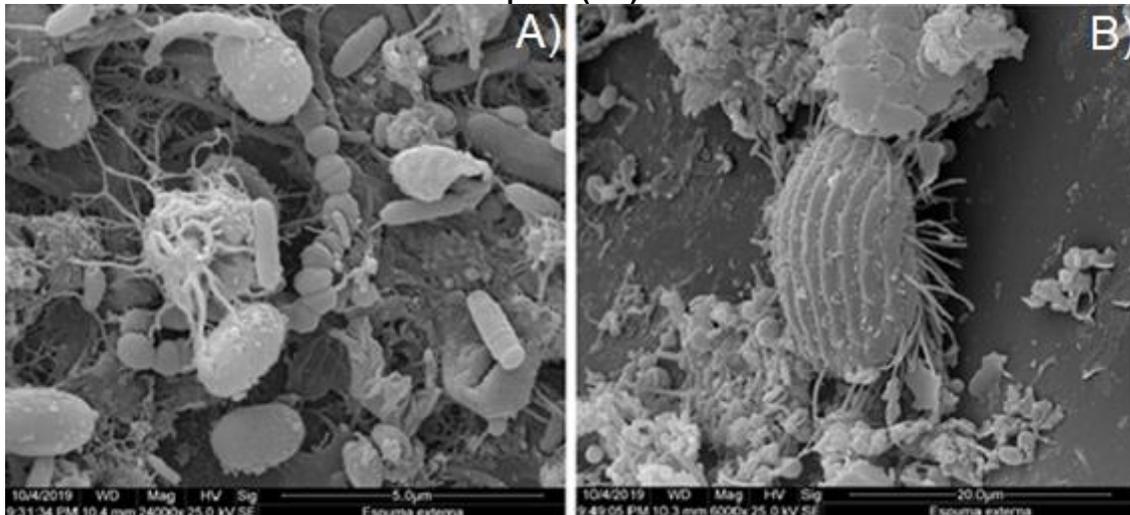


Legenda: (A) fungos aderidos ao MS; (B) microrganismos no interior do MS; (C) ciliado fixo semelhante ao *Epistyllis sp.*, (D) microrganismos com morfologia de cocos e bacilos; (E) fungos presentes no LD; e (F) Detalhe dos micélios fúngicos.

Fonte: Autoria própria (2020).

As imagens da MEV realizada na superfície exterior do MS na Fase III são apresentadas na Figura 23.

**Figura 23 - Microscopia Eletrônica de Varredura realizada na superfície externa do material suporte (MS) na Fase III.**



**Legenda: (A) microrganismos fixos ao MS; (B) ciliado livre semelhante a *Aspidisca costata*.**

**Fonte: Aatoria própria (2020).**

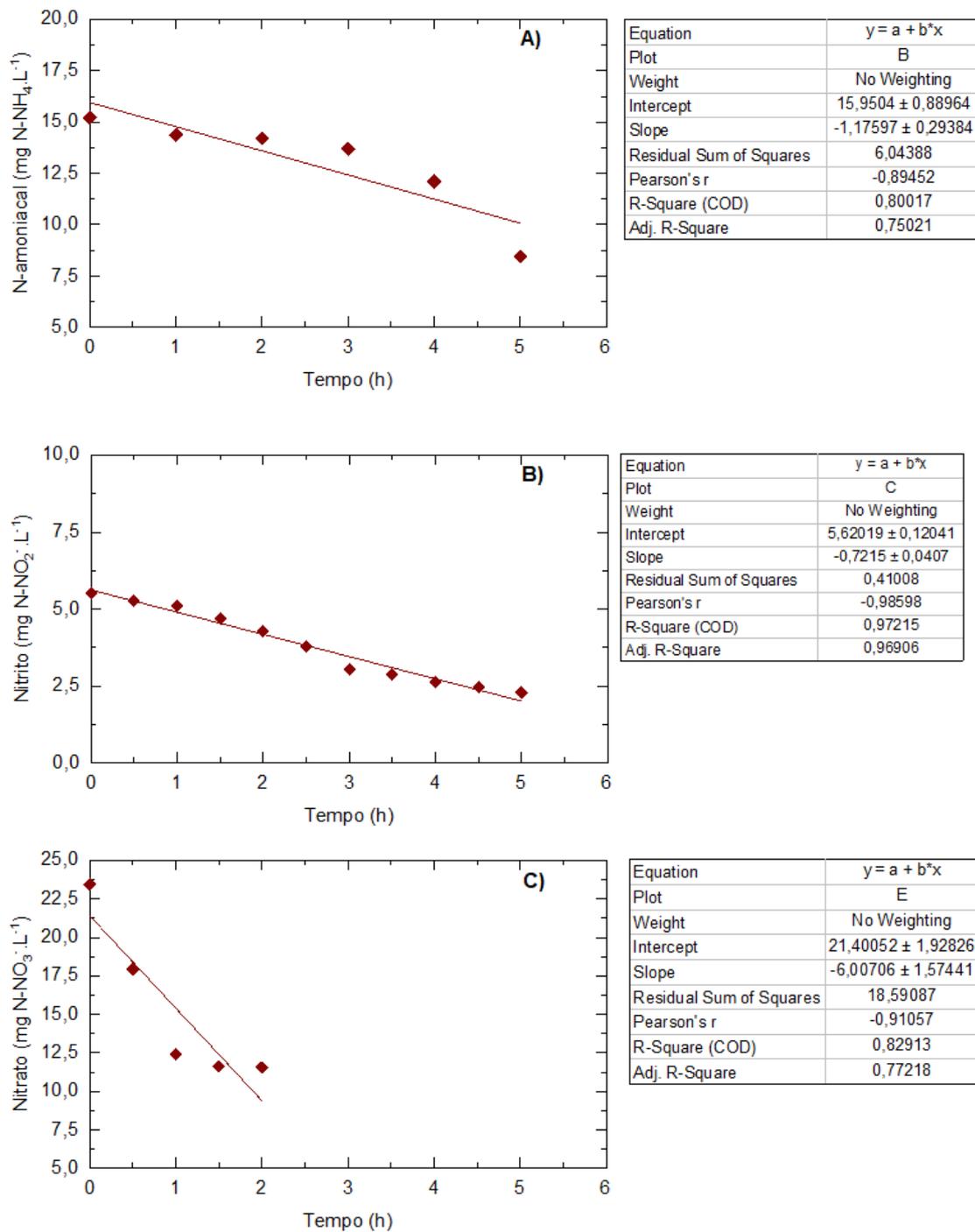
A análise em conjunto das Figuras 21A, 22B e 23A mostra que há uma mudança na riqueza e abundância entre as três fases estudadas. Ainda, verifica-se a presença do ciliado livre semelhante ao *Aspidisca costata* que indica uma boa nitrificação segundo Figueiredo e Domingues (1997), mesmo com uma baixa remoção de NKT na Fase III esta apresentou remoção de NKT, ou seja, o sistema apresentou nitrificação, reforçando portanto, o que foi descrito pelos autores e confirmando a hipótese levantada sobre a fase limitante do processo de remoção de nitrogênio ser a amonificação, para este caso.

No entanto, para Figueiredo e Domingues (1997) a baixa concentração de ciliados livres indica um efluente de má qualidade, porém estão presentes também quando há muita matéria orgânica, como as remoções de DQO foram elevadas o sistema apresentou baixa concentração destes microrganismos. No trabalho de Hoffmann (2004), também foi constatada a presença de *Aspidisca costata* para um sistema de lodos ativados de aeração prolongada com sobrecarga orgânica. Diferentemente dos resultados deste estudo, onde o sistema não possuía decantador e removeu matéria orgânica normalmente.

## 5.8 CINÉTICA DE NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO

As velocidades específicas tanto para nitrificação quanto para desnitrificação são calculadas dividindo a constante cinética de ordem zero obtida no ensaio cinético pela massa SSV presente em cada ensaio. A Figura 24 mostra as curvas ajustadas do modelo cinético de ordem zero para as reações de nitrificação e desnitrificação na Fase II.

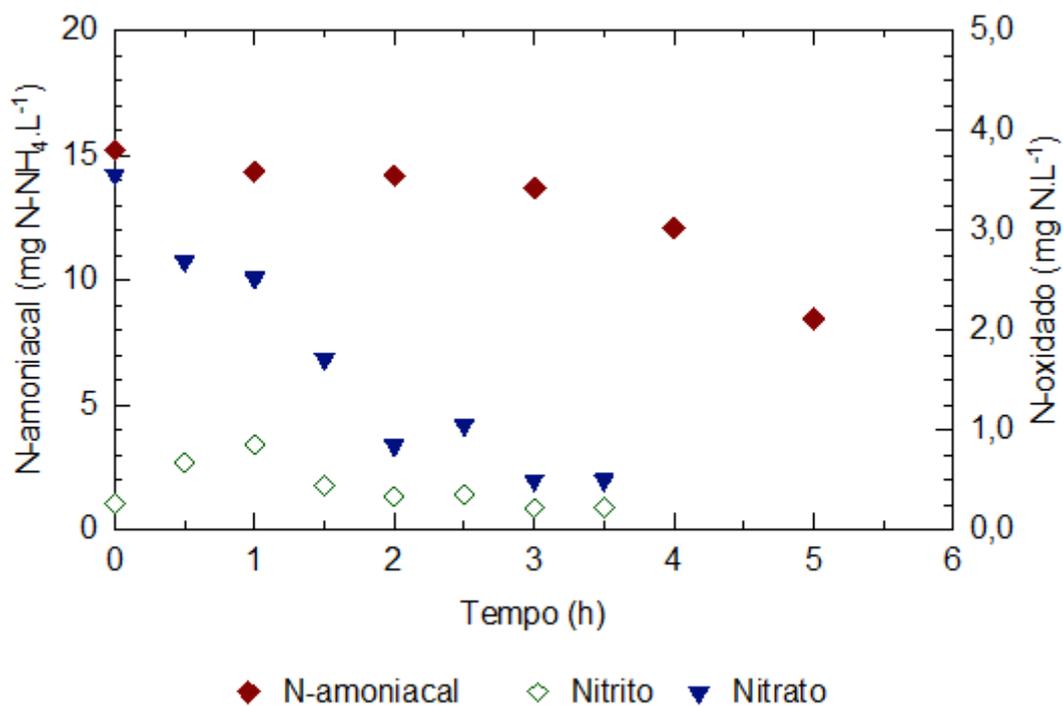
**Figura 24 - Ajuste do modelo cinético de ordem zero para a reação de nitrificação via N-amoniacoal (A), via nitrito (B) e desnitrificação via nitrato (C) na Fase II.**



Fonte: Autoria própria (2020).

A variação da concentração de N-amoniacoal, nitrito e nitrato no perfil temporal realizado durante o ensaio cinético de nitrificação via N-amoniacoal na Fase II é apresentado na Figura 25.

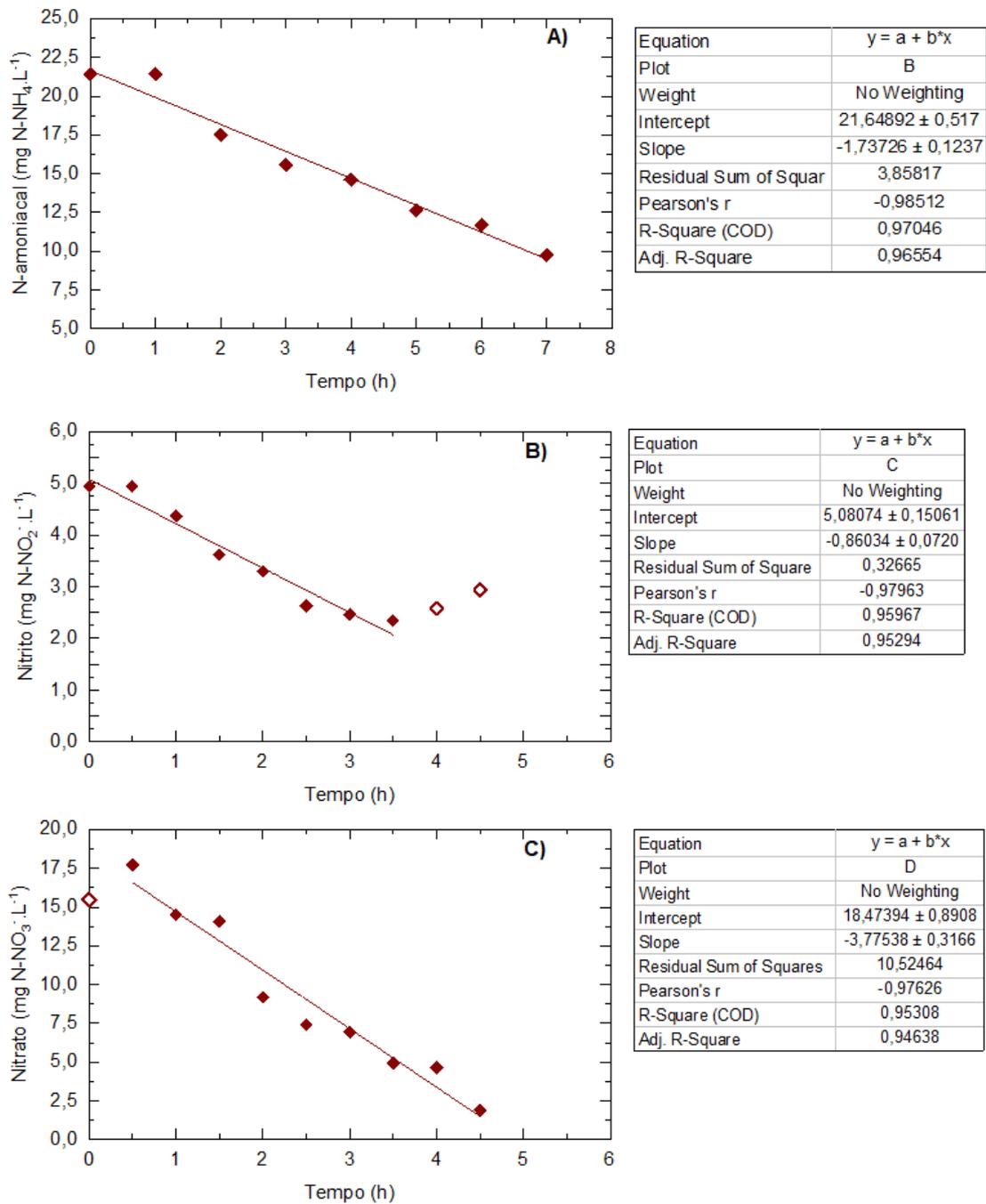
Figura 25 - Variação da concentração de N-amoniacal, nitrito e nitrato para nitrificação via N-amoniacal na Fase II.



Fonte: Autoria própria (2020).

O ajuste das curvas do modelo cinético de ordem zero para as reações de nitrificação via N-amoniacal e nitrito e desnitrificação via nitrato na Fase III podem ser observados na Figura 26.

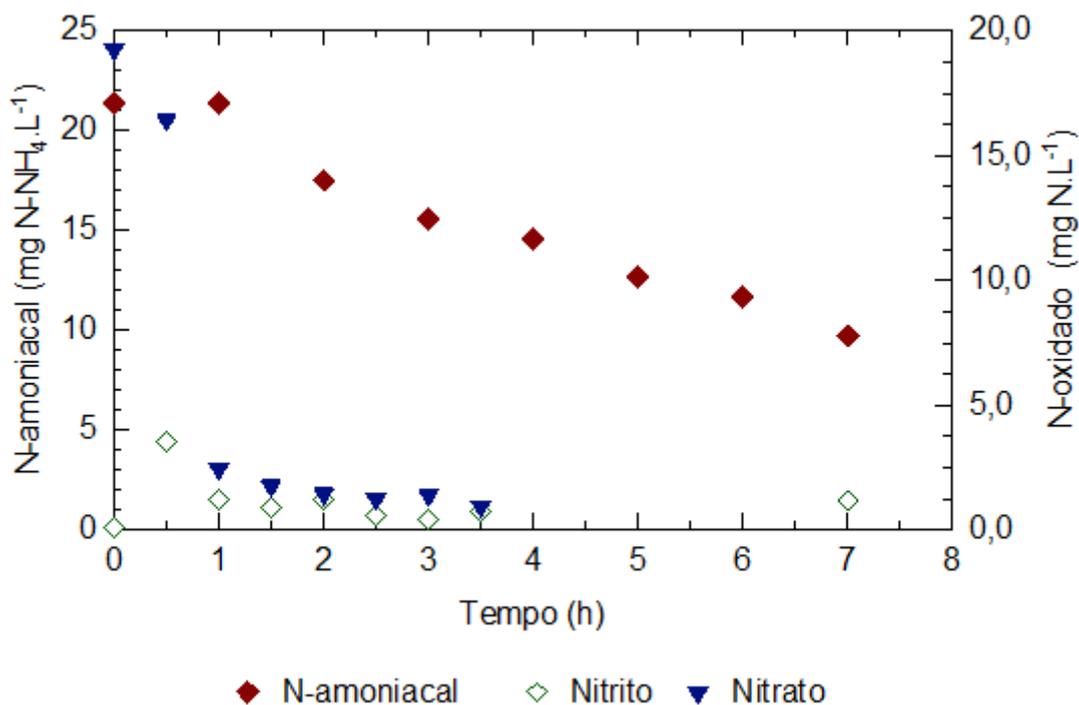
**Figura 26 - Ajuste do modelo cinético de ordem zero para a reação de nitrificação via N-amoniacoal (A), via nitrito (B) e desnitrificação via nitrato (C) na Fase III.**



**Fonte: Autoria própria (2020).**

A variação da concentração de N-amoniacoal, nitrito e nitrato no perfil temporal realizado durante o ensaio cinético de nitrificação via N-amoniacoal na Fase III é apresentado na Figura 27.

Figura 27 - Variação da concentração de N-amoniacal, nitrito e nitrato para nitrificação via N-amoniacal na Fase III.



Fonte: Autoria própria (2020).

A partir das Figuras 24, 25, 26, 27 foram elaboradas as Tabelas 15 e 16 nas quais são exibidos os resultados de velocidades de reação obtidos para cada ensaio cinético de nitrificação e desnitrificação durante as Fases II e III.

**Tabela 15 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ensaio durante a Fase II.**

Ensaio Cinético	Parâmetros cinéticos analisados		
	$k_0$ (mg N.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	$r_N$ (mg N.gSSV <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
Nitrificação via N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,35	12,38	0,11
Nitrificação via N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,64	7,79	0,08
Desnitrificação via N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5,93	7,62	0,78

**Nota:**  $k_0$  - constante cinética da ordem da reação do modelo; SSV – sólidos em suspensão voláteis; e  $r_N$  - velocidade específica de consumo de nitrogênio.

Fonte: Autoria própria (2020).

**Tabela 16 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ensaio durante a Fase III.**

Ensaio Cinético	Parâmetros cinéticos analisados		
	$k_0$ (mg N.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	$r_N$ (mg N.gSSV <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
Nitrificação via N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,67	7,84	0,21
Nitrificação via N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,74	8,16	0,09
Desnitrificação via N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3,51	4,13	0,85

**Nota:**  $k_0$  - constante cinética da ordem da reação do modelo; SSV – sólidos em suspensão voláteis; e  $r_N$  - velocidade específica de consumo de nitrogênio.

**Fonte: Autoria própria (2020).**

Com base nos resultados das Tabelas 15 e 16, nota-se que houve um leve aumento na velocidade específica de consumo de nitrogênio da Fase II para a Fase III, sendo este de 0,11 para 0,21 mg N.gSSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> na cinética de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, de 0,08 para 0,09 mg N.gSSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> na cinética de nitrificação via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e de 0,78 a 0,85 mg N.gSSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> na cinética de desnitrificação via N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

A partir das velocidade de nitrificação via N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ( $k_1$ ) e das velocidades de nitrificação via N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ( $k_2$ ) nas Fases II e III, ou seja, a velocidade de nitrificação de nitrogênio amoniacal superior à velocidade de nitrificação via nitrito, proporcionou relações  $k_2/k_1$  iguais a 0,76 e 0,43 para as Fases II e III, respectivamente. De acordo com Levenspiel (2000), quanto mais próximo de zero a relação  $k_2/k_1$ , maior será a velocidade de reação para formação de nitrito. Do exposto, pode dizer que a velocidade de nitritação foi superior a de nitratação para ambas fases.

Os resultados de ensaio cinético de nitrificação do presente estudo diferem-se dos resultados de Ferro (2018) que obteve para COV de 1,8 kg DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> uma velocidade de nitrificação via N-amoniaco igual a 4,38 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.gSSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, e de nitrificação via nitrito de 1,93 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.gSSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. No trabalho de Silva (2018) a autora realizou esse ensaio operando o sistema com COV de 3,6 kg DQO.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> e obteve velocidades específicas de 6,9 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.gSSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 8,5 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.gSSV<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para nitrificação via N-amoniaco e nitrito, respectivamente.

Nota-se ainda com as Tabelas 14 e 15 que as velocidades de desnitrificação via nitrato para as Fases II e III também foram baixas, mesmo assim não houve acúmulo de nitrato no meio. Provavelmente ao mesmo tempo que o nitrito e nitrato eram gerados eles eram consumidos.

Os resultados dos ensaios cinéticos de desnitrificação deste estudo são superiores aos de Ferro (2018) que obteve velocidades específicas de  $0,15 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para COV de  $1,8 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  e de  $0,07 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para COV de  $3,3 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ . Já Silva (2018) obteve velocidade específica superior ( $5,6 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

Moura (2011) e Santos (2014) justificam a baixa velocidade de consumo de substrato pelo fato de haver um consorcio microbiano no biofilme o qual foi utilizado no ensaio cinético, onde a biomassa do reator é composta por microrganismos nitrificantes, desnitrificantes e outros heterotróficos, estes aeróbios e anaeróbios, e pelos processos ocorrerem simultaneamente no reator, a concentração de SSV não representa especificamente a biomassa nitrificante presente no biofilme, mas sim todo o conjunto microbiano. Assim sendo, resulta em uma menor velocidade específica ao comparar com sistemas em que toda população de microrganismos realiza apenas um tipo de reação.

Ainda pode-se apontar outros fatores que podem ter influenciado as baixas velocidades cinéticas, dentre esses a configuração do sistema de tratamento utilizado e principalmente as características da própria água residuária a ser tratada.

## 6 CONCLUSÕES

O reator de leito estruturado utilizado para o tratamento de águas residuárias de laticínios apresentou desempenho satisfatório quanto a remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio, com o melhor desempenho sendo atingido na Fase I, com eficiência de remoção de  $DQO_T$  de 92% e de NT de 74%.

Nas três fases operacionais o sistema apresentou elevada remoção de matéria orgânica, com eficiências médias superiores a 90% e 91% para  $DQO_T$  e  $DQO_F$ , respectivamente, indicando que o reator respondeu bem à variação da COV de 1,2 para 1,8  $kgDQO.m^3.dia^{-1}$ .

Mesmo a eficiência de remoção de NTK ficando na faixa de 54 a 81%, o NT não foi removido de maneira efetiva devido à interferência do aumento da COV na atividade das bactérias amonificantes, principalmente na Fase III (COV de 1,8  $kg DQO.m^3.dia^{-1}$ ).

Por meio das análises microbiológicas constatou-se que houve de fato interferência das COV mais elevadas na concentração das bactérias nitrificantes. Ainda, pode-se confirmar com a microscopia eletrônica de varredura que houve redução na abundância de microrganismos conforme a COV era aumentada, havendo predominância de fungos.

A partir dos ensaios cinéticos foram obtidas as velocidades específicas ajustadas de acordo com o modelo cinético de ordem zero de nitrificação via  $N-NH_4^+$  (0,11 a 0,21  $mg N-NH_4^+.gSSV^{-1}.h^{-1}$ ), de nitrificação via  $N-NO_2^-$  (0,08 a 0,09  $mg N-NO_2^-.gSSV^{-1}.h^{-1}$ ) e de desnitrificação via  $N-NO_3^-$  (0,78 a 0,85  $mg N-NO_3^-.gSSV^{-1}.h^{-1}$ ) para as Fases II e III, respectivamente. Como a biomassa utilizada para os ensaios eram mistas, as velocidades de nitrificação e desnitrificação são inferiores aos estudos que utilizam sistemas com população microbiana realizando a mesma reação.

Com base nos resultados, pode-se concluir que o reator de leito estruturado operado sob aeração intermitente com recirculação de efluente foi eficaz na remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio de águas residuárias de laticínios para COV até 1,4  $kg DQO.m^3.dia^{-1}$ .

## REFERÊNCIAS

AHMAD, T.; AADIL, R. M.; AHMED, H.; UR RAHMAN, U.; SOARES, B. C. V.; SOUZA, S. L. Q.; PIMENTEL, T. C.; SCUDINO, H.; GUIMARÃES, J. T.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. P.; ALMADA, R. B.; VENDRAMEL, S. M. R.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2019.

ANGNES, G.; NICOLOSO, R. S.; DA SILVA, M. L. B.; DE OLIVEIRA, P. A. V.; HIGARASHI, M. M.; MEZZARI, M. P.; MILLER, P. R. M. Correlating denitrifying catabolic genes with N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions from swine slurry composting. **Bioresource technology**, v. 140, p. 368-375, 2013.

ANTHONISEN, A.C.; LOEHR, R. C.; PRAKASAM, T. B. S.; SRINATH, E. G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal Water Pollut Control Federation**, v.48, n. 5, p.835-852, 1976.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater**. 22 ed. Washington, DC: APHA, 2012.

ASSUNÇÃO, F. A. L. **Estudo da remoção de nitrogênio, com ênfase na volatilização de amônia, em lagoas de polimento de efluentes de reatores UASB tratando esgotos urbanos de Belo Horizonte/MG**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

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, n. 3, p. 453-459, 2013.

BEG, S. A.; HASSAN, M. M.; CHAUDHRY, M. A. Effect of sinusoidal perturbations of feed concentration on multi-substrate carbon oxidation and nitrification process in an upflow packed-bed biofilm reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 65, n. 3, p. 165-174, 1997.

BEGNINI, B. C.; RIBEIRO, H. B. Plano para redução de carga poluidora em indústria de laticínios. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 3, n. 1, p. 19-30, 2014.

BELTRAN, C. A. E. Aplicación de un sistema de control supervisor de pH y OD en la operación continua de un reactor nitrificante de disco rotatorio. **Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile**. (2008).

BERNAT, K.; KULIKOWSKA, D.; ZIELIŃSKA, M.; CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; WOJNOWSKA-BARYŁA, I. Nitrogen removal from wastewater with a low COD/N ratio at a low oxygen concentration. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4913-4916, 2011.

BITTON, G. **Wastewater microbiology**. John Wiley & Sons, 2005.

BOLEY, A.; MÜLLER, W.-R. Denitrification with polycaprolactone as solid substrate in a laboratory-scale recirculated aquaculture system. **Water Science and Technology**, v. 52, n. 10-11, p. 495-502, 2005.

BRADFORD, Marion 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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005.

Brasil. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 9 p.

BUENO, R. F.; PIVELI, R. P.; CAMPOS, F.; SOBRINHO, P. A. Simultaneous nitrification and denitrification in the activated sludge systems of continuous flow. **Environmental technology**, v. 39, n. 20, p. 2641-2652, 2018.

CÁCERES, R.; FLOTATS, X.; MARFÀ, O. Changes in the chemical and physicochemical properties of the solid fraction of cattle slurry during composting using different aeration strategies. **Waste Management**, v. 26, n. 10, p. 1081-1091, 2006.

CÁCERES, R.; MAGRÍ, A.; MARFÀ, O. Nitrification of leachates from manure composting under field conditions and their use in horticulture. **Waste management**, v. 44, p. 72-81, 2015.

CAMMAROTA, M. C. **Produção de exopolissacarídeos e adesão microbiana**. 1998. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Instituto de Química/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

CASTILLO, A.; VALL, P.; GARRIDO-BASERBA, M.; COMAS, J.; POCH, M. Selection of industrial (food, drink and milk sector) wastewater treatment technologies: A multi-criteria assessment. **Journal of cleaner production**, v. 143, p. 180-190, 2017.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - ESALQ/USP - CEPEA. **Boletim do Leite**. Piracicaba. Ano 24 nº 272, 2018.

CHANG, M.; WANG, Y.; PAN, Y.; ZHANG, K.; LYU, L.; WANG, M.; ZHU, T. Nitrogen removal from wastewater via simultaneous nitrification and denitrification using a biological folded non-aerated filter. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121696, 2019.

CHIU, Y. C.; LEE, L. L.; CHANG, C. N.; CHAO, A. C. Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 59, n. 1, p. 1-7, 2007.

CIRJA, M.; IVASHECHKIN, P.; SCHÄFFER, A.; CORVINI, P. F. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7, n. 1, p. 61-78, 2008.

CORREA, C. Z.; PRATES, K. V. M. C.; DE OLIVEIRA, E. F.; LOPES, D. D.; BARANA, A. C. Nitrification/denitrification of real municipal wastewater in an intermittently aerated structured bed reactor. **Journal of Water Process Engineering**, v. 23, p. 134-141, 2018.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CYBIS, L. F.; PINTO, C. R. R. **Protozoários e metazoários presentes em reatores sequenciais em batelada (RSB) observados no processo de nitrificação**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19, 1997. Foz do Iguaçu, Anais. Foz do Iguaçu, ABES. p. 793-802. 1997.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; WOJNOWSKA-BARYŁA, I. Nitrogen-converting communities in aerobic granules at different hydraulic retention times (HRTs) and operational modes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 75-83, 2015.

DAIMS, H.; LEBEDEVA, E. V.; PJEVAC, P.; HAN, P.; HERBOLD, C.; ALBERTSEN, M.; JEHLICH, N.; PALATINSZKY, M.; VIERHEILIG, J.; BULAEV, A.; KIRKEGAARD, R. H.; VON BERGEN, M.; RATTEI, T.; BENDINGER, B.;

NIELSEN, P. H.; WAGNER, M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504, 2015.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, George A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DE GUARDIA, A.; MALLARD, P.; TEGLIA, C.; MARIN, A.; LE PAPE, C.; LAUNAY, M.; BENOIST, J. C.; PETIOT, C. Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: Part 2, nitrogen dynamic. **Waste Management**, v. 30, n. 3, p. 415-425, 2010.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O. Acidogenesis in anaerobic treatment of dairy wastewater. In: **Proceedings of Asian Waterqual2003-IWA Asia-Pacific regional conference**. 2003. p. 6.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T. T. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2583-2595, 2005.

DENG, L.; GUO, W.; NGO, H. H.; ZHANG, X.; WANG, X. C.; ZHANG, Q.; CHEN, R. New functional biocarriers for enhancing the performance of a hybrid moving bed biofilm reactor–membrane bioreactor system. **Bioresource technology**, v. 208, p. 87-93, 2016.

DING, X.; XUE, Y.; ZHAO, Y.; XIAO, W.; LIU, Y.; LIU, J. Effects of different covering systems and carbon nitrogen ratios on nitrogen removal in surface flow constructed wetlands. **Journal of cleaner production**, v. 172, p. 541-551, 2018.

DING, Z.; BOURVEN, I.; GUIBAUD, G.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; PANICO, A.; PIROZZI, F.; ESPOSITO, G. Role of extracellular polymeric substances (EPS) production in bioaggregation: application to wastewater treatment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9883-9905, 2015.

DO CANTO, C. S. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Feasibility of nitrification/denitrification in a sequencing batch biofilm reactor with liquid circulation applied to post-treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 644-654, 2008.

DOS SANTOS, S. G.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Comparative research on the use of methanol, ethanol and methane as electron donors for denitrification. **Environmental Engineering Science**, v. 21, n. 3, p. 313-320, 2004.

DROGUI, P.; ASSELIN, M.; BRAR, S. K.; BENMOUSSA, H.; BLAIS, J. F. Electrochemical removal of pollutants from agro-industry wastewaters. **Separation and Purification Technology**, v. 61, n. 3, p. 301-310, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and substance. **Anal chem**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EPA, U. S. **Manual nitrogen control**. EPA/625/R-93/010, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1993.

ERKAN, H. S.; GUNALP, G.; ENGIN, G. O. Application of submerged membrane bioreactor technology for the treatment of high strength dairy wastewater. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 91-100, 2018.

FARIZOGLU, B.; UZUNER, S. The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 57, p. 46-54, 2011.

FIGUEIREDO, M. G.; DOMINGUES, V. B. **Microbiologia de Lodos Ativados**. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. São Paulo: CETESB, 48 p. 1997.

FENG, L.; JIA, R.; ZENG, Z.; YANG, G.; XU, X. Simultaneous nitrification–denitrification and microbial community profile in an oxygen-limiting intermittent aeration SBBR with biodegradable carriers. **Biodegradation**, v. 29, n. 5, p. 473-486, 2018.

FERRO, T. N. **Remoção de matéria carbonácea, nitrogenada e fosfatada em um sistema anaeróbio-aeróbio-anóxico (aoa) submetido a variações de cargas orgânicas e hidráulicas**. 2018. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623, 2010.

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 Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1981–1990, 2010.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008.

GE, S.; WANG, S.; YANG, X.; QIU, S.; LI, B.; PENG, Y. Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: a review. **Chemosphere**, v. 140, p. 85-98, 2015.

GHAFFARI, S.; HASAN, M.; AROUA, M. K. Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater—a review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3965-3974, 2008.

GOUGH, R. H.; SAMKUTTY, P. J.; MCGREW, P.; ARAUZ, J.; ADKINSON, R. W. Prediction of effluent biochemical oxygen demand in a dairy plant SBR

wastewater system. **Journal of Environmental Science & Health Part A**, v. 35, n. 2, p. 169-175, 2000.

GUTIERREZ-WING, M. T.; MALONE, R. F.; RUSCH, K. A. Evaluation of polyhydroxybutyrate as a carbon source for recirculating aquaculture water denitrification. **Aquacultural engineering**, v. 51, p. 36-43, 2012.

HAMERSKI, F. **Partida de um reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) no tratamento de efluentes provenientes de uma indústria de laticínios**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

HOFFMANN, H. Caracterização do funcionamento de ETE do tipo lodo ativado via imagem microscópica—estudo na Região da Grande Florianópolis. **XI SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL—SILUBESA**. Anais, ABES, Natal, RN, 2004.

HUI, C.; WEI, R.; JIANG, H.; ZHAO, Y.; XU, L. Characterization of the ammonification, the relevant protease production and activity in a high-efficiency ammonifier *Bacillus amyloliquefaciens* DT. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 142, p. 11-17, 2019.

HU, J.; LI, D.; LIU, Q.; TAO, Y.; HE, X.; WANG, X.; LI, X.; GAO, P. Effect of Organic Carbon on Nitrification Efficiency and Community Composition of Nitrifying Biofilms. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, pp. 387 – 394, 2009.

HURLOW, J.; COUCH, K.; LAFORET, K.; BOLTON, L.; BOWLER, D. M. P. Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care. **Advances in wound care**, v. 4, n. 5, p. 295-301, 2015.

HWANG, C.; WU, W. M.; GENTRY, T. J.; CARLEY, J.; CARROLL, S. L.; SCHADT, C.; WATSON, D.; JARDINE, P. M.; ZHOU, J.; HICKEY, R. F.;

CRIDDLE, C. S.; FIELDS, M. W. Changes in bacterial community structure correlate with initial operating conditions of a field-scale denitrifying fluidized bed reactor. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 71, n. 5, p. 748-760, 2006.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal** 2017. 2018. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2017\\_v45\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf)>. Acessado em 18 de set. De 2019.

JAGANMAI, G.; JINKA, R. Production of lipases from dairy industry wastes and its applications. **International Journal of Current Microbiological and Applied Sciences**, pp. 67-73, 2017.

JOO, H.; HIRAI, M.; SHODA, M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Water Research**, v.40, n.16, p.3029-3036, 2006.

JÚNIOR, A. D. N. F.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, p. 94-105, 2015.

KAYA, Y.; ERSAN, G.; VERGILI, I.; GÖNDER, Z. B.; YILMAZ, G.; DIZGE, N.; AYDINER, C. The treatment of pharmaceutical wastewater using in a submerged membrane bioreactor under different sludge retention times. **Journal of membrane science**, v. 442, p. 72-82, 2013.

KHANITCHAIDECHA, W.; SUMINO, T.; KAZAMA, F. Influence of carbon source on biological nitrogen removal by immobilised bacteria. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 2, n. 06, p. 527, 2010.

KHOJARE, A. S.; PATIL, M. R.; SARODE, A. R.; WASNIK, P. G. Membrane process: An emerging solution for effluent treatment in dairy and food plant.

In: **Proceedings of UGC Sponsored National Conference on 'Hydro-chemical, Bio-chemical Studies and Environmental Pollution'** Aurangabad. 2002.

KIM, D. J.; LEE, D. I.; KELLER, J. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. **Bioresource technology**, v. 97, n. 3, p. 459-468, 2006.

KNOWLES, R. Denitrification. **Microbiological reviews**, v. 46, n. 1, p. 43, 1982.

KOCA, N (Ed.). **Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing**. BoD–Books on Demand, 2018.

KOLARSKI, R.; NYHUIS, G. The use of sequencing batch reactor technology for the treatment of high-strength dairy processing waste. In: **Proceedings of the 50th Industrial Waste Conference May 8, 9, 10, 1995**. CRC Press, 1997. p. 485.

KOLHE, A. S.; INGALE, S. R.; BHOLE, R. V. Effluent of dairy technology. **Shodh, Samiksha aur Mulyankan Int Res J**, v. 2, n. 5, p. 459-461, 2009.

KOLHE, A. S.; PAWAR, V. P. Physico-chemical analysis of effluents from dairy industry. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 5, 2011.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V. C.; MALL, I. D. An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 51, n. 5, p. 442-452, 2011.

LENG, L.; YUAN, X.; SHAO, J.; HUANG, H.; WANG, H.; LI, H.; CHEN, X.; ZENG, G. Study on demetalization of sewage sludge by sequential extraction before liquefaction for the production of cleaner bio-oil and bio-char. **Bioresource technology**, v. 200, p. 320-327, 2016.

LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. 3.ed. New York, John Wiley & Sons Inc, 2000.

LI, X. Y.; YANG, S. F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. **Water research**, v. 41, n. 5, p. 1022-1030, 2007.

LIN, J.; ZHANG, P.; LI, G.; YIN, J.; LI, J.; ZHAO, X. Effect of COD/N ratio on nitrogen removal in a membrane-aerated biofilm reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 74-79, 2016.

LIU, L.; ZHAO, X.; ZHAO, N.; SHEN, Z.; WANG, M.; GUO, Y.; XU, Y. Effect of aeration modes and influent COD/N ratios on the nitrogen removal performance of vertical flow constructed wetland. **Ecological engineering**, v. 57, p. 10-16, 2013.

LIU, Y. Q.; LIU, Y.; TAY, J. H. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 2, p. 143-148, 2004.

LIU, Y.; SHI, H.; XIA, L.; SHI, H.; SHEN, T.; WANG, Z.; WANG, G.; WANG, Y. Study of operational conditions of simultaneous nitrification and denitrification in a Carrousel oxidation ditch for domestic wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 901–6, fev. 2010.

MALINA JUNIOR, J. F.; POHLAND, F. G. **Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes**. Technomic Publishing, 1992.

MARTÍNEZ-SULLER, L.; PROVOLO, G.; CARTON, O. T.; BRENNAN, D.; KIRWAN, L.; RICHARDS, K. G. The composition of dirty water on dairy farms in Ireland. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, p. 67-80, 2010.

MENDONÇA, L. C. **Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido**. 2002. 219 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. S. Biofilmes: Conhecer a Entidade. **Journal of Aging and Innovation**, v. 1, n. 3, 2012.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. McGraw Hill Brasil, 2015.

MEZZOMO, L. F. **Reatores de biofilme em bateladas sequenciais visando a nitrificação e desnitrificação simultâneas de esgoto sintético sob baixa relação carbono/ nitrogênio**. 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Centro de Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

MILLE-LINDBLOM, C.; FISCHER, H.; TRANVIK, L. J. Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. **Oikos**, v. 113, n. 2, p. 233-242, 2006.

MOURA, R. B. **Desempenho de um reator vertical de fluxo contínuo e leito estruturado com recirculação do efluente, submetido à aeração intermitente, na remoção de carbono e nitrogênio de um efluente sintético**. 2011. 112 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. **Journal of environmental management**, v. 98, p. 163-167, 2012.

MOURA, R. B.; SANTOS, C. E.; OKADA, D. Y.; MARTINS, T. H.; JUNIOR, A. D. N. F.; DAMIANOVIC, M. H.; FORESTI, E. Carbon-nitrogen removal in a structured-bed reactor (SBRRIA) treating sewage: Operating conditions and metabolic perspectives. **Journal of environmental management**, v. 224, p. 19-28, 2018.

MUNAVALLI, G. R.; SALER, P. S. Treatment of dairy wastewater by water hyacinth. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 4, p. 713-722, 2009.

MUTAMIM, N. S. A.; NOOR, Z. Z. Assessment of Membrane Bioreactor in Treating Spent Sulfidic Caustic Wastewater: Effects of Organic Biomass Concentration and Solid Retention Time. **Chemical Engineering Research Bulletin**, p. 102-110, 2017.

ØDEGAARD, H.; RUSTEN, B.; WESSMAN, F. State of the art in Europe of the moving bed biofilm reactor (MBBR) process. In: **Proceedings of the 77th Annual Water Environment Federation Technical Exposition and Conference, New Orleans, Louisiana, Oct.** 2004. p. 2-6.

OLIVEIRA, A. C. D. G. **Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel.** 2012. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) – Centro de Tecnologia e Urbanismo, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2012.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 677-701, 2003.

PELAZ, L.; GÓMEZ, A.; LETONA, A.; GARRALÓN, G.; FDZ-POLANCO, M. Nitrogen removal in domestic wastewater. Effect of nitrate recycling and COD/N ratio. **Chemosphere**, v. 212, p. 8-14, 2018.

POCHANA, K.; KELLER, J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (snd). **Water Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 61-68, 1999.

QASIM, S.R. **Wastewater treatment plants: planning, design, and operation**. New York: CBS College, 1985.

RITTMAN, B. E.; MCCARTY, P. L. Environmental biotechnology: principles and applications. McCraw-Hill. **Inc., USA**, p. 6-11, 2001.

SAAR, J. H. **Microbiologia dos lodos ativados: Teoria e aplicações práticas para quem trabalha com processos de tratamento biológico de efluentes industriais e urbanos**. 1ª edição. Porto Alegre: Gênese, 2015. 196 p.

SÁEZ, J. A.; CLEMENTE, R.; BUSTAMANTE, M. Á.; YAÑEZ, D.; BERNAL, M. P. Evaluation of the slurry management strategy and the integration of the composting technology in a pig farm—Agronomical and environmental implications. **Journal of environmental management**, v. 192, p. 57-67, 2017.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. 2ed., Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

SANTOS, C. E. D. **Influência da relação carbono/nitrogênio e da fonte de carbono no processo de nitrificação desnitrificação simultânea em reator de leito estruturado**. 2014. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SANTOS, C. E.; MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H.; FORESTI, E. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). **Journal of environmental management**, v. 166, p. 519-524, 2016.

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

SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; BOCK, E.; FUERST, J.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 481-492, 2003.

SEDLAK, R. I. **Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice**. CRC press, 1991.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; CUI, H. Model-evaluation of the erosion behavior of activated sludge under shear conditions using a chemical-equilibrium-based model. **Chemical Engineering Journal**, v. 140, n. 1-3, p. 241-246, 2008.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 882-894, 2010.

SHIN, H. S.; KANG, S. T.; NAM, S. Y. Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 193-196, 2001.

SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia: manual de aulas práticas**. Ed. da UFSC, 2004.

SILVA, N. T. M. **Remoção de carbono e nitrogênio de efluente de matadouro em reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo**. 2018. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, 2018.

SPEECE, R. E. **Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters**. Archae Press, Tennessee, Nashville (1996).

SPONZA, D. T. Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady and unsteady-state activated sludge systems. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 983-998, 2002.

STRYDOM, J. P.; MOSTERT, J. F.; BRITZ, T. J. Anaerobic treatment of a synthetic dairy effluent using a hybrid digester. **Water SA**, v. 21, n. 2, p. 125-130, 1995.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.

SUNG, S.; DAGUE, R. R. Laboratory studies on the anaerobic sequencing batch reactor. **Water Environment Research**, v. 67, n. 3, p. 294-301, 1995.

SUN, H.; ZHAO, H.; BAI, B.; CHEN, Y.; YANG, Q.; PENG, Y. Advanced removal of organic and nitrogen from ammonium-rich landfill leachate using an anaerobic-aerobic system. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 6, p. 1047-1051, 2015.

SUN, Z.; LV, Y.; LIU, Y.; REN, R. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1. **Bioresource technology**, v. 220, p. 142-150, 2016.

TAWFIK, A.; SOBHEY, M.; BADAWEY, M. Treatment of a combined dairy and domestic wastewater in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor followed by activated sludge (AS system). **Desalination**, v. 227, n. 1-3, p. 167-177, 2008.

TAY, J. H.; LIU, Q. S.; LIU, Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 222-226, 2001.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento microbiano. **Microbiologia**. 10a ed. Porto Alegre: Artmed, p. 156-83, 2012

TRAN, N. H.; URASE, T.; NGO, H. H.; HU, J.; ONG, S. L. Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. **Bioresource technology**, v. 146, p. 721-731, 2013.

TREMBLAY, Y. D.; HATHROUBI, S.; JACQUES, M. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 2, p. 110-116, 2014.

VAN HAANDEL, A.; KATO, M.; von SPERLING, M. (2009). Remoção biológica de nitrogênio: aplicações para o sistema de lodo ativado. **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. Rio de Janeiro: PROSAB, 174-226.

VAN HAANDEL, A.; VON DER LUBBE, J. Handbook of biological wastewater treatment: design and optimization of activate sludge systems. London: IWA Publishing. 2007.

VAN KESSEL, M. A.; SPETH, D. R.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P. H.; DEN CAMP, H. J. M. O.; KARTAL, B.; JETTEN, M. S. M.; LÜCKER, S. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555, 2015.

VAN RIJN, J.; TAL, Y.; SCHREIER, H. J. Denitrification in recirculating systems: theory and applications. **Aquacultural engineering**, v. 34, n. 3, p. 364-376, 2006.

VASUDEVAN, R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. **J Microbiol Exp**, v. 1, n. 3, p. 00014, 2014.

VLAEMINCK, S. E.; TERADA, A.; SMETS, B. F.; DE CLIPPELEIR, H.; SCHAUBROECK, T.; BOLCA, S.; DEMEESTERE, L.; MAST, J.; BOON, N.; CARBALLA, M.; VERSTRAETE, W. Aggregate size and architecture determine microbial activity balance for one-stage partial nitritation and anammox. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 3, p. 900-909, 2010.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Editora UFMG, 2<sup>a</sup> ed. v. 1, 1996.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Nanofiltration and reverse osmosis of model process waters from the dairy industry to produce water for reuse. **Desalination**, v. 172, n. 3, p. 245-256, 2005.

VYMAZAL, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. **Science of the total environment**, v. 380, n. 1-3, p. 48-65, 2007.

WANG, X.; TIAN, Y.; LIU, H.; ZHAO, X.; WU, Q. Effects of influent COD/TN ratio on nitrogen removal in integrated constructed wetland–microbial fuel cell systems. **Bioresource technology**, v. 271, p. 492-495, 2019.

WOLFF, D. B.; PAUL, E.; COSTA, R. H. R. D. Influência do tipo de material suporte no desempenho de reatores biológicos de leito móvel na remoção de carbono e nitrificação de esgoto sanitário. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 2, p. 149-154, 2010.

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.

YAN, L.; LIU, S.; LIU, Q.; ZHANG, M.; LIU, Y.; WEN, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, Y.; YANG, Q. Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen-limited SBR by alternating the DO. **Bioresource technology**, v. 275, p. 153-162, 2019.

YONAR, T.; SIVRIOĞLU, Ö.; ÖZENGİN, N. Physico-Chemical Treatment of Dairy Industry Wastewaters: A Review. **Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing**, p. 179, 2018.

YOO, H.; AHN, K. H.; LEE, H. J.; LEE, K. H.; KWAK, Y. J.; SONG, K. G. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (sнд) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. **Water Research**, v. 33, n. 1, p. 145-154, 1999.

ZENG, Y.; DE GUARDIA, A.; ZIEBAL, C.; DE MACEDO, F. J.; DABERT, P. Nitrification and microbiological evolution during aerobic treatment of municipal solid wastes. **Bioresource technology**, v. 110, p. 144-152, 2012.

ZENG, J.; GAO, J. M.; CHEN, Y. P.; YAN, P.; DONG, Y.; SHEN, Y.; GUO, J. S.; ZENG, N.; ZHANG, P. Composition and aggregation of extracellular polymeric substances (EPS) in hyperhaline and municipal wastewater treatment plants. **Scientific reports**, v. 6, p. 26721, 2016.

ZHANG, J.; ELSER, J. J. Carbon: nitrogen: phosphorus stoichiometry in fungi: a meta-analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1281, 2017.

ZHANG, L.; ZHENG, P.; TANG, C. J.; REN-CUN, J. Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 5, p. 416-426, 2008.

ZHAO, J.; FENG, L.; YANG, G.; DAI, J.; MU, J. Development of simultaneous nitrification-denitrification (SND) in biofilm reactors with partially coupled a novel biodegradable carrier for nitrogen-rich water purification. **Bioresource technology**, v. 243, p. 800-809, 2017.

ZHU, G. B.; PENG, Y. Z.; WU, S. Y.; WANG, S. Y.; XU, S. W. Simultaneous nitrification and denitrification in step feeding biological nitrogen removal process. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 9, p. 1043-1048, 2007.

ZOU, J. L.; XU, G. R.; PAN, K.; ZHOU, W.; DAI, Y.; WANG, X.; ZHANG, D.; HU, Y. C.; MA, M. Nitrogen removal and biofilm structure affected by COD/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N in a biofilter with porous sludge-ceramsite. **Separation and Purification Technology**, v. 94, p. 9-15, 2012.

ZOU, Y.; HU, Z.; ZHANG, J.; XIE, H.; GUIMBAUD, C.; FANG, Y. Effects of pH on nitrogen transformations in media-based aquaponics. **Bioresource technology**, v. 210, p. 81-87, 2016.