

LAURENCE DAMASCENO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO EM UM FILTRO
BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO ALIMENTADO COM
EFLUENTE DE RALF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Urbana – Linha de Pesquisa: Planejamento e Gestão dos Sistemas Urbanos, da Universidade Estadual de Maringá como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Urbana.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogério Lautenschlager.

MARINGÁ-PR

2012

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, e a minha família que merece todo o amor e respeito.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Ao Programa de Pós-graduação Engenharia Urbana (PEU).

Ao Professor Doutor Sandro Rogério Lautenschlager, pela orientação, amizade e paciência.

A Professora Doutora Beatriz Missagia pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

A Josiane Chiaramonte do Núcleo de pesquisas em limnologia, ictiologia e aquicultura (NUPELIA) da UEM pelo conhecimento da técnica FISH.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Urbana, pela contribuição que deram a minha formação profissional.

A Companhia de Saneamento do Estado do Paraná (SANEPAR), em especial ao Gilberto e Saulo pelo transporte e espaço cedido ao desenvolvimento da pesquisa.

Aos Funcionários da SANEPAR: Keylla, Érica, Éder, Geraldo, Alberto, Marcos, César e Erick pela ajuda e companheirismo.

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em especial ao professor Benício e às técnicas Marinete, Rosana, Maria, Vilma e Lourdes.

A todos os colegas do mestrado, pelos estudos desenvolvidos em conjunto e principalmente pela amizade construída nesse período.

Em especial aos meus pais Siderley e Iracilda pela educação, apoio e compreensão.

A minha irmã Laira pelo apoio e compreensão.

A minha segunda mãe e tia Simoni.

A minha avó Idalina “In memoriam” pela educação, ajuda e compreensão durante esse tempo em que esteve junto.

A CAPES pelo apoio financeiro durante a pesquisa.

A todos que direta e indiretamente colaboraram pela realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o pós-tratamento de um Reator Anaeróbio de Manto de Lodo e Fluxo Ascendente (RALF) através de um Filtro Biológico Aerado Submerso (FBAS) com ênfase no processo de nitrificação estudando o comportamento da população nitrificante através da técnica Híbridação *in situ* com Sondas Fluorescentes (FISH), submetido a diferentes condições operacionais. O presente trabalho foi desenvolvido em uma unidade experimental constituída por um FBAS (0,605 m³), preenchido com tampas PET (252 m².m⁻³) seguido de um decantador secundário (1,56 m³) em três etapas distintas de operação. A unidade foi instalada logo após o RALF, a qual faz parte do sistema da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)-Sul administrada pela Companhia de Saneamento do Estado do Paraná (SANEPAR), localizada na cidade de Maringá-PR. As etapas de operação 1, 2 e 3 tiveram um tempo de operação de 45, 60 e 45 dias, respectivamente, com vazões de alimentação de 0,5 m³.h⁻¹ na primeira etapa e 0,2 m³.h⁻¹ na segunda e terceira etapa. Adotou-se taxas de recirculação do lodo do decantador secundário de 0,1 m³.h⁻¹ para a etapa 1 e 0,2 m³.h⁻¹ para as etapas 2 e 3. Buscou-se avaliar a dinâmica da população nitrificante na parte superior do reator detectando as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e oxidadoras de nitrito (NOB), utilizando sondas de oligonucleotídeos através do método FISH. De acordo com os resultados obtidos, a aplicação de decrescentes Cargas orgânicas volumétricas (COV) ao longo das etapas propostas resultaram em melhores desempenhos no processo de nitrificação onde a Etapa 3 apresentou uma eficiência de 78% na remoção de N-NH₃, submetidos a uma COV de 0,83 KgDBO.m⁻³.dia⁻¹. A comunidade nitrificante verificada na parte superior do reator submetida a diferentes COV's mostrou-se diferentes comportamentos, onde a Etapa 3 com a aplicação de uma COV de 0,19 KgDBO.m⁻³.dia⁻¹, apresentou um número maior número de células totais marcadas com DAPI em relação as outras etapas de 35% de *Nitrosomona* (NSM 156), 9% *Nitrobacter* (NIT 3) e 25% de *Nitrospira* (NTSPA 662).

Palavras-chave: Nitrificação; Pós-tratamento; FISH; RALF.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the post-treatment of a Reactor Anaerobic Sludge Mantle Flow and Ascendant (RALF) through a Submerged Aerated Filter Biological (FBAS) with emphasis on the process of studying the behavior of nitrification nitrifying population through hybridization technique Probes Fluorescent in situ hybridization (FISH), under different operating conditions. This study was conducted in an experimental unit consists of a FBAS (0.605 m³), filled with PET lids (252 m². m⁻³) followed by a secondary clarifier (1.56 m³) in three distinct stages of operation. The unit was installed shortly after RALF, which is part of the system of Sewage Treatment Station (STS)-administered by Southern Sanitation Company of the State of Paraná (SANEPAR), located in the city of Maringá-PR. The operation steps 1, 2 and 3 had a run time of 45, 60 and 45 days, respectively, with feed flow rate of 0.5 m³.h⁻¹ in the first stage and 0.2 m³.h⁻¹ second and third stage. We adopted the sludge recirculation rates of the secondary clarifier of 0.1 m³.h⁻¹ for stage 1 and 0.2 m³.h⁻¹ to stage 2 and 3. We sought to evaluate the nitrifying population dynamics in the upper part of the reactor detecting ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing (NOB) using oligonucleotide probes by FISH method. According to the results, application of organic loading decreasing rate (OLR) organic loading rate along the stages proposals resulted in better performance in the nitrification process where Step 3 showed an efficiency of 78% NH₃-N removal, subjected to an OLR of 0.83 KgDBO.m⁻³.dia⁻¹. The nitrifying community checked at the top of the reactor under different OLR was found to be different behaviors, where the Step 3 with the application of a OLR of 0.19 KgDBO.m⁻³.dia⁻¹, showed a larger cell number total labeled with DAPI in relation to the other steps of 35% *Nitrosomona* (NSM 156), 9% *Nitrobacter* (NIT 3) and 25% *Nitrospira* (NTSPA 662).

Keywords: Nitrification; Post-treatment; FISH; RALF.

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| LISTA DE TABELAS..... | xii |
| LISTA DE QUADROS..... | xiii |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES..... | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 18 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 REATOR ANAERÓBIO DE MANTO DE LODO E FLUXO ASCENDENTE (RALF) | 19 |
| 3.2 PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DE REATORES ANAERÓBIOS..... | 21 |
| 3.3 MEIOS DE SUPORTE UTILIZADOS NO FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO..... | 21 |
| 3.4 BIOFILME | 23 |
| 3.4.1 Desenvolvimento do biofilme | 23 |
| 3.4.2 Formação, constituição e estrutura dos biofilmes | 23 |
| 3.4.3 Fatores intervenientes na formação do biofilme..... | 25 |
| 3.5 FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO (FBAS) | 27 |
| 3.6 ESTABELECIMENTO DA COMUNIDADE NITRIFICANTE EM BIOFILMES | 29 |
| 3.7 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO | 31 |
| 3.7.1 Nitrificação | 33 |
| 3.7.2 Desnitrificação..... | 37 |
| 3.8 BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA NA DETECÇÃO DE MICRO- ORGANISMOS..... | 39 |
| 3.8.1 Técnica FISH..... | 40 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.8.2 Aplicação da técnica FISH em estudos para a caracterização da população nitrificante em sistemas de tratamento de águas residuárias..... | 42 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 4.1 ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO ETE 2 | 44 |
| 4.2 PLANTA PILOTO | 46 |
| 4.3. COLETA DAS AMOSTRAS | 51 |
| 4.4 MONITORAMENTO FÍSICO-QUÍMICO DO SISTEMA..... | 52 |
| 4.5 MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO DO SISTEMA | 53 |
| 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 58 |
| 5. RESULTADOS | 59 |
| 5.1 REMOÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA | 59 |
| 5.2 REMOÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS | 66 |
| 5.3 PH..... | 71 |
| 5.4 Alcalinidade Total | 73 |
| 5.5 OXIGÊNIO DISSOLVIDO..... | 75 |
| 5.6 NITROGÊNIO AMONIACAL..... | 77 |
| 5.6.1 Influência da COV no processo de nitrificação..... | 78 |
| 5.7 NITRITO | 80 |
| 5.8 NITRATO | 81 |
| 5.9 MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO DO SISTEMA | 83 |
| 5.9.1 Relação entre a abundância de micro-organismos com os resultados físico-químicos | 87 |
| 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES | 90 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 92 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 3.1- PERFIL ESQUEMÁTICO DE UM REATOR RALF | 20 |
| FIGURA 3.2- DIFERENTES TIPOS DE MEIO SUPORTE | 22 |
| FIGURA 3.3- MODELO DE STOODLY PARA O DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME | 24 |
| FIGURA 3.4- PRINCIPAIS COMPONENTES DE MATRIZES DE ORIGEM BIOLÓGICA E ESTRUTURAS TÍPICAS DE BIOFILMES..... | 25 |
| FIGURA 3.5- FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO (FBAS) | 27 |
| FIGURA 3.6- PERFIL ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS HETEROTRÓFICOS E NITRIFICANTES DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (MATÉRIA ORGÂNICA E AMÔNIA) EM UM FILTRO BIOLÓGICO PERCOLADOR (FBP) E UM FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO (FBAS). | 31 |
| FIGURA 3.7- PRINCIPAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE E CONVERSÃO DE AMÔNIA EM BIOFILMES | 32 |
| FIGURA 3.8- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA FISH..... | 42 |
| FIGURA 4.1- TRATAMENTO DO LODO: (A) ADENSADOR; (B) CENTRÍFUGA DE ALTA ROTAÇÃO E (C) PÁTIO DE CURA. | 44 |
| FIGURA 4.2- TRATAMENTO DO LODO: (A) ADENSADOR; (B) CENTRÍFUGA DE ALTA ROTAÇÃO E (C) PÁTIO..... | 45 |
| FIGURA 4.3- LOCALIZAÇÃO DA PLANTA PILOTO NA ETE..... | 46 |
| FIGURA 4.4- PLANTA PILOTO: (A) FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO; (B) DECANTADOR SECUNDÁRIO E (C) MATERIAL DE ENCHIMENTO..... | 47 |
| FIGURA 4.5- SISTEMA DE ALIMENTAÇÃO DA UNIDADE EXPERIMENTAL. (A) RESERVATÓRIO; (B) MANGUEIRA RESPONSÁVEL PELO SIFONAMENTO E (C) BOMBA HIDRÁULICA. | 49 |
| FIGURA 4.6- SISTEMA DE ENTRADA E SAÍDA DO REATOR. (A) REGISTRO DE ENTRADA PARA O CONTROLE DA VAZÃO; (B) TUBULAÇÕES DE SAÍDA DO EFLUENTE..... | 50 |
| FIGURA 4.7- SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DA UNIDADE EXPERIMENTAL. (A) BOMBA HIDRÁULICA RESPONSÁVEL PELO RECALQUE DO LODO ATÉ A ENTRADA DO SISTEMA; (B) REGISTRO PARA O CONTROLE DA VAZÃO..... | 51 |
| FIGURA 4.8- SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO DE AR. (A) COMPRESSOR; (B) DISTRIBUIÇÃO DO AR COM REGISTRO PARA O CONTROLE DA VAZÃO. | 51 |
| FIGURA 4.9- PONTOS DE COLETA PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS. (A) ABERTURA NA PARTE SUPERIOR DO REATOR; (B) REGISTRO PARA A COLETA DO LODO DE RECIRCULAÇÃO. 54 | |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 4.10-(A) BIOFILME ADERIDO À TAMPA PET; (B) LODO DE RECIRCULAÇÃO. | 54 |
| FIGURA 4.11- ETAPAS BÁSICAS DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH) | 57 |
| FIGURA 5.1- VARIAÇÃO DE DQO TOTAL E FILTRADA AO LONGO DOS DIAS DE OPERAÇÃO... | 59 |
| FIGURA 5.2- VALORES DE DQO TOTAL E EFICIÊNCIAS DE REMOÇÃO PARA AS..... | 60 |
| FIGURA 5.3- BOX-PLOT MOSTRANDO OS VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS, MÉDIOS E DESVIOS- PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DQO TOTAL PARA AS TRÊS ETAPAS INVESTIGADAS DE ACORDO COM O PADRÃO DE LANÇAMENTO..... | 62 |
| FIGURA 5.4- VALORES DE DBO TOTAL E EFICIÊNCIAS DE REMOÇÃO PARA AS TRÊS ETAPAS MONITORADAS. (A) ETAPA 1; (B) ETAPA 2 E (C) ETAPA 3. | 64 |
| FIGURA 5.5- EFICIÊNCIAS TOTAIS OBTIDAS DE DBO (RALF+FBAS) PARA AS TRÊS ETAPAS AVALIADAS..... | 65 |
| FIGURA 5.6- BOX-PLOT MOSTRANDO OS VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS, MÉDIOS E DESVIOS- PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DQO TOTAL PARA AS TRÊS ETAPAS INVESTIGADAS DE ACORDO COM O PADRÃO DE LANÇAMENTO..... | 65 |
| FIGURA 5.7- RESULTADOS DE SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS (SST) AO LONGO DOS DIAS DE OPERAÇÃO PARA ETAPA 1..... | 66 |
| FIGURA 5.8- BOX-PLOT MOSTRANDO OS VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS, MÉDIOS E DESVIOS- PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE SST REFERENTE À ETAPA 1..... | 67 |
| FIGURA 5.9- RESULTADOS DE SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS (SST) AO LONGO DOS DIAS DE OPERAÇÃO PARA ETAPA 2..... | 67 |
| FIGURA 5.10- BOX-PLOT MOSTRANDO OS VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS, MÉDIOS E DESVIOS- PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE SST REFERENTE À ETAPA 1..... | 68 |
| FIGURA 5.11- RESULTADOS DE SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS (SST) AO LONGO DOS DIAS DE OPERAÇÃO PARA ETAPA 3..... | 68 |
| FIGURA 5.12- BOX-PLOT MOSTRANDO OS VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS, MÉDIOS E DESVIOS- PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE SST REFERENTE A ETAPA 3..... | 69 |
| FIGURA 5.13- BOX-PLOT MOSTRANDO OS VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS, MÉDIOS E DESVIOS- PADRÃO DAS EFICIÊNCIAS DE SST PARA AS TRÊS ETAPAS INVESTIGADAS DE ACORDO COM O PADRÃO DE LANÇAMENTO. | 70 |
| FIGURA 5.14- CARGAS APLICADAS E REMOVIDAS DE SST AO LONGO DOS DIAS DE OPERAÇÃO. | 70 |
| FIGURA 5.15- VALOR MÉDIO DE pH E PRODUÇÃO DE NITRATO. (A) ETAPA 1; (B) ETAPA 2 E (C) ETAPA 3. BARRAS DE ERRO = DESVIO PADRÃO..... | 72 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 5.16- CONSUMO MÉDIO DE ALCALINIDADE TOTAL E PRODUÇÃO DE NITRATO. (A) ETAPA 1; (B) ETAPA 2 E (B) ETAPA 3. BARRAS DE ERRO = DESVIO PADRÃO. | 74 |
| FIGURA 5.17- BOX-PLOT MOSTRANDO OS VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS, MÉDIOS E DESVIOS-PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (OD) REFERENTE AS ETAPA 2 E 3. | 76 |
| FIGURA 5.18- VALORES DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO E CARGAS REMOVIDAS DE NITROGÊNIO AMONICAL PARA AS ETAPAS 2 E 3..... | 76 |
| FIGURA 5.19- VALORES DE N-AMONICAL E EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO PARA AS TRÊS ETAPAS AVALIADAS. BARRAS DE ERRO=DESVIO PADRÃO..... | 77 |
| FIGURA 5.20- VALORES DE N-AMONICAL AO LONGO DOS DIAS DE OPERAÇÃO PARA AS TRÊS ETAPAS AVALIADAS | 77 |
| FIGURA 5.21- PERFIL DE CONCENTRAÇÃO DE NITRITO NA ENTRADA E SAÍDA DO SISTEMA FBAS. | 80 |
| FIGURA 5.22- PERFIL DE CONCENTRAÇÃO DE NITRATO NA SAÍDA DO SISTEMA FBAS..... | 82 |
| FIGURA 5.23- CARGA ORGÂNICA APLICADA (DBO) E PRODUÇÃO DE NITRATO NO FBAS DURANTE AS 3 ETAPAS INVESTIGADAS..... | 82 |
| FIGURA 5.24- BOX-PLOT MOSTRANDO OS VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS, MÉDIOS E DESVIOS-PADRÃO DOS VALORES DE NITRATO. | 83 |
| FIGURA 5.25- QUANTIDADE DE <i>BACTERIA</i> , AOB E NOB. CADA GRÁFICO MOSTRA A QUANTIDADE RELATIVA DE CADA SONDA COMPARADA AO DAPI (EIXO Y) CONTADOS EM 10 CAMPOS MICROSCÓPICOS ALEATORIAMENTE EM DUAS AMOSTRAS ANALISADAS (BIOFILME NO TOPO DO REATOR E LODO DE RECIRCULAÇÃO). ETAPA 1 (A); ETAPA 2 (B E C) E ETAPA 3 (D E E). BARRAS DE ERRO=DESVIO PADRÃO. | 86 |
| FIGURA 5.26- DISTRIBUIÇÃO DE <i>BACTERIA</i> (EUB338), AOB (NSO190 E NSM156), NOB (NIT3 E NTSPA662). CADA GRÁFICO MOSTRA A QUANTIDADE RELATIVA DE CADA SONDA COMPARADA AO CORANTE DAPI (EIXO Y) EM DIFERENTES ETAPAS PROPOSTAS. AO LADO O GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA OXIDADA (MG.L ⁻¹), NITRITO (MG.L ⁻¹), NITRATO (MG.L ⁻¹), DBO FILTRADA (MG.L ⁻¹) E OXIGÊNIO DISSOLVIDO (MG.L ⁻¹). ETAPA 1 (A E B); ETAPA 2 (C E D) E ETAPA 3 (E E F)..... | 88 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 3.1- SÍNTESE DE FATORES QUE AFETAM A FORMAÇÃO E O ESTABELECIMENTO DE BIOFILMES | 26 |
| TABELA 3.2- FATORES AMBIENTAIS QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO | 34 |
| TABELA 4.1- PARÂMETROS ANALISADOS, PONTOS DE AMOSTRAGEM, FREQUÊNCIA E MÉTODOS UTILIZADOS | 53 |
| TABELA 5.1- CONSUMO MÉDIO DE ALCALINIDADE, PRODUÇÃO DE NITRATO E AMÔNIA OXIDADA | 75 |
| TABELA 5.2- CARGA ORGÂNICA REMOVIDA PELO SISTEMA RALF E CARGA ORGÂNICA APLICADA AO FBAS | 79 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 4.1- PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO .. | 48 |
| QUADRO 4.2- PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL DE ENCHIMENTO | 48 |
| QUADRO 4.3- CONDIÇÕES OPERACIONAIS UTILIZADAS NA OPERAÇÃO DO FBAS | 48 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| APHA | American Public Health Association |
| AOB | Bactérias Oxidadoras de Amônia (<i>ammonium oxidizing bacteria</i>) |
| BAS | Biofiltro Aerado Submerso |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| DBO₅ | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| DAPI | 4',6 –diamidino-2-fenilindol |
| DGGE | Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>) |
| EPS | Exopolissacarídeos |
| ETE | Estação de Tratamento de Esgoto |
| FBAS | Filtro Biológico Aerado Submerso |
| FBP | Filtro Biológico Percolador |
| FISH | Hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes |
| N-NH₄⁺ | Nitrogênio na forma de nitrogênio amoniacal |
| NH₄⁺ | Nitrogênio Amoniacal |
| N-NO₂⁻ | Nitrogênio na forma de nitrito |
| N-NO₃⁻ | Nitrogênio na forma de nitrato |
| NO₂⁻ | Nitrito |
| NO₃⁻ | Nitrato |
| NOB | Bactérias Oxidadoras de Nitrito |
| OD | Oxigênio Dissolvido |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| pH | Potencial Hidrogênionico |

| | |
|----------------|------------------------------------------------------|
| RALEX | Reator Aeróbio de Leito Fluidizado |
| RALF | Reator Anaeróbio de Manto de Lodo e Fluxo Ascendente |
| SANEPAR | Companhia de Saneamento do Estado do Paraná |
| SST | Sólidos Suspensos Totais |
| TDH | Tempo de Detenção Hidráulica |
| UASB | <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> |

1. INTRODUÇÃO

A utilização de reatores anaeróbios no tratamento tem se mostrado uma alternativa economicamente viável para o tratamento de águas residuárias, principalmente no Brasil. Entretanto, estes reatores apresentam dificuldades no atendimento a padrões de lançamento, principalmente em relação aos compostos nitrogenados visto que os sistemas anaeróbios representados pelos reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) não são capazes de remover estes compostos, sendo, portanto necessária à adoção de unidades de pós-tratamento.

Para atender as exigências de lançamento do composto nitrogênio amoniacal através da Resolução CONAMA 430/2011, várias Estações de tratamento de esgoto (ETEs) têm utilizado reatores de biofilme para a nitrificação como pós-tratamento de reatores anaeróbios, tais como Filtros Biológicos Percoladores (FBP), Filtro Biológico Aerado Submerso (FBAS) e Reatores aeróbios de leito fluidizado e expandido (RALEX). Os FBAS's são sistemas aeróbios submersos que utilizam um material suporte como plásticos, materiais inertes, ou materiais alternativos como garrafas de Yakult® (CHAGAS, 2008) e tampas de garrafa PET (GIUSTINA *et al.*, 2010) aonde permitem a formação do biofilme, sendo o fornecimento de oxigênio realizado através de aeradores mecânicos. Este tipo de reator permite a remoção da matéria orgânica, nitrogênio amoniacal, ou até mesmo nitrato através da desnitrificação, dependendo das condições operacionais adotadas neste reator.

Os FBAS, que tem como característica a imobilização da biomassa favorecem uma maior retenção de sólidos que facilitam o crescimento de micro-organismos nitrificantes nestes reatores. No entanto, a presença de uma alta carga orgânica afluenta favorece o desenvolvimento de bactérias heterotróficas, que possuem um crescimento rápido e tendem a se desenvolver na camada externa do biofilme, onde há maior disponibilidade de oxigênio dissolvido prevalecendo sobre os micro-organismos nitrificantes, afetando o processo de nitrificação (CHEN *et al.*, 2006).

WIJEYEKOON *et al.*, (2004) mostraram que altas cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas favorecem o crescimento de bactérias heterotróficas no biofilme, havendo uma maior competição com as bactérias nitrificantes por espaço e oxigênio podendo

comprometer o processo de nitrificação em biofiltros aerados submersos (FDZ-POLANCO *et al.*, 2000).

Portanto, um melhor conhecimento da comunidade bacteriana responsável pela nitrificação é importante para um melhor controle do processo de nitrificação e desempenho do sistema (OKABE *et al.*, 1999; AOI, 2000). Ao conhecer a quantidade de bactérias nitrificantes, é possível associá-la as análises físico-químicas da água residuária (pH, oxigênio dissolvido, temperatura, alcalinidade, relação COV, DBO, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, etc) para atingir uma boa eficiência do sistema quanto a remoção de nitrogênio.

Dentre as técnicas comumente empregadas para a quantificação destes micro-organismos, destaca-se o método Híbridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH), o qual usa sondas de oligonucleotídeos com marcadores fluorescentes que tem como alvo o rRNA 16S, sendo aplicado para quantificar as comunidades microbianas (DAIMS *et al.*, 2001a, b, c). Este método vem demonstrando resultados particularmente promissores para análise de biofilmes nitrificantes (SCHRAMM *et al.*, 1996; GIESEKE *et al.*, 2001; MOBARRY *et al.*, 1996; DELATOLLA *et al.*, 2009; MISSAGIA, 2010).

Portanto, visando promover um melhor desempenho das ETEs já implantadas no Brasil em especial no Estado do Paraná, onde é utilizado o processo RALF+FBP foi utilizado um sistema em escala piloto composto por um FBAS como pós-tratamento de efluentes RALF, que está instalada na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE 2) localizada na Cidade de Maringá-PR. Desta forma foram testadas três diferentes COV afim de verificar o comportamento no processo de nitrifica o, assim como detectar e quantificar os micro-organismos responsáveis pela conversão do nitrogênio por meio da técnica FISH.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o processo de nitrificação em um Filtro Biológico Aerado Submerso (FBAS) em escala piloto como pós-RALF em diferentes COV's quantificando a comunidade nitrificante responsável pelo processo de nitrificação através da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH).

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar a influência de três diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV) no desempenho do processo de nitrificação através da remoção do nitrogênio amoniacal, produção de nitrito e nitrato em um FBAS aplicado ao pós-tratamento do reator RALF;
- ❖ Avaliar o desempenho de remoção da matéria orgânica e sólidos suspensos;
- ❖ Detectar e quantificar as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e oxidadoras de nitrito (NOB) envolvidas no processo de nitrificação em um Filtro biológico aerado submerso (FBAS) na parte superior do reator, mediante a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes em três diferentes COV's;
- ❖ Correlacionar as abundâncias de AOB representando pelas sondas NSO190 e NSM156 e NOB representado pelas sondas NIT3 e NTSPA662 pela técnica FISH às condições físico-químicas da água residuária (nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, alcalinidade, DBO Filtrada).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 REATOR ANAERÓBIO DE MANTO DE LODO E FLUXO ASCENDENTE (RALF)

Os reatores Anaeróbios de Manto de Lodo e Fluxo Ascendente (RALF) são unidades destinadas ao tratamento de esgotos sanitários, onde ocorre a transformação da matéria orgânica através de reações bioquímicas realizadas por diferentes tipos de bactérias anaeróbias. Estes reatores tornaram-se uma tecnologia simplificada e atrativa para o tratamento de esgoto doméstico devido às suas várias vantagens em relação a outros processos de tratamento de efluentes aeróbios (lodos ativados, lagoas aeradas, filtros biológicos percoladores, entre outros) como: baixo consumo energético, baixos custos de implantação e operação, baixa demanda de área, baixa produção de lodo.

Estes reatores vêm sendo utilizados no estado do Paraná e no Brasil no tratamento de esgotos para populações de 200 a 600.000 habitantes e receberam junto a Companhia de Saneamento do Estado do Paraná (SANEPAR) o nome de RALF (Reator anaeróbio de lodo fluidizado) (BARÉA, 2006), com a introdução de modificações construtivas em relação ao reator UASB (AISSE *et al.*, 2001).

Segundo a SANEPAR (2005), o reator RALF é formado por um tronco de cone com a base menor voltada para baixo, com pequena inclinação, e com paredes inclinadas a 45° com a horizontal, encimadas por um canal periférico coletor dos esgotos clarificados (Figura 3.1). Estes reatores se baseiam em três diferentes parâmetros: taxa de aplicação volumétrica, velocidade do líquido e altura do reator.

O esgoto sanitário é introduzido na câmara central divisora de vazão, distribuídos pelos tubos alimentadores a qual o líquido entra pelo fundo entrando em contato com o leito de lodo ocorrendo às diversas atividades metabólicas, produzindo diferentes tipos de gases. O biogás é um dos principais produtos gerados no RALF, sendo formado pela mistura de gás metano (CH₄), gás sulfídrico (H₂S), gás carbônico (CO₂), nitrogênio (N₂) e outros gases.

Para reter a biomassa presente no sistema, impedindo que ela seja eliminada com o efluente final, existe um separador trifásico estrutura que possibilita a separação sólida (biomassa), líquida (efluente clarificado) e gasosa (biogás) (VON SPERLING, 2005). A figura 3.1 mostra o perfil esquemático de um RALF.

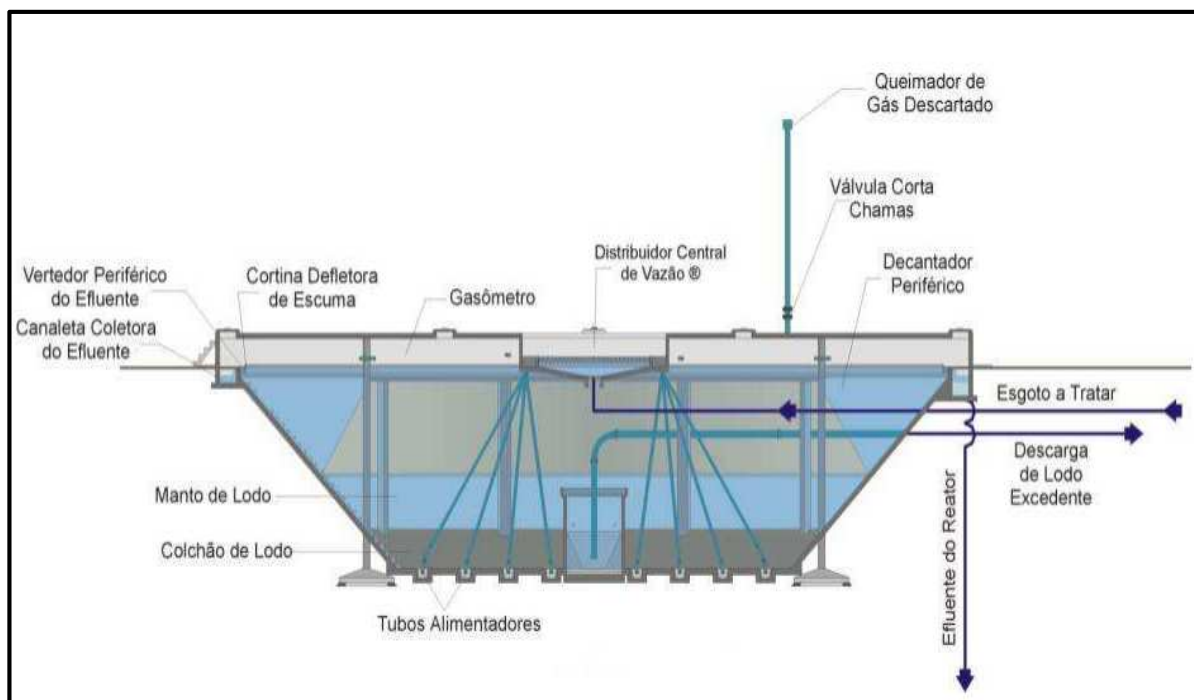


Figura 3.1- Perfil esquemático de um reator RALF
 Fonte: SANEPAR (2005)

Segundo a SANEPAR (2005) o RALF é composto pelos seguintes elementos:

- ❖ Divisor central de vazão: divide a vazão uniformemente para alimentar os tubos difusores;
- ❖ Tubos difusores: conduz o esgoto sanitário do topo a base do reator, distribuindo de forma uniforme e homogênea no fundo, onde se encontra o manto de lodo;
- ❖ Vertedor periférico: coleta o esgoto;
- ❖ Cortina defletora de espuma: reter e armazenar espuma no reator (na zona de digestão/decantação), evitando o arraste com o esgoto;
- ❖ Queimador de gás: queima o biogás no espaço livre superior interno do RALF;
- ❖ Sistema de coleta e descarte de gases: descarta os gases para a atmosfera, queima ou reaproveita para fins energéticos.

Uma característica do processo é a limitação na eficiência de remoção de DBO, a qual se situa, em média, em torno de 70%, inferior, portanto a outros processos convencionais de tratamento, não atendendo aos padrões de lançamento vigentes na legislação ambiental (Resolução CONAMA nº 357/2005). Portanto, o pós-tratamento de efluente de reatores

anaeróbios assume importância fundamental para a proteção dos corpos d'água receptores (CHERNICHARO, 2007).

O RALF pode obter uma eficiência média de 65% de remoção de DQO e 70% de DBO₅. O efluente final apresenta uma concentração de DBO₅ de 120 mg.L⁻¹ e 80 mg.L⁻¹ de SST (JORDÃO E PESSOA, 2005).

3.2 PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DE REATORES ANAERÓBIOS

O pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios tem como objetivo a remoção da matéria orgânica remanescente, e reduzir as concentrações de alguns constituintes (Nitrogênio, fósforo, micro-organismos patogênicos) pouco afetados pelo tratamento anaeróbio. A necessidade de uma etapa de pós-tratamento aeróbio é quase que exclusivamente pela remoção de compostos nitrogenados que não é verificada em processos anaeróbios, com exceção de processos ANAMMOX e CANON (ALMEIDA, 2007).

A necessidade de uma etapa aeróbia no sistema é que o processo biológico de transformação do nitrogênio (Nitrificação) que consiste na oxidação do N-amoniaco a nitrato não ocorre em ambientes com ausência de oxigênio. Em reatores anaeróbios a concentração de N-amoniaco tende a ser maior no efluente tratado do que no afluente bruto devido à transformação de compostos orgânicos nitrogenados (amonificação).

O pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios com reatores de biomassa imobilizada com a concepção reator anaeróbio seguido de aeróbio tem sido utilizada devido à boa capacidade de remover a matéria orgânica remanescente, nutrientes e sólidos suspensos.

3.3 MEIOS DE SUPORTE UTILIZADOS NO FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO

Os meios de suporte têm a finalidade de apoio para a fixação e retenção dos micro-organismos, possibilitando um maior tempo de retenção celular e compactidade (uma vez que estes reatores podem operar com reduzidos tempos de detenção hidráulica). Estes

atuam como barreira física para retenção dos sólidos suspensos contidos na água residuária, fazendo com que este não seja lavado do sistema. A principal característica do meio suporte é aumentar a concentração de micro-organismos e consequentemente possibilitar um maior contato entre os constituintes presentes no efluente e os micro-organismos no reator, alcançando uma maior capacidade de tratamento, devido ao aumento da velocidade global de conversão de substrato.

Atualmente existe uma variedade de materiais empregados como meio suporte em reatores de biomassa imobilizada. Os materiais utilizados são pedregulhos, cascalhos, pedras britadas, materiais plásticos e escória de auto-fornos (JORDÃO & PESSOA, 2005). Meios compostos por materiais tais como poliestireno, polipropileno, poliuretano, PVC e plástico, também têm sido utilizados. A figura 3.2 mostra os diferentes materiais utilizados como meio suporte.



Figura 3.2- Diferentes tipos de meio suporte
Fonte: Adaptado SANTOS (2005)

Estes materiais para mostrar um bom desempenho no tratamento devem apresentar uma grande área superficial por unidade de volume ($\text{m}^2.\text{m}^{-3}$), estruturalmente resistentes, apresentar alta durabilidade, sejam biologicamente e quimicamente inertes. E, por fim, também é importante que sejam de fácil aquisição (FLORENCIO *et al.*, 2009).

Santos (2005) destacam-se os seguintes aspectos na escolha de um bom meio suporte para o filtro biológico:

- ❖ Peso específico do meio suporte, que se refere principalmente à questão estrutural do reator;
- ❖ A superfície do material que está relacionada com a área de contato entre o líquido e o biofilme formado;
- ❖ O índice de vazios influencia na circulação do líquido e ar, por entre a camada suporte, mantendo o ambiente nas condições favoráveis.

3.4 BIOFILME

3.4.1 Desenvolvimento do biofilme

O biofilme pode ser entendido como o resultado da aderência de sucessivas colônias de micro-organismos (bactérias, protozoários, fungos, algas, entre outros) ao material suporte, que vão se sobrepondo umas às outras formando um filme biológico (biofilme). Nesse biofilme ocorre a interação da utilização de diferentes substratos (matéria orgânica, nutrientes, sulfetos, entre outros) que alimentam estes micro-organismos e produzem diferentes subprodutos metabolizados. Para XAVIER *et al.*, (2003) o biofilme pode ser definido como comunidades de micro-organismos imobilizados conjuntamente numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana.

3.4.2 Formação, constituição e estrutura dos biofilmes

A adesão microbiana em superfícies de contato segue três processos básicos: adsorção, adesão e aderência (estabilização da adesão celular), onde os mecanismos de fixação e estabelecimento do biofilme dependem fortemente da comunidade microbiana, das

atividades metabólicas e do tipo de superfície disponível para o desenvolvimento da colonização (ALMEIDA, 2010).

Para uma melhor compreensão da formação do biofilme STOODLY *et al.*, (2002) propuseram um modelo, que mostra os vários estágios da formação de um biofilme, conforme mostrado na figura 3.3.

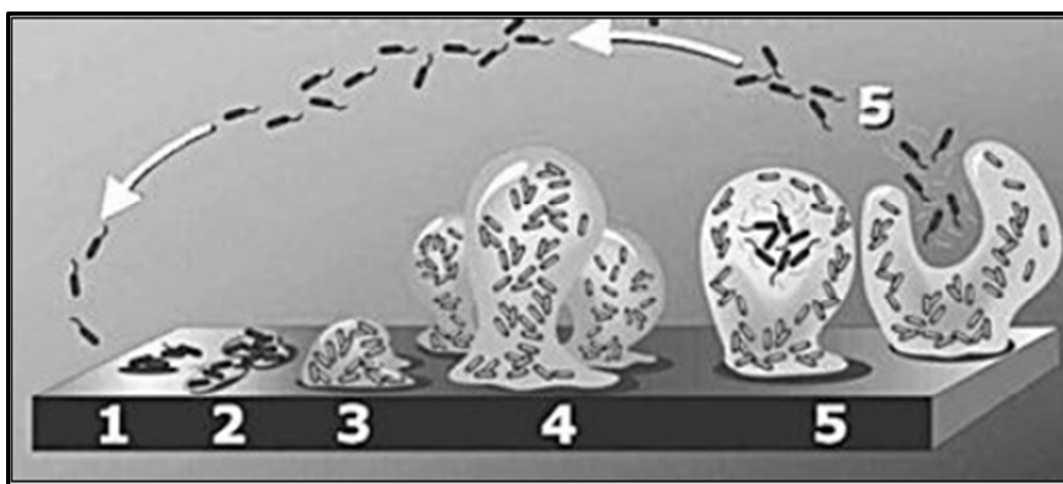


Figura 3.3- Modelo de Stoodly para o desenvolvimento do biofilme
Fonte: Adaptado Stoodly *et al.*, (2002)

A formação do biofilme consiste em 5 estágios:

- ❖ 1ª Estágio: as células bacterianas aderem de forma reversível à superfície;
- ❖ 2ª Estágio: produção de EPS (extracelular polymeric substances – matriz de polímeros extracelulares – da coesão ao biofilme) resultando em aderência mais firme (aderência irreversível);
- ❖ 3º Estágio: desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme;
- ❖ 4º Estágio: maturação da arquitetura do biofilme;
- ❖ 5º Estágio: dispersão de células do biofilme.

Concluída a etapa de adesão microbiana, responsável pela formação de matrizes heterogêneas sob superfícies de contato, os micro-organismos se desenvolvem e produzem substâncias poliméricas extracelulares compostas por polissacarídeos e glicoproteínas, formando uma estrutura biológica denominada biofilme (LESSARD; LE BIHAN, 2003).

Por meio das substâncias poliméricas extracelulares (EPS) as bactérias mantêm contato com a superfície de adesão, em conjunto com as cadeias poliméricas formadas pela decomposição de material celular (algas e bactérias, por exemplo) (Figura 3.4). Para o início da formação do biofilme em reatores de crescimento aderido esta pode ser potencializada pela utilização de materiais com superfície de contato irregulares, porosas ou providas de interstícios, ou seja, uma maior área superficial de aderência. Esta pode estimular uma maior produção de exopolímeros, aumentando a excreção de polissacarídeos por parte dos micro-organismos (VANVIVERDE; KIRCHMAN, 1993). A figura 3.4 mostra os principais constituintes que compõe uma matriz de origem biológica, ilustrando a configuração típicas de biofilmes.

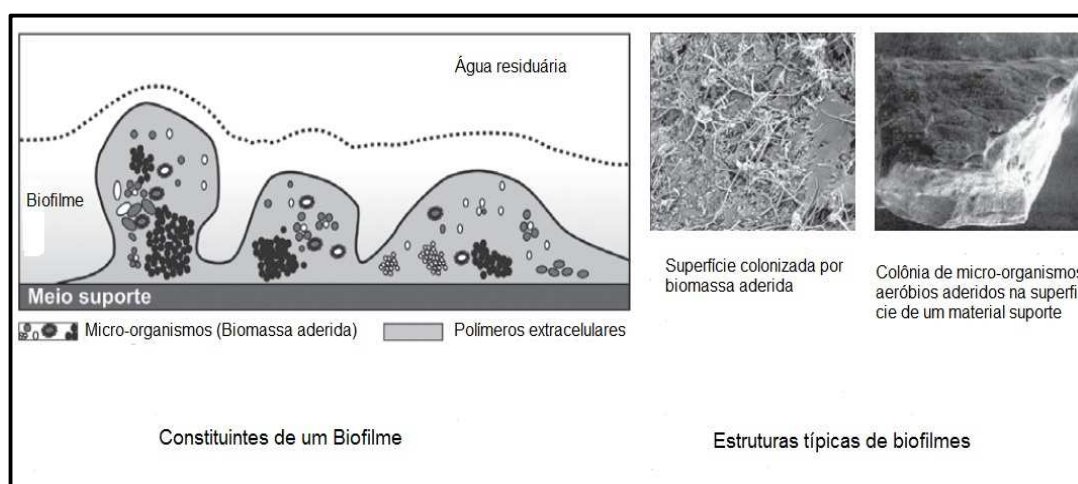


Figura 3.4- Principais componentes de matrizes de origem biológica e estruturas típicas de biofilmes

Fonte: Florêncio *et al.* (2009)

3.4.3 Fatores intervenientes na formação do biofilme

Dentre os inúmeros fatores intervenientes na formação do biofilme e nas condições de estabilidade do biofilme alguns podem ser enfatizados. A tabela 3.1 mostra um resumo dos mais importantes fatores (ALMEIDA, 2007). Além disso, destacam-se os eventos de perda de biofilme por erosão, abrasão e descolamento completo de parte da matriz gelatinosa formada. Além disso, pode-se destacar que em biofilmes contendo consórcios de bactérias nitrificantes e desnitrificantes os gases resultantes da redução do nitrato a nitrogênio gasoso podem promover a desagregação de parte da estrutura da biomassa em função de bolhas geradas no interior do biofilme (MELO, 2003 *apud* FLORÊNCIO, 2009).

Tabela 3.1- Síntese de fatores que afetam a formação e o estabelecimento de biofilmes

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

Fonte: Adaptado Almeida (2007)

3.5 FILTRO BIOLÓGICO AERADO SUBMERSO (FBAS)

O filtro biológico aerado submerso (FBAS) caracteriza-se pela utilização do mesmo material suporte utilizado para o filtro biológico percolador (FBP) com elevada área específica para o tratamento de águas residuárias. Este além de possibilitar o tratamento secundário, também alcança níveis terciários, podendo assim remover nutrientes.

Os FBAS são compactos, de impacto ambiental relativamente baixo e totalmente possível de ser implantado no meio urbano.

O sistema é constituído por um tanque preenchido com um material suporte inerte tal como argila, xisto, polietileno (ROZIC *et al.*, 2000; OSORIO & HONTORIA, 2002), escórias vulcânicas (MORGAN-SAGASTUME & NOYOLA, 2007), cascas de ostras, bolas de plástico (LIU *et al.*, 2010), entre outros, através do qual o esgoto e ar fluem permanentemente. Na quase totalidade dos processos existentes, o material suporte é mantido sob total imersão pelo fluxo hidráulico, caracterizando como reatores trifásicos compostos pela (GONÇALVES *et al.*, 1996; MENDOZA-ESPINOZA & STEPHENSON, 1999):

- ❖ Fase sólida: constituída pelo meio suporte e pelas colônias de micro-organismos que nele se desenvolvem, sob a forma de um filme biológico (biofilme);
- ❖ Fase líquida: composto pelo esgoto em permanente escoamento através do material de enchimento;
- ❖ Fase gasosa: formada pela aeração artificial e, em reduzida escala, pelos gases subprodutos da atividade biológica.

A figura 3.5 mostra um Filtro biológico aerado submerso (FBAS).



Figura 3.5- Filtro biológico aerado submerso (FBAS)

O sentido de fluxo hidráulico (ar e água) determinam as principais características operacionais destes reatores, influenciando diretamente na retenção de sólidos suspensos, transferência gás-líquido de oxigênio, evolução da perda de carga hidráulica, gastos energéticos e a produção de odores, resultando em duas configurações (GONÇALVES *et al.*, 2001):

- ❖ Co-corrente: com fluxos de ar e líquido ascendentes;
- ❖ Contra-corrente: com fluxo de líquido descendentes e ar descendentes.

MENDONZA-ESPINOZA & STHEPHENSON (1999) destaca o fluxo hidráulico como um dos principais parâmetros destes reatores, pois o sistema co-corrente é muito importante quando a remoção da matéria orgânica e compostos nitrogenados são requeridos em único reator. Isto possibilita um maior contato entre o efluente e o oxigênio dissolvido, favorecendo o crescimento de micro-organismos heterotróficos e nitrificantes e consequentemente uma melhoria no processo de tratamento.

O dimensionamento dessas unidades se baseia na taxa de aplicação superficial (TAS) que corresponde à quantidade de esgotos aplicados diariamente por unidade de área do meio suporte ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$) e a COV que refere-se a quantidade de matéria orgânica aplicada diariamente no reator, por unidade de volume do meio suporte ($\text{kgDBO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$ ou $\text{kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$) (GONÇALVES *et al.*, 2001). Aisse *et al.*, (2001b) operando um FBAS como pós-tratamento de efluentes de reatores RALF em escala piloto, mostrou que para taxas de aplicação superficial de até $30 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$ e cargas orgânicas volumétricas de até $1,0 \text{ KgDBO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$ obteve resultando de DBO inferiores a $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Para Aisse *et al.*, (2001), os custos de operação e manutenção obtidos para um FBAS operando como pós-tratamento de reatores anaeróbios, com vazão de $252 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, foi de aproximadamente 22% menor que o sistema de pós-tratamento utilizando o processo de lodos ativados.

HIRAKAWA e colaboradores estudaram um FBAS aplicado como pós-tratamento de efluente de reator UASB em escala piloto tratando esgoto sanitário. O reator UASB tinha um volume de $0,604 \text{ m}^3$ e o FBAS com $0,0327 \text{ m}^3$ usando como material suporte argila de 6,5 mm e diferentes vazões ($0,015 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ a $0,046 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), obtendo uma concentração na DBO de $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ no efluente final. Os autores constataram também a remoção de

nitrogênio amoniacal, obtendo valor de 5 mg.L^{-1} no efluente final (HIRAKAWA *et al.*, 2002).

GIUSTINA e colaboradores propuseram uma nova configuração de FBAS multi-estágio para o pós-tratamento de efluentes de reator UASB com o objetivo de avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica e Sólidos Suspensos (SS). Os BAS foram construídos em tubo de acrílico de 4 m de altura e 0,15 m de diâmetro e testados diferentes materiais-suporte, nomeadamente: tampas de e gargalos de garrafa PET ($165 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$), pedra britada nº 4 ($50 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$) e anéis Pall ($135 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$). Cada BAS possui uma câmara anaeróbia, aeróbia e anóxica em série, com volumes de $0,0136 \text{ m}^3$, $0,03 \text{ m}^3$ e $0,0264 \text{ m}^3$ sendo denominados BAS 1, 2 e 3 (GIUSTINA *et al.*, 2010).

CHAGAS (2008) avaliou o pós-tratamento de um Reator UASB utilizando um FBAS, com objetivo de verificar eficiência quanto à nitrificação, submetendo o mesmo a diferentes taxas de recirculação do lodo do decantador final para a entrada do FBAS. Esse estudo foi desenvolvido em três regimes distintos de operação. Os três regimes de operação tiveram tempo de duração de 75, 80 e 54 dias, com vazões de alimentação de $0,5 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ nos dois primeiros regimes e $0,2 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ no regime 3. As taxas de recirculação foram respectivamente 0,2, 0,4 e 0,8, para os regimes 1, 2 e 3. Esses três regimes de operação apresentaram as seguintes taxas de aplicação superficial, DQO ($35, 40$ e $16 \text{ g DQO.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$); DBO ($16, 14$ e $7 \text{ g DBO.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$) e NKT ($8,8, 8,7$ e $3,1 \text{ g NKT.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$) respectivamente. O regime de operação 3 apresentou os melhores resultados, produzindo um efluente final com concentrações médias: 78 mg.L^{-1} (DQO), 28 mg.L^{-1} (DBO), 27 mg.L^{-1} (SST), 12 mg.L^{-1} (NKT), 10 mg.L^{-1} ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) e $23,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (NO_3^-). As eficiências de remoção observadas foram: 68% (DQO), 76% (DBO), 79% (SST), 75% (NKT) e 75% ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$).

3.6 ESTABELECIMENTO DA COMUNIDADE NITRIFICANTE EM BIOFILMES

Diferentes tipos de micro-organismos estão envolvidos na formação do biofilme como bactérias, protozoários, algas, fungos e vermes. Dentre estes as bactérias são as mais importantes, pois decompõe a matéria orgânica presente no esgoto doméstico. Em biofilmes autotróficos, as bactérias nitrificantes aeróbias como *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*

são frequentemente encontradas. Estas possuem baixas taxas de crescimento específico, de cerca de três a cinco vezes menores em relação às bactérias heterotróficas (GRADY & LIM, 1980).

As condições ambientais em termos de carga orgânica aplicada podem ditar a estrutura do biofilme, influenciando a coexistência entre micro-organismos heterotróficos e nitrificantes. Como as bactérias heterotróficas possuem um crescimento mais rápido em relação às nitrificantes elas predominam na parte externa do biofilme sobrepondo os micro-organismos nitrificantes. Os micro-organismos heterotróficos são capazes de utilizar mais oxigênio e espaço do que as nitrificantes, e assim inibir significativamente o suprimento de oxigênio para as camadas mais internas onde predominam os micro-organismos nitrificantes (FIGUEROA & SILVERSTEIN, 1992). A competição entre bactérias heterotróficas e autotróficas tem sido amplamente estudada em função da carga orgânica em FBAS (FDZ-POLANCO *et al.*, 2000). OHASHI *et al.*, (1995) verificaram a diminuição das bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e nitrito oxidantes (NOB) com o aumento da relação C/N, concluindo que as bactérias heterotróficas se tornaram dominantes com o aumento da relação C/N.

Portanto, o estabelecimento da população nitrificante em FBAS depende fortemente da aplicação de menores cargas orgânicas, de forma que a depleção de oxigênio dissolvido ao longo da espessura do biofilme seja minimizada em função do consumo por parte da biomassa (FLORÊNCIO *et al.*, 2009).

No caso do Filtro biológico percolador (FBP) tratando efluentes com maiores cargas orgânicas, os micro-organismos nitrificantes só se estabelecerão nas porções mais baixas, uma vez que o efluente percola através do meio filtrante, reduzindo a concentração de matéria orgânica (DBO). A figura 3.6 mostra, de forma esquemática a abundância de micro-organismos nitrificantes de acordo com a concentração de DBO e amônia em um FBP e um FBAS.

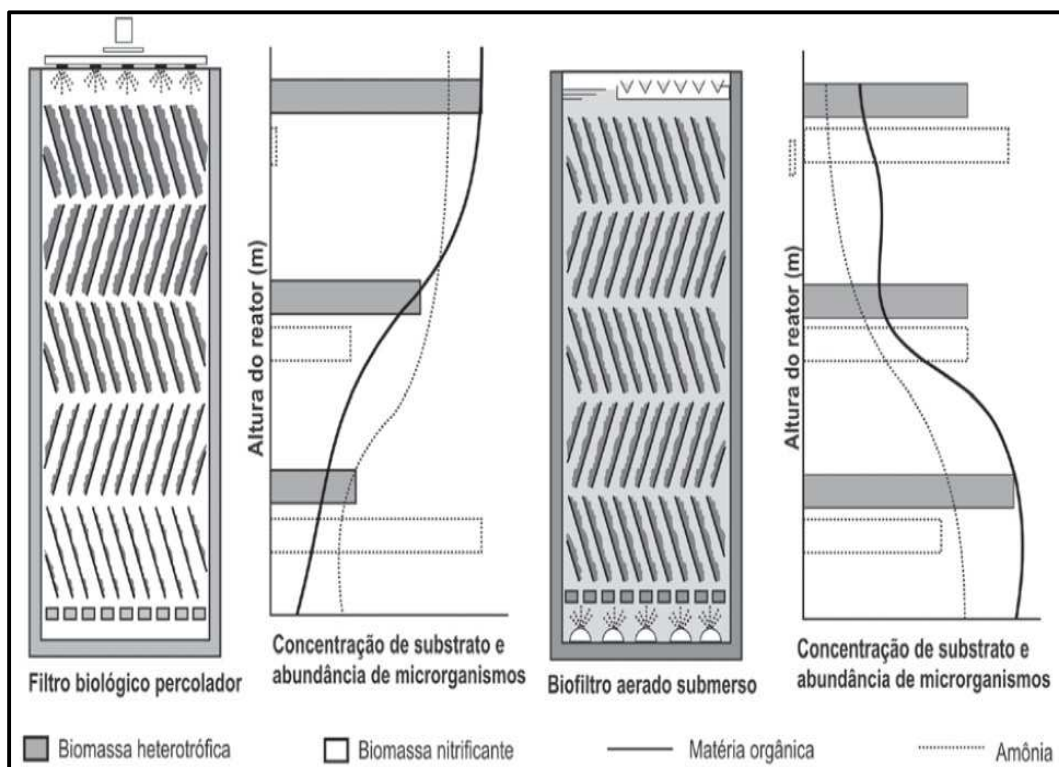


Figura 3.6- Perfil esquemático mostrando a distribuição de micro-organismos heterotróficos e nitrificantes de acordo com a concentração de substrato (Matéria orgânica e amônia) em um Filtro biológico percolador (FBP) e um Filtro biológico aerado submerso (FBAS)

Fonte: Adaptado Florencio *et al.* (2009)

Nota-se, portanto a importância de estudos destes micro-organismos, uma vez que o desempenho dos reatores biológicos de uma estação de tratamento seja de matéria orgânica, nutrientes (Nitrogênio e Fósforo) ou ainda de micro poluentes e patógenos, é de grande importância, uma vez que estes micro-organismos são responsáveis pela utilização desses substratos. (DEZZOTI, 2011).

3.7 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Métodos tradicionais de remoção de nitrogênio das águas residuárias incluem a diluição da água residuária, pré-tratamento, *stripping*, cloração no *breakpoint* e troca iônica (METCALFY & EDDY, 2003). Entretanto, a remoção do nitrogênio por processos biológicos apresenta-se efetiva e com baixos custos, enquanto que o tratamento químico apresenta altos custos, além de produtos químicos adicionados a esta água residuária (EPA, 2009). Esses fatores são os principais responsáveis pela preferência na utilização de processos biológicos para a remoção de nitrogênio.

O nitrogênio existe no ambiente em vários estados de oxidação, principalmente nas formas de nitrogênio orgânico, amônia (NH_3^+), íon amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e nitrogênio gasoso, sendo a amônia e o nitrato responsáveis pelos principais danos ambientais como a toxicidade aos peixes e eutrofização dos corpos d'água, respectivamente.

A amônia existe em solução aquosa, tanto na forma de íon amônio (NH_4^+) como na forma livre, não ionizada (NH_3), segundo a equação abaixo:



Em que:

NH_3^+ : Amônia livre

NH_4^+ : Amônia ionizada

A distribuição relativa assume a seguinte forma em função dos valores de pH:

- ❖ pH < 8 Praticamente toda amônia na forma de NH_4^+
- ❖ pH = 9,5 Aproximadamente 50% NH_3^+ e 50% NH_4^+
- ❖ pH > 11 Praticamente toda amônia na forma de NH_3^+

Assim, pode-se verificar que na faixa usual de pH, próxima à neutralidade, a amônia apresenta-se praticamente na forma ionizada. Na verdade, isto tem grandes consequências ambientais, pois a amônia livre é tóxica aos peixes em baixas concentrações.

A figura 3.7 apresenta os principais mecanismos envolvidos no transporte e conversão da amônia em biofilmes (HELMER-MADHOK *et al.*, 2002).

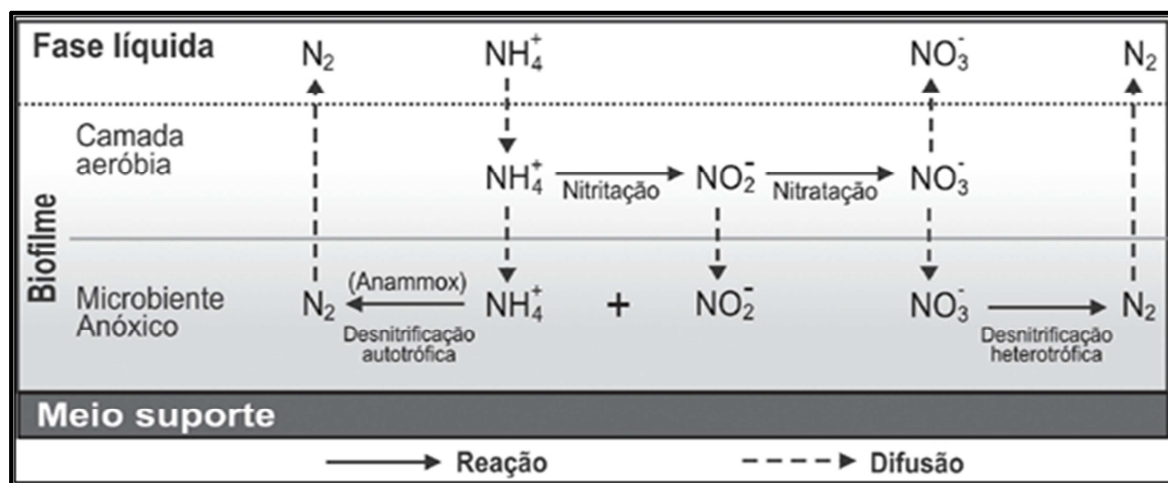


Figura 3.7- Principais mecanismos envolvidos no transporte e conversão de amônia em biofilmes

Fonte: Adaptado de Helmer-Madhok *et al.*, (2002)

3.7.1 Nitrificação

A remoção biológica do nitrogênio nos tratamentos convencionais de águas residuárias, a remoção biológica do nitrogênio é realizada pelo processo de nitrificação, a qual implica na oxidação quimiolitotrófica da amônia a nitrato, sob condições aeróbias estritas, compreendida em duas etapas oxidativas sequenciais: amônia a nitrito (Nitritação) e nitrito a nitrato (Nitratação).

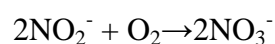
Existem dois grupos de bactérias que realizam a nitrificação. As bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e as bactérias nitrito-oxidadoras (NOB). Dentre os gêneros pertencentes ao grupo responsável pela oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito, estão as *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio* (HAGOPIAN & RILEY, 1998), sendo o gênero *Nitrosomonas* mais encontrado em estações de tratamento de esgoto (SCHMIDT *et al.*, 2005; AHN, 2006).

Enquanto para o grupo responsável pela oxidação do nitrito a nitrato estão os gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina* (HAGOPIGAN *et al.*, 1998), sendo porém o gênero *Nitrobacter* mais importante deste grupo. Embora alguns estudos mostre a presença do gênero *Nitrospira* como representantes deste grupo (JURETSCHKO *et al.*, 1998; GIESEKE *et al.*, 2001; DIONISI *et al.*, 2002).

Conversão do nitrogênio amoniacal (na forma de íon amônio) à nitrito:



Conversão de nitrito a nitrato :



A soma dessas equações resulta na equação global da nitrificação, exposta abaixo:



Analisando as equações do processo de conversão do nitrogênio, observa-se que são requeridos 4,57g O₂/g N oxidado, sendo 3,43 gO₂/gNO₂⁻ oxidado. Porém, quando a síntese é considerada, o montante de O₂ necessário é menor do que 4,57g O₂/g N (METCALFY & EDDY, 2003).

3.7.1.1 Fatores ambientais que interferem no processo de nitrificação

As bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação são sensíveis a determinados fatores ambientais e operacionais, incluindo, temperatura, pH, alcalinidade, oxigênio dissolvido, concentração de nitrogênio amoniacal (NH_4^+), relação carbono/nitrogênio (C/N), metais pesados e entre outros. Todos esses parâmetros tem uma influência direta no processo de nitrificação, afetando a atividade enzimática e a velocidade de crescimento ou, indiretamente, na estrutura do biofilme, velocidade de difusão e solubilidade do oxigênio, diminuindo assim, a eficiência do processo (SURAMPALLI *et al.*, 1997). A tabela 3.2 apresenta um resumo, dos principais parâmetros ambientais que influenciam no processo de nitrificação e as consequentes implicações no processo de conversão da amônia.

Tabela 3.2- Fatores ambientais que interferem no processo de nitrificação

| Fator Interveniente | Implicações Recorrentes |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Concentração de OD | Micro-organismos nitrificantes são estritamente aeróbios e possuem elevada afinidade por oxigênio. Caso o oxigênio não seja suficiente para atender aos requisitos da biomassa heterotrófica e nitrificante a taxa de remoção de amônia decresce em função da competição por oxigênio, predominantemente capturado pela biomassa heterotrófica nas porções externas do biofilme. |
| Requisitos de O ₂ (fase gasosa) para nitrificação: 1,8 mgO ₂ /L para a ocorrência de acúmulo de nitrito: 0,5 mgO ₂ /L. | A baixa disponibilidade de OD exerce maior efeito inibitório sobre oxidadoras de nitrito do que em oxidadoras de amônia, podendo resultar em acúmulo de nitrito no sistema. |
| *não computados os requisitos de O ₂ para a biomassa heterotrófica. | |
| Temperatura | O metabolismo microbiano e a taxa de remoção de amônia podem diminuir em ambientes com temperaturas abaixo de 10 °C. Para filtros biológicos percoladores, com temperaturas abaixo de 10 °C para 20 °C a taxa de nitrificação pode aumentar por um fator de 1,5. |
| Temperatura ótima para a nitrificação: 28-36°C (cultura pura). | |
| Taxas de crescimento específico (μ) variam em função da temperatura. A avaliação dos efeitos da temperatura no tratamento de esgotos apresenta complexidade em virtude de outros fatores intervenientes. | Os efeitos da temperatura podem variar em função da taxa de remoção de amônia: sistemas com elevadas taxas de nitrificação são mais afetados pela temperatura do que sistemas onde a taxa de nitrificação tende a ser menor. Fatores como disponibilidade de oxigênio, predadores, cargas orgânicas podem obscurecer a avaliação do efeito da temperatura em sistemas de tratamento de esgotos. |

Continuação-Tabela 3.2

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Concentrações de matéria orgânica solúvel e particulada. | Para elevadas concentrações de matéria orgânica a nitrificação diminui, pois a biomassa heterotrófica compete com sucesso por oxigênio e espaço, expulsando micro-organismos nitrificantes do biofilme. |
| DBO solúvel acima de 20 mg/L: FBPs apresentam maior dificuldade em produzir nitrato. | Matéria orgânica solúvel: intensifica o crescimento de micro-organismos heterotróficos elevando a espessura do biofilme, o que dificulta a transferência de substrato (N-amoniaco) e oxigênio para porções internas do biofilme. |
| DBO solúvel abaixo de 12 mg/L: favorável para a ocorrência de nitrificação em FBP's. | Matéria orgânica particulada: uma vez depositada na superfície do biofilme pode dificultar a transferência de oxigênio e de substratos solúveis. Posteriormente, a hidrólise do material possibilita a sua absorção favorecendo o incremento da biomassa heterotrófica. |
| Relação DBO/NTK | Maiores relações DBO:NTK favoreceram a predominância da biomassa heterotrófica no biofilme em virtude da maior taxa de crescimento específico e fluxo de síntese observado para esses micro-organismos. Adicionalmente, a síntese da biomassa heterotrófica diminui a concentração de formas reduzidas de nitrogênio como amônia. |
| DBO/NTK=25: pouca disponibilidade de formas reduzidas de nitrogênio para nitrificação | O incremento da predominância de micro-organismos heterotróficos dificulta a transferência de substrato (N-amoniaco e O ₂) não condescendo à coexistência de micro-organismos nitrificantes e heterotróficos no biofilme para elevadas relações DBO/NTK. |
| DBO/NTK=5-10: pode ser favorável ao processo de nitrificação, a depender das condições operacionais impostas. | |
| pH e Alcalinidade | pH: a taxa de nitrificação declina substancialmente para valores abaixo de 6,8. Adicionalmente, baixos valores de pH podem ocasionar a formação de HNO ₂ (inibidor da etapa de nitratação) e aumento da concentração de íons H ⁺ (tóxico para nitrificantes). Alcalinidade: escassez de alcalinidade carbonato no sistema impede a síntese de micro-organismos nitrificantes por déficit de carbono inorgânico. Adicionalmente, a manutenção do pH em faixas adequadas para ocorrência de nitrificação pode ser comprometida. |
| pH ótimo para a nitrificação: em biofilmes:7,5-8,5. | |
| Alcalinidade residual mínima para nitrificação em sistemas com biofilmes:>45 mg/L (observado); 50 mg/L (recomendado). | |
| Compostos orgânicos e inorgânicos | Nitrificantes são sensíveis a vários compostos orgânicos e inorgânicos. Na presença de tais compostos as taxas de nitrificação tendem a diminuir. |
| Sulfetos: 0,5 mg/L | |
| Metais pesados: variável | |
| N-amoniaco: 20 mg/L | Concentrações de N-amoniaco acima de 20 mg/L pode iniciar a inibição de micro-organismos oxidadores de nitrito. |

Fonte: Almeida (2007)

3.7.1.2 Bactérias oxidadoras de amônia (AOB)

A oxidação da amônia (NH_4^+) a nitrito é realizado pelas bactérias amônia-oxidantes (AOB) em duas etapas. Através da enzima amônia monooxigenase (*amoA*) a amônia (NH_4^+) é oxidada a hidroxilamina (NH_2OH). Em seguida a hidroxilamina é oxidada a nitrito (NO_2^-) através da enzima hidroxilamina oxidoreductase (AAKRA, *et al.*, 2001).

O conhecimento das diversas classes que compõe as *Proteobacteria* trouxe uma melhor compreensão da diversidade e composição da comunidade das bactérias AOB nos reatores em biofilme e como consequência surgiu uma diversidade de trabalhos sobre o tema.

MERTOGLU *et al.*, (2005) estudando a composição das bactérias nitrificantes em valas de oxidação e um Biofiltro aerado submerso (BAS) utilizou técnicas de biologia molecular FISH e DGGE sob diferentes condições operacionais. No estudo identificaram através do método FISH no biofiltro, as *Nitrosomonas* como representantes das AOB, enquanto que sua quantidade foi consideravelmente baixa em vala de oxidação.

PERSON *et al.*, (2002) utilizando métodos microbiológicos (FISH) e modelagem matemática investigou a atividade nitrificante em um Filtro biológico percolador (FBP) em diferentes profundidades em uma ETE na Suécia. Conclui que em todas as profundidades estudadas (0.5, 3 e 5 metros) houve predomínio do gênero *Nitrosomonas* no biofilme identificado pela sonda Nsm 156 e NEU.

Vários estudos comprovam que o crescimento das bactérias AOB em suas diferentes linhagens sofre influência de fatores ambientais (pH, Oxigênio dissolvido, temperatura, alcalinidade, etc) mostrado anteriormente na tabela 3.2 e que são fatores de seleção para a composição de espécies de AOB em estações de tratamento (OKABE, *et al.*, 1999; SCHRAMM *et al.*, 1999). No momento a maioria das pesquisas tem se focado no estudo da composição da comunidade de AOB em sistemas de lodos ativados (PARK & NOGUEIRA, 2004; DAIMS *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 1993), havendo um crescimento de pesquisas em reatores de biofilmes (OKABE *et al.*, 1999; AOI *et al.*, 2001; FU *et al.*, 2010).

3.7.1.3 Bactérias oxidadoras de nitrito (NOB)

Outra etapa importante da nitrificação é a oxidação do nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-) que é catalisada pela enzima nitrito oxidoreductase (KIRSTEN *et al.*, 1993) realizada por bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) a qual pertencem ao gênero *Proteobactéria* representado pelas classes α -*Proteobacteria* (*Nitrobacter*), γ -*Proteobacteria* (*Nitrococcus*) e δ -*Proteobacteria* (*Nitrospira* e *Nitrospina*) (KOOPS & POMMERENING-ROSER, 2001). Em estudos com a aplicação de métodos moleculares revelam que o gênero *Nitrospira* está presente na maioria das estações de tratamento de esgoto (ETE's) e não a *Nitrobacter* como representantes das NOB (JURETSCHKO *et al.*, 1998; GIESEKE *et al.*, 2001; DIONISI *et al.*, 2002). O predomínio do gênero *Nitrospira* é considerado um reflexo das diferentes condições ambientais impostas no sistema para as NOB.

MISSAGIA (2010) afirma que há dois tipos de estratégias para vencer a competição entre dois grupos de micro-organismos pelo mesmo substrato e que são destacados em ecologia microbiana: K-estratégia (alta afinidade pelo substrato em baixas concentrações do mesmo) e r-estratégia (altas taxas de crescimento máximo específico e de utilização de substrato em altas concentrações deste). SCHRAMM *et al.*, (2000) combinando resultados da técnica FISH e de análises físico-químicas em reatores de biofilme em escala de laboratório, concluíram que a *Nitrobacter sp.* mostrou uma preferência por uma alta concentração de oxigênio e nitrito, sendo portanto uma r-estrategista, enquanto a *Nitrospira sp.* é considerada uma K-estrategista.

3.7.2 Desnitrificação

As tecnologias utilizadas para a remoção de amônia ou nitrogênio amoniacal devem prever sua completa oxidação até sua forma de nitrogênio gasoso (N_2). Hoje em dias muitas propostas visam à redução do nitrogênio amoniacal até a forma nitrato (NO_3^-). No entanto a presença de nitratos em corpos receptores onde há captação de água para consumo humano pode ser prejudicial à saúde da população, visto que este composto causa a metemoglobinemia (síndrome do “bebe azul”) (GALVEZ *et al.*, 2003). Neste processo, o NO_3^- é convertido a NO_2^- por bactérias redutoras presentes no intestino, que reagem com a hemoglobina na corrente sanguínea convertendo-a em metemoglobinemia. Como

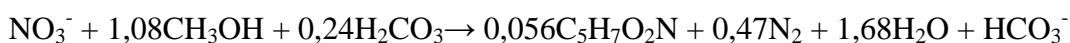
consequência, o transporte de oxigênio ao longo do sistema circulatório é interrompido causando a morte a longo prazo.

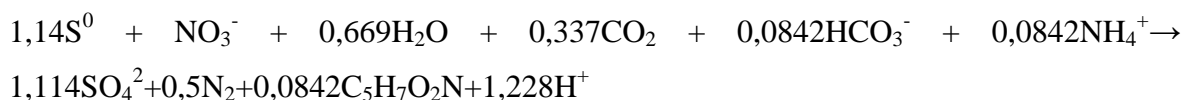
As áreas rurais são mais susceptíveis a contaminação por nitrato, visto pela alta atividade agrícola por meio da utilização de fertilizantes à base de nitrogênio, vindo a contaminar os reservatórios de águas subterrâneas (ASLAN & CAKICI, 2007).

Para se ter uma ideia da preocupação com o nitrato as autoridades governamentais através das legislações ambientais pertinentes adotam padrões rígidos de lançamento. A União Européia adota concentração de $11,3 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$, pois de acordo com estudos esta concentração está relacionada a ocorrência de casos de metemoglobinemia infantil (HISCOCK *et al*, 1991 *apud* IANAMOTO, 2006). No Brasil não existe padrão de lançamento para nitrato, ficando apenas como padrão de qualidade (CONAMA nº 357/2005) e padrão de potabilidade (BRASIL, 2004).

Em processos de tratamento de águas residuárias urbanas e industriais, a desnitrificação é um processo biológico da redução do nitrato ou nitrito à nitrogênio gasoso (N_2) (EPA, 2009).

Os compostos de nitrogênio oxidado (NO_3^- e NO_2^-) são reduzidos a nitrogênio gasoso (N_2) por bactérias heterotróficas que utilizam o nitrito e/ou nitrato como aceptores de elétrons e matéria orgânica como fonte de energia. As bactérias desnitrificantes que são capazes de realizar a desnitrificação são os seguintes gêneros: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Nesseria*, *Paracoccus*, *Propionibacteria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* and *Vibrio* (AHN *et al.*, 2006; METCALFY & EDDY, 2003). Contudo, a produção de nitrogênio gasoso (N_2) a partir de compostos inorgânicos de nitrogênio pode também ser desempenhada por microrganismos desnitrificantes autotróficos como, por exemplo, a *Thiobacillus denitrificans* que utilizam compostos reduzidos de enxofre como doador de elétrons (KOENIG e LIU, 2001). Neste caso, a fonte de energia vem de reações inorgânicas de oxidação-redução, tendo elementos como hidrogênio ou compostos reduzidos de enxofre (HS^- , H_2S , S , S_2SO_3^-) etc.) como doadores de elétrons, nitrato comoceptor de elétrons e compostos de carbono inorgânico (CO_2 ou HCO_3^-) como fonte de carbono (AHN, 2006).





A desnitrificação é uma reação importante no tratamento de esgotos, pois a remoção biológica do nitrogênio melhora a qualidade do efluente do sistema de tratamento de águas residuárias, eliminando um agente causador da eutrofização dos corpos receptores.

3.8. BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA NA DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Durante anos os estudos dos micro-organismos dos diversos ambientes foram limitados exclusivamente a técnicas microscópicas convencionais de enriquecimento e cultivo. Atualmente os microbiologistas reconhecem que apenas uma fração das bactérias que ocorrem naturalmente foi até agora isolada e caracterizada (GIOVANNONI *et al.*, 1990). Os meios de cultura são incapazes de mimetizar as condições naturais de seu hábitat natural para sua proliferação que segundo AMANN *et al.* (1995) aproximadamente 99% dos microrganismos não podem ser isolados de seus hábitats em culturas puras.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular com base na análise de ácidos nucleicos (DNA e RNA) permitiu o estudo da diversidade microbiana em um nível diferente, o nível genético. Estas técnicas podem responder sobre a real diversidade dos micro-organismos presentes em diversas amostras ambientais. Estes são detectados e enumerados através da análise de gene.

O uso das técnicas moleculares se baseia na aplicação de biomarcadores, que são moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e outras regiões variáveis. Um biomarcador comumente utilizado é a molécula de RNA ribossomal (RNAr). Esta molécula é parte integrante do ribossomo, uma estrutura celular responsável pela síntese de proteica que está presente em todas as células e, portanto, considerada um biomarcador ideal.

De acordo com FOX *et al.*, (1977) esta molécula por ser altamente conservada em termos evolutivos, com regiões variáveis, a sequência de RNAr 16S é considerada a “impressão digital” de um organismo. A análise do gene RNAr 16S é a mais utilizada para o estudo filogenético de micro-organismos pois este gene está presente em todas as células vivas.

Este permite a comparação entre organismos de diferentes grupos do mesmo domínio (SANZ & KOCHLING, 2007). WOESE & FOX (1977) analisaram o gene RNAr 16S e classificaram os seres vivos em três domínios: (i) Eubactéria, compreendendo todas as bactérias típicas; (ii) Archeobactéria, contendo as bactérias metanogênicas e os (iii) Eucariontes, representado pelos Reinos Animal, Plantae, Fungos, Ciliados e Flagelados.

Segundo OLSEN *et al.*, (1986) são várias as razões para a utilização RNAr 16S como marcas biológicas da evolução: (i) são elementos-chave na síntese de proteínas e evolutivamente homólogos em todos os organismos; (ii) contêm informação suficiente, para permitir comparações significativas e satisfatórias; (iii) toda a estrutura do rRNA é conservada sendo a taxa de mutação durante a evolução relativamente baixa, comparando com outros genes.

Um dos grandes desafios encontrado atualmente é a relação da presença de certas bactérias com a sua atividade no ecossistema, pois se tem tentado desenvolver metodologias que tendem combinar a detecção de grupos de micro-organismos e sua atividade *in situ*. A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é um exemplo destes métodos que tem sido utilizado para o estudo das bactérias nitrificantes para verificar o comportamento no processo de nitrificação em reatores biológicos.

3.8.1 Técnica FISH

A técnica FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) utilizando sondas de oligonucleotídeos permite uma rápida detecção de células microbianas individuais em seus ambientes naturais sem a necessidade de cultivo (AMMAN *et al.*, 2001).

Segundo AOI (2001) esta técnica é altamente eficaz para detectar bactérias específicas e analisar a organização espacial da comunidade microbiana utilizando marcadores filogenéticos RNAr 16S, a qual representam um alvo ideal para hibridização *in situ* com sondas de oligonucleotídeos devido: (i) estar presente em todos os organismos, (ii) possuir um grande número de sequências de diferentes organismos que são armazenadas em um banco de dados (*Ribosomal Data Bank Project*), (iii) possuir um alto número de cópias por célula aumenta a sensibilidade de detecção e permite a detecção direta de uma única célula. Esta técnica detecta através do RNAr 16S das células-alvo presentes na amostra

híbrida com uma sonda de sequência complementar marcada com o campo fluorescente, que permite a visualização direta da amostra hibridada em um microscópio de fluorescência ou em um microscópio confocal a laser (AMANN *et al.*, 1990;1995).

O protocolo FISH consiste basicamente em quatro etapas que são: (i) a fixação da amostra; (ii) montagem da lâmina; (iii) a hibridização com a sonda específica; (iv) a coloração com DAPI e a observação através da microscopia de fluorescência.

A fixação da amostra tem como objetivo fixar as células da amostra no momento em que foram coletadas. Geralmente um tampão de fixação é aplicado baseado em aldeídos ou álcoois (AMANN *et al.*, 1997). Entretanto na maioria dos protocolos utiliza-se o paraformaldeído, este cria poros na membrana celular e mantém a integridade da célula (especialmente a quantidade de ribossomos) facilitando a entrada da sonda, e com isso ao fixar a célula esta se manterá intacta.

A fixação é uma etapa importante da técnica, pois na fase de hibridação as células são expostas a altas temperaturas e diferentes concentrações de formamida, com isso pode modificar a integridade das células.

A montagem da lâmina consiste em fixar as células na lâmina de vidro e em seguida desidratada com etanol em diferentes concentrações. Logo após as células são hibridizadas aplicando a sonda em conjunto com o tampão de hibridação, em seguida a lâmina é incubada em câmara úmida escura, já que a sonda é sensível à luz. Na verdade esta etapa consiste na entrada da sonda na célula e na ligação desta a uma porção do RNAr alvo que tenha uma sequência complementar a sua.

Hibridizada a célula ela segue para coloração com DAPI (4,6-diamidino-2-phenilindol), um corante específico para células de DNA que cora todas as células, sem especificidade. Na última etapa a lâmina é visualizada em microscópio de epifluorescência, onde é possível observar os micro-organismos alvo do ensaio (quando se utiliza um filtro específico para a sonda, fazendo a contagem das células hibridizadas) ou observar todos os micro-organismos da amostra (utilizando filtro específico para o corante DAPI para a contagem total das células). A figura 3.8 apresenta um esquema de todas as etapas da técnica FISH.

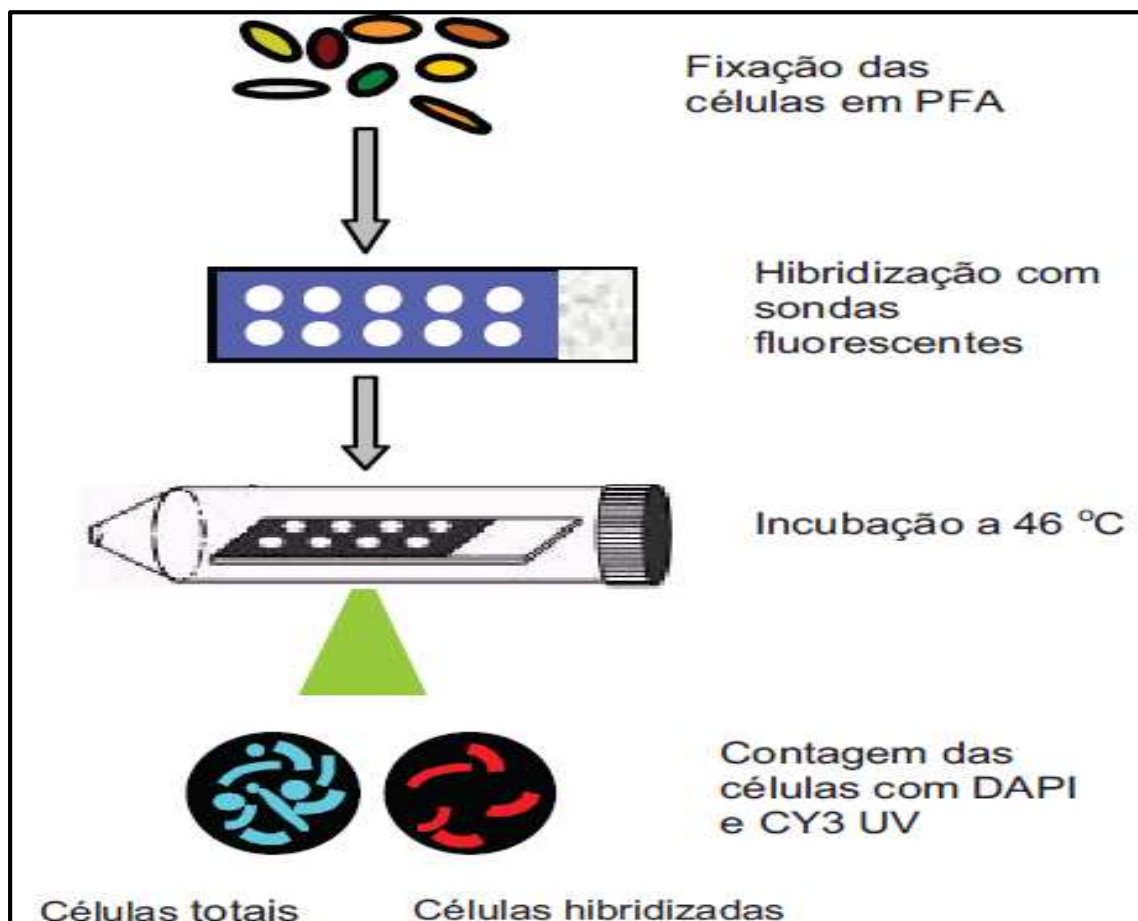


Figura 3.8- Representação esquemática da técnica FISH
(Fonte: KIELING, 2004)

3.8.2 Aplicação da técnica FISH em estudos para a caracterização da população nitrificante em sistemas de tratamento de águas residuárias

AOI *et al.*, (2000) investigaram a ecologia microbiana das bactérias nitrificantes e heterotróficas utilizando a ferramenta FISH em três tipos de reatores nitrificantes: 1) biofilmes de um reator de leito fluidizado rico em amônia e ausente de compostos orgânicos; 2-) lodos ativados (em virtude da não formação do biofilme) cujo afluente era inorgânico; 3-) biofilme de outro reator de leito fluidizado com alta concentração de matéria orgânica e rica em amônia.

Os autores verificaram que as bactérias nitrificantes exibiram diferentes comportamentos em distintas condições operacionais impostas, principalmente no que se refere à composição e a concentração de substrato. Como resultado as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) foram predominantes em águas residuárias inorgânicas ricas em amônia.

Enquanto que em efluentes com caráter orgânico e inorgânico as AOB se distribuíram em diferentes posições do biofilme. As amostras do biofilme do reator 1 mostraram a presença de bactérias do gênero *Nitrosomonas*, em conjunto com as *Nitrosococcus mobilis*. No reator 2, foram detectados membros como *Nitrospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis* e *Nitrosolobus multiformis* enquanto o gênero *Nitrosomonas* (juntamente com *Nitrosococcus mobilis*) não foram encontrados, fato este que pode ser explicado pela baixa carga de amônia aplicada ($0,3 \text{ kg N-NH}_4^+ \text{-N/m}^3 \cdot \text{dia}$) pelo qual favorece o crescimento destas espécies.

O reator 3 alimentado com efluente orgânico e rico em amônia foi detectada a presença de bactérias heterotróficas, as quais ocuparam a parte externa do biofilme cuja espessura era de aproximadamente $100 \mu\text{m}$, enquanto as AOB ficaram localizadas na parte interna do biofilme. De acordo com os pesquisadores as bactérias oxidadoras de amônia e as bactérias heterotróficas se localizam em diferentes posições do biofilme quando os substratos contêm alta concentração de amônia e compostos orgânicos, pois elas competem por uma boa posição no biofilme. As heterotróficas possuem uma alta taxa de crescimento que as nitrificantes e a princípio ocuparão a parte externa do biofilme quando a concentração de oxigênio dissolvido e substrato são suficientemente altas para o seu crescimento, enquanto as bactérias oxidadoras de amônia pela sua baixa taxa de crescimento ocuparão a parte interna do biofilme. As bactérias encontradas neste reator foram as *Nitrosomonas* (junto com a *Nitrosolobus mobilis*) similarmente ao reator 1.

OKABE *et al*, (1999) investigaram a organização espacial *in situ* de bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e oxidadoras de nitrito (NOB) em dois biofilmes formados em reatores de discos rotativos: 1-) biofilme nitrificante autotrófico e biofilme alimentado com esgoto doméstico por meio do uso de microsensores e pela técnica FISH. O estudo através desta técnica revelou que as bactérias do gênero *Nitrosomonas* foram numericamente maiores e dominantes representantes das AOB. Entretanto, bactérias pertencendo ao gênero *Nitrobacter* não foram detectadas. Porém o gênero *Nitrospira* representando as NOB foram encontradas em ambos os biofilmes, localizando-se principalmente na parte intermediária dos mesmos. Os pesquisadores também constaram por meio de medições com microelétrodos que a zona ativa de oxidação da amônia esteve localizada na parte externa do biofilme, enquanto a zona ativa de oxidação do nitrito esteve localizada logo abaixo da zona de oxidação da amônia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estação de Tratamento de Esgoto ETE 2

A Estação de Tratamento de Esgotos (ETE 2) está localizada no município de Marialva-PR, administrada pela Companhia de Saneamento do Estado do Paraná (SANEPAR).

De acordo com Bolzani (2011) a ETE 2 fica localizada na confluência dos ribeirões Pinguim e Borba Gato, não havendo nenhum tipo de ocupação urbana nas suas circunvizinhanças, dividindo espaço, em sua maioria com pequenas e médias propriedades rurais. O ano de início de operação da ETE 2 foi em 2006 onde recebe contribuições de efluentes domésticos e industriais previamente tratados da região sul de Maringá-PR.

O tratamento biológico é realizado por meio de oito RALF's circulares (Figura 4.1A) com tubulações para a descarga do lodo; o pós-tratamento desses reatores é realizado por 2 filtros biológicos percoladores (FBP), com distribuidor rotativo hidráulico utilizando como meio suporte, pedra brita nº 4 (Figura 4.1B) seguido por 2 decantadores circulares à gravidade (Figura 4.1C), e; uma câmara de contato (Figura 4.1D) com a finalidade de realizar a desinfecção do efluente final, porém atualmente está desativada.

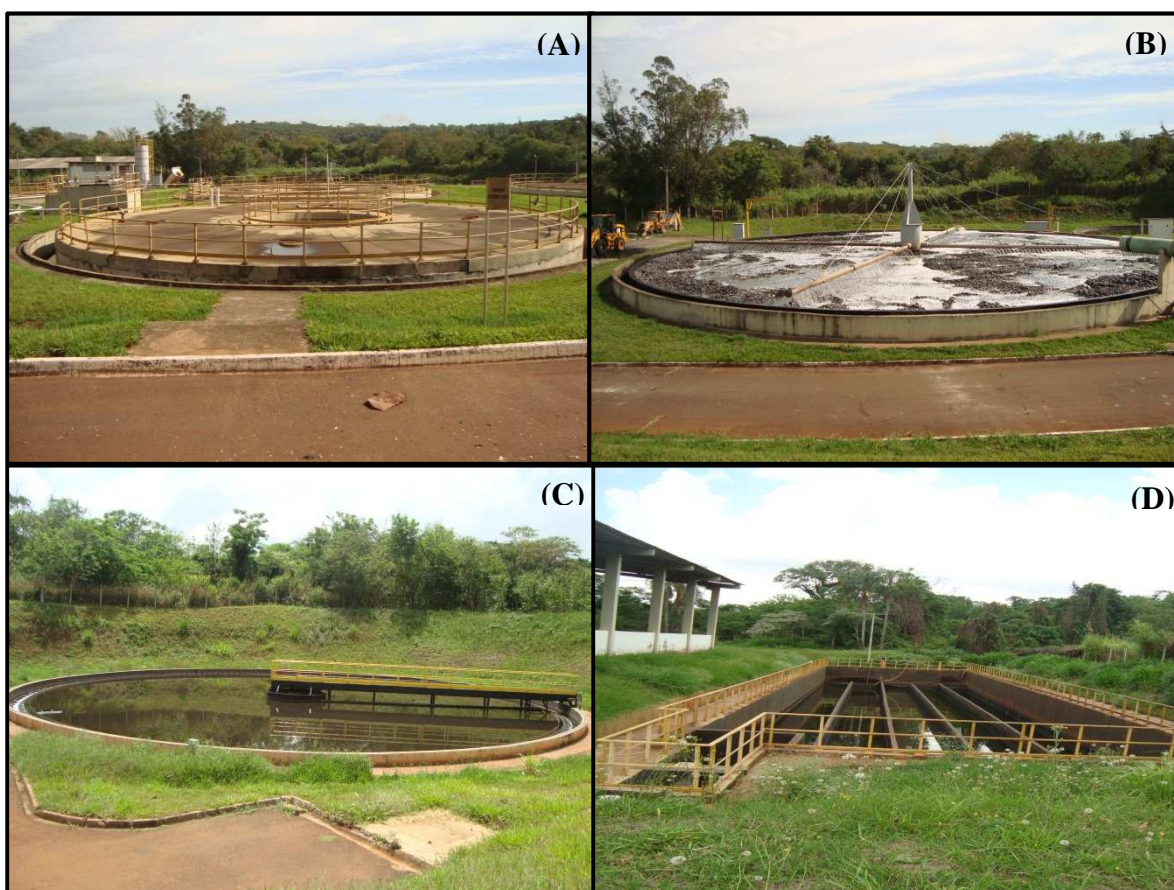


Figura 4.1- Tratamento do lodo: (A) Adensador; (B) Centrífuga de alta rotação e (C) Pátio de cura

O tratamento do lodo é composto por um adensador circular (Figura 4.2A), desidratação mecânica por meio de uma centrífuga de alta rotação (Figura 4.2B) e um pátio de cura coberto (Figura 4.2C) com aplicação manual de cal para desinfecção e estabilização e posterior utilização final na agricultura.



Figura 4.2- Tratamento do lodo: (A) Adensador; (B) Centrífuga de alta rotação e (C) Pátio de cura

4.2 Planta Piloto

A planta piloto foi instalada logo após a caixa de inspeção que recebe efluente dos reatores RALF. A figura 4.3 indica o local onde foi instalada a planta piloto.



Figura 4.3- Localização da planta piloto na ETE

Na figura 4.4A ilustra-se o FBAS utilizado seguido do decantador secundário (Figura 4.4B). O material de enchimento utilizado foi Tampas PET cortadas ao meio (Figura 4.4C).



Figura 4.4- Planta Piloto: (A) Filtro biológico aerado submerso; (B) Decantador secundário e (C) Material de Enchimento
Fonte: O Autor (2011)

O Quadro 4.1 e 4.2 apresenta as principais características do FBAS e do material suporte, respectivamente. O Quadro 4.3, mostra as condições operacionais utilizadas na operação do FBAS.

Quadro 4.1- Principais características do Filtro Biológico Aerado Submerso

| Características | FBAS | Decantador Secundário |
|--------------------------|-------------|------------------------------|
| Formato | Prismático | Circular |
| Material | Acrílico | Aço |
| Largura (m) | 0,32 | – |
| Altura Total (m) | 2,00 | 2,32 |
| Altura Útil (m) | 1,86 | – |
| Volume (m ³) | 0,58 | 1,56 |
| Diâmetro (m) | – | 1,00 |

Fonte: Belloni (2011)

Quadro 4.2- Principais características do material de enchimento

| Características | Material de Enchimento |
|---------------------------------------------------------------|------------------------|
| | Tampa PET |
| Índice de Vazios (%) | 75,89 |
| Área superficial específica (m ² /m ³) | 252,97 |

Fonte: Belloni (2011)

Quadro 4.3- Condições operacionais utilizadas na operação do FBAS

| Condições Operacionais | Filtro Biológico Aerado Submerso | | |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | Etapa | | |
| | 1 | 2 | 3 |
| Período de Desenvolvimento da Fase Operacional | Outubro a Novembro de 2011 | Novembro a Fevereiro de 2012 | Fevereiro a Abril de 2012 |
| Vazão de Alimentação (m ³ .h ⁻¹) | 0,5 | 0,2 | 0,2 |
| Vazão de Recirculação (m ³ .h ⁻¹) | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| Recirculação/Alimentação | 0,2 | 0,5 | 1 |
| Duração (Dias) | 45 | 60 | 45 |

A alimentação do FBAS foi feita através da base do filtro, onde um reservatório de 500 L (Figura 4.5A) foi inserida sendo alimentada por uma mangueira pelo método de sifonamento (Figura 4.5B) colocada na caixa de inspeção. Em seguida uma bomba do modelo Hydrobloc P500 (Figura 4.5C) foi instalada com a finalidade de recalcar o efluente RALF para a unidade experimental.

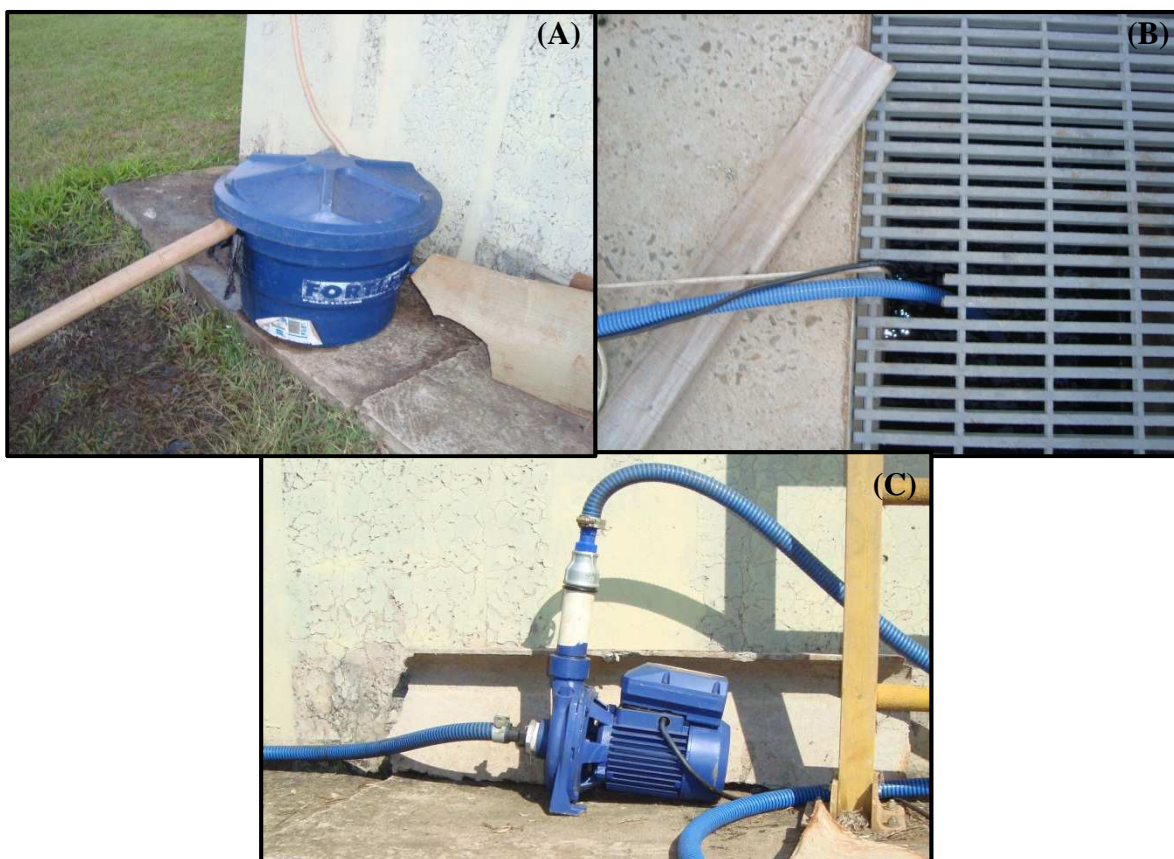


Figura 4.5- Sistema de alimentação da unidade experimental. (A) Reservatório; (B) Mangueira responsável pelo sifonamento e (C) Bomba hidráulica

Logo na entrada foi adaptado um registro de 50 mm (Figura 4.6A) para o controle da vazão da entrada, seguindo por uma tubulação de 50 mm até a entrada do reator. A saída do efluente é garantida por dois orifícios (Figura 4.6B) situada na parte superior oposta à entrada do reator, onde estão instalados tubulações de 50 mm cada que segue por gravidade até o decantador.

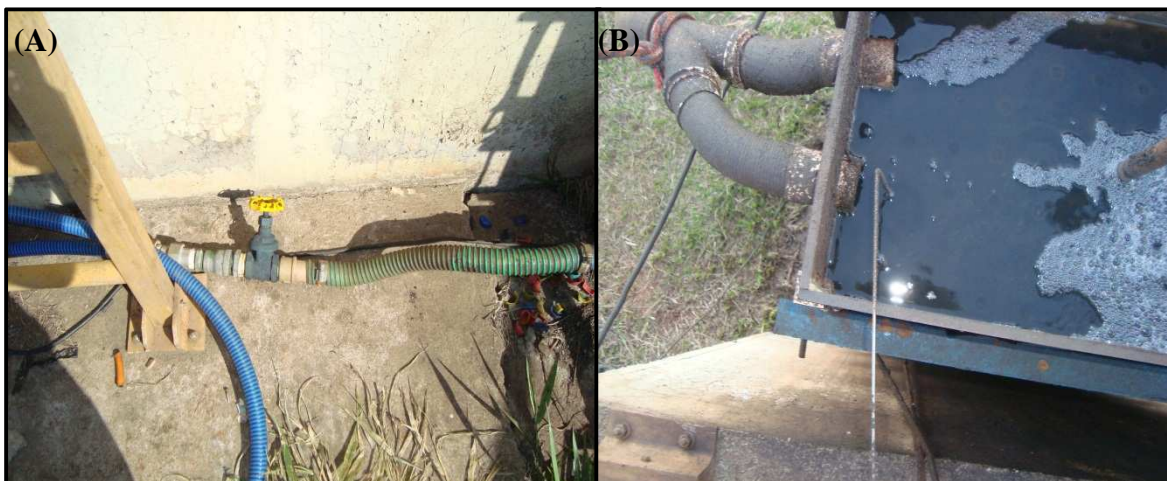


Figura 4.6- Sistema de entrada e saída do reator. (A) Registro de entrada para o controle da vazão; (B) Tubulações de saída do efluente

A alimentação do decantador é feita pelo efluente do FBAS e dá-se pela parte superior do decantador, onde uma tubulação fixa no centro do decantador garante a inserção do efluente 60 cm abaixo da lâmina do líquido. A saída do efluente é garantida por 10 orifícios de 1" feitos diametralmente na parte superior da parede da unidade que escoam o líquido para uma canaleta externa instalada em toda a circunferência do decantador.

Para evitar a colmatação do lodo nas paredes do decantador, foi instalado um sistema de raspagem constituído por cantoneiras de 1" com borrachas adaptadas, assim o atrito da borracha na parede não danifica a sua pintura. A movimentação do raspador é realizada por um motor de $\frac{1}{2}$ CV de potência, onde foi instalado um quadro de comando com inversor de frequência, assim acoplado a um eixo central interligado com as cantoneiras pode-se determinar a velocidade no giro das mesmas.

A recirculação é feita na base do decantador, em sua saída foi instalada uma tubulação de 75 mm onde foi adaptado um registro tipo esfera para amostragem, em seguida foi instalada uma bomba modelo KSB Hydrobloc P500T (Figura 4.7A) para o recalque do lodo de recirculação até base do reator. Para o controle da vazão foi instalado um registro de 50 mm para o controle da recirculação (Figura 4.7B).



Figura 4.7- Sistema de recirculação da unidade experimental. (A) Bomba hidráulica responsável pelo recalque do lodo até a entrada do sistema; (B) Registro para o controle da vazão

O suprimento de ar é fornecido por um compressor (Figura 4.8A). A distribuição do ar no interior é realizado através de um sistema constituído por dois tubos de PVC de $\frac{1}{2}$ " (Figura 4.8B) perfurados diametralmente com orifícios de 2 mm de diâmetro a cada 10 cm, instalados verticalmente ao longo do reator.



Figura 4.8- Sistema de distribuição de ar. (A) Compressor; (B) Distribuição do ar com registro para o controle da vazão

4.3. Coleta das amostras

As coletas foram do tipo compostas durante o período em que a estação apresentava maior vazão, no horário compreendido entre as 10 e 17 horas sendo feitas em intervalos de 2 em 2 horas respeitando o tempo de detenção hidráulica (TDH) da planta piloto em 4 pontos diferentes, conforme apresentado no quadro 4.4:

Quadro 4.4- Descrição dos pontos de amostragem

| Pontos de amostragem | Descrição |
|-----------------------------|-----------------------------------------|
| 1 | Esgoto bruto (efluente do desarenador) |
| 2 | Efluente do RALF (afluente do FBAS) |
| 3 | Efluente do FBAS |
| 4 | Efluente final (Decantador secundário) |

As amostras coletadas eram imediatamente levadas ao laboratório para a realização das análises físico-químicas.

4.4 Monitoramento físico-químico do sistema

O monitoramento físico-químico foi realizado com o objetivo de acompanhar o desempenho da planta piloto, quanto à remoção de DQO e nitrogênio e de correlacionar esses resultados com a comunidade microbiana presente no sistema.

Na tabela 4.1, está apresentada a programação geral das análises físico-químicas realizadas para monitorar o sistema. Essas análises e determinações físico-químicas foram realizadas segundo os procedimentos do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), no Laboratório Descentralizado da Unidade Regional de Maringá da ETE 2 mantida pela SANEPAR.

Tabela 4.1- Parâmetros analisados, pontos de amostragem, frequência e métodos utilizados

| Parâmetro | Pontos de amostragem | Frequência | Método |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------|
| pH | 1, 2, 4 | 2x semana | Potenciométrico |
| Alcalinidade | 2, 3, 4 | 2x semana | Titulométrico |
| Oxigênio Dissolvido (OD)* | 3 | 2x semana | Potenciométrico |
| Sólidos Suspensos Totais (SST) | 1, 2, 3, 4 | 2x semana | Gravimétrico |
| DQO Total | 1, 2 | 2x semana | Espectrofotométrico |
| DQO Filtrada | 1, 2 e 3 | 2x semana | Espectrofotométrico |
| DBO Total | 1, 2, 3, 4 | semanal | Eletrométrico |
| DBO Filtrada | 1 e 2 | semanal | Eletrométrico |
| N-amoniacal | 2, 4 | 2x semana | Espectrofotométrico |
| Nitrato | 4 | 2x semana | Espectrofotométrico |
| Nitrito | 2, 4 | 2x semana | Espectrofotométrico |

*A leitura do oxigênio dissolvido começou a ser feita a partir da Etapa 2 do trabalho, devido a manutenção do aparelho.

4.5 Monitoramento microbiológico do sistema

Foram realizadas 3 coletas dos materiais suporte do biofilme (Figura 4.9A) e do lodo de recirculação (Figura 4.9B) para análises microbiológicas para cada uma das etapas propostas. Na 1ª etapa foi coletado quando o FBAS estava em seu 34º dia de operação (COV: 1,29 kgDBO.m⁻³.dia⁻¹). A segunda coleta referente à 2ª Etapa foi realizada no dia 107º dia de operação (COV: 0,40 kgDBO.m⁻³.dia⁻¹). A 3ª Etapa a coleta foi feita no dia 121º dia de operação (COV: 0,19 kgDBO.m⁻³.dia⁻¹). Estas cargas foram obtidas na parte superior do reator, diferentemente das cargas aplicadas na entrada do reator, visto que a maior parte da matéria orgânica foi oxidada e, portanto, nesta parte do reator foi considerada uma zona com um maior número de micro-organismo nitrificantes.



Figura 4.9- Pontos de coleta para análises microbiológicas. (A) Abertura na parte superior do reator; (B) Registro para a coleta do lodo de recirculação

As amostras dos materiais suportes (Figura 4.10A) e lodo de recirculação (Figura 4.10B) coletadas foram adicionadas a frascos plásticos de 500 mL estéreis e transportadas em isopor com gelo para o Laboratório de microbiologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

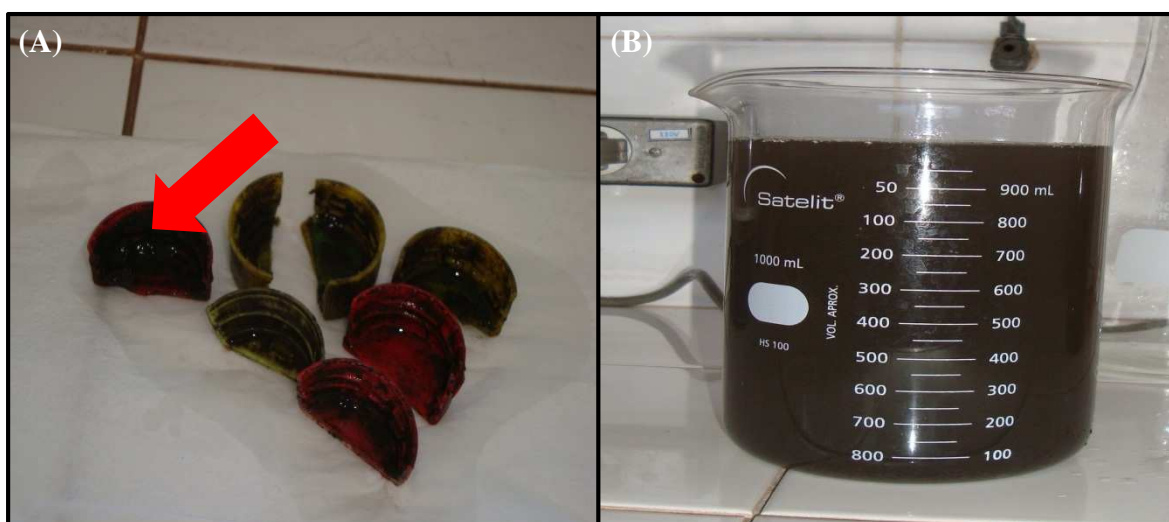


Figura 4.10-(A) Biofilme aderido à tampa PET; (B) Lodo de recirculação.

A cada amostra foram adicionadas 100 mL de tampão fosfato PBS 1X. A amostra com o biofilme foi extraído por meio de agitação manual por aproximadamente 2 minutos e a biomassa que não desprendeu do biofilme foi retirado com uma espátula estéril.

Fixação das amostras

Foram fixadas 375 uL em 1125 uL de solução de paraformaldeído 4% segundo protocolo de AMANN *et al.* (1990). Em seguida as amostras foram lavadas duas vezes com 1000 µL de PBS 1X (centrifugado a 7600 rpm por 5 minutos) e ressuspensas em 500 µL PBS 1X+500 µL de etanol 100 % e armazenadas a -20° C para análises de hibridação *in situ*.

Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH)

As amostras fixadas foram aplicadas na superfície das lâminas de teflon contendo 10 pocinhos de 8 mm de diâmetro (*Tekdon*). As sondas utilizadas foram específicas de bactérias nitrificantes, conforme descritas na Tabela 4.3. A sonda NON 338 é utilizada como controle negativo, uma vez que ela não é complementar a nenhuma área da região alvo. Nesse caso, ao aplicar a sonda e na visualização microscópica houver emissão de brilho, considera-se como falso-positivo.

As especificidades das sondas utilizadas foram compatíveis com as sequências depositadas na página web Probase (<http://www.microbial-ecology.net/probase/default.asp?mode=search>).

As etapas do protocolo utilizado estão descritas a seguir:

1. Aplicado 8-10 µL da amostra no pocinho e incubado em estufa a 46° C durante 15-20 minutos;
2. Desidratado as células aderidas à lâmina por imersão serial em etanol 50, 80 e 100% (3 minutos cada) e deixado secar;
3. Adicionado 8-9 µL de tampão de hibridização contendo a quantidade de formamida específica para cada sonda (concentração 50 ng/µL) e 1 µL da sonda (adicionado os competidores, se for o caso);
4. Incubado a amostra durante 2 horas a 46° C;

Quadro 4.5- Sondas e condições de hibridação utilizadas para FISH

| Sondas | Sequências (5'→3') | Especificidades | *FA (%) | NaCl (nM) | Referência |
|-----------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|------------------------------|
| EUB338 | GCT GCC TCC CGT AGG AGT | Bacteria | 20 | 22,5 | Amann <i>et al.</i> (1990) |
| NON338 | ACT CCT ACG GGA GGC AGC | Controle Negativo | 20 | 22,5 | Schramm <i>et al.</i> (1996) |
| NSO190 | CGA TCC CCT GCT TTT CTC C | Bactérias oxidantes de amônia da subclasse beta- Proteobactéria | 55 | 20 | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Nsm156 | TATTAGCAACATCTTT CGAT | <i>Nitrosomonas</i> <i>spp.</i> <i>Nitrosococcus</i> <i>mobilis</i> | 5 | 80 | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Ntspa662 | GGAATTCCGCTCTCCT C T | <i>Nitrospira</i> | 35 | 80 | Daims <i>et al.</i> (2000) |
| CNtspa662 | GGAATTCCGCTCTCCT C T | Competidor para Ntspa662 | – | – | Daims <i>et al.</i> (2000) |
| NIT3 | CCT GTG CTC CAT GCT CCG | <i>Nitrobacter sp</i> | 40 | 56 | Wagner <i>et al.</i> (1994) |
| CNIT3 | CCT GTG CTC CAT GCT CCG | Competidor NIT3 | – | – | Wagner <i>et al.</i> (1994) |

5. Aplicado 8-10 µL da amostra no pocinho e incubado em estufa a 46° C durante 15-20 minutos;
6. Desidratado as células aderidas à lâmina por imersão serial em etanol 50, 80 e 100% (3 minutos cada) e deixado secar;
7. Adicionado 8-9 µL de tampão de hibridização contendo a quantidade de formamida específica para cada sonda (concentração 50 ng/µL) e 1 µL da sonda (adicionado os competidores, se for o caso);
8. Incubado a amostra durante 2 horas a 46° C;

9. Imergido a lâmina em tampão de lavagem a 48° C por 15 minutos, em banho-maria. Deixado secar em temperatura ambiente, no escuro;
10. Adicionado 4 µL DAPI na concentração 1 mg/mL (4',6 -diamidino-2-fenilindol) por 4 minutos. Lavado com água Mili-Q. Deixado secar no escuro;
11. Aplicado sobre cada pocinho 8 µL de solução com 80% glicerol e 20% PBS 1X, sem espalhar;
12. Colocado lamínula grande por cima dos pocinhos;
13. Guardado as lâminas no escuro e sob refrigeração a 4°C até a observação ao microscópio.

A figura 4.11 mostra uma representação esquemática de toda a metodologia utilizada para a técnica FISH.

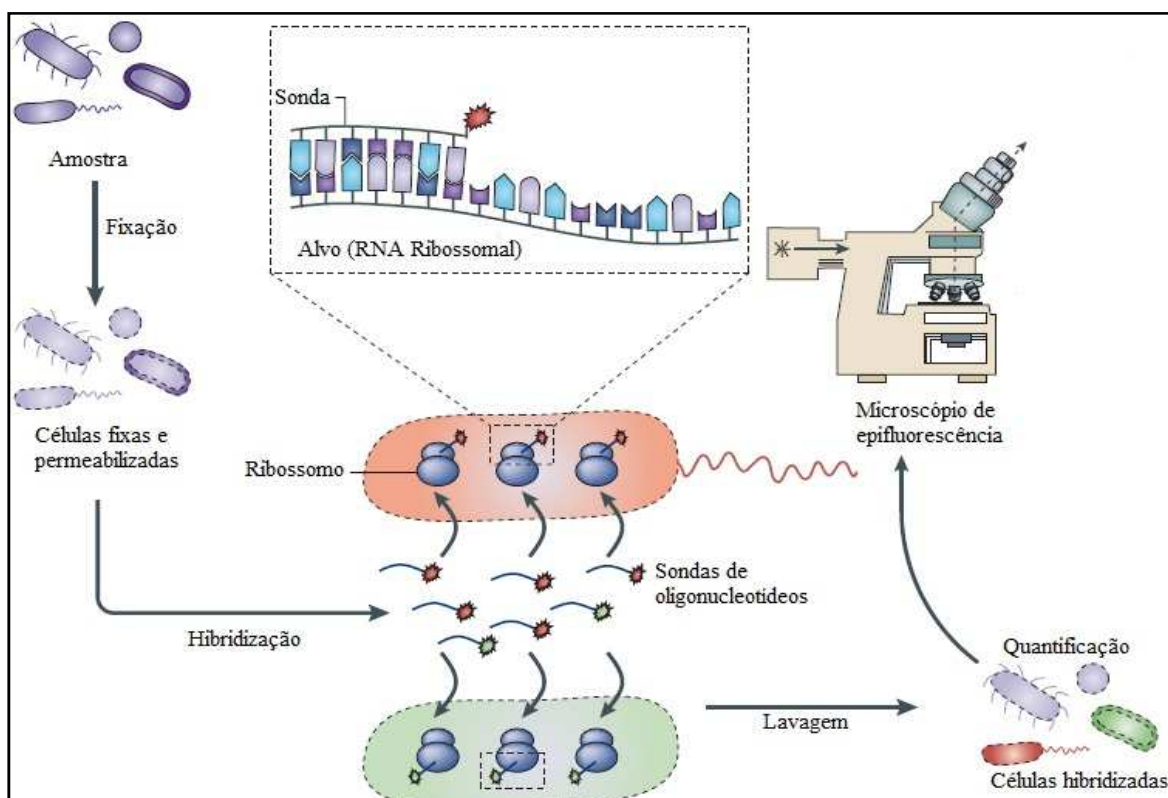


Figura 4.11- Etapas básicas de hibridização fluorescente in situ (FISH)

Fonte: Adaptado Amann & Fuchs (2008)

As lâminas foram visualizadas em um microscópio de epifluorescência da marca Zeiss (Modelo Axioskop 2 plus) e quantificadas manualmente. Os números absolutos de células marcadas pelas sondas foram determinados mediante cálculo da média das contagens de 10

campos visuais corrigidas pelo fator de diluição de cada amostra (amostras: bruta, diluída 6X, diluída 12X). Os cálculos das abundâncias relativas foram realizados frente ao percentual de células marcadas pelas sondas e o número de células totais determinadas pela coloração com DAPI 2 µg/mL (4,6-diamidino-2-fenilindol).

4.6 Análises Estatísticas

Abundância de micro-organismos específicos

Para verificar a relação entre o número relativo de células marcadas pelas sondas e os resultados físico-químicos (concentração de amônia, nitrito, nitrato e DBO) foi utilizado à correlação de Pearson (r). A correlação entre duas variáveis, no caso o número de células marcadas pelas sondas e as concentrações de diferentes parâmetros, refletem a intensidade de correlação entre estas. A correlação de Pearson reflete a intensidade da relação linear entre duas variáveis, variando de +1 a -1. A correlação que apresenta valor +1 é considerada perfeitamente positiva, indicando a relação linear positiva entre as variáveis. A intensidade da associação linear entre as variáveis pode ser definida através da Equação abaixo:

$$r = \frac{C_{x,y}}{S_x S_y} \quad r \in [-1,1]$$

Onde:

- C_{xy} : Covariância ou variância conjunta das variáveis x e y ;
- S_x : Desvio padrão da variável x ;
- S_y : Desvio padrão da variável y .

5. RESULTADOS

5.1 Remoção da matéria orgânica

Na figura 5.1 apresenta-se a variação de DQO total e Filtrada ao longo dos dias de operação para o esgoto bruto, entrada do FBAS e efluente final.

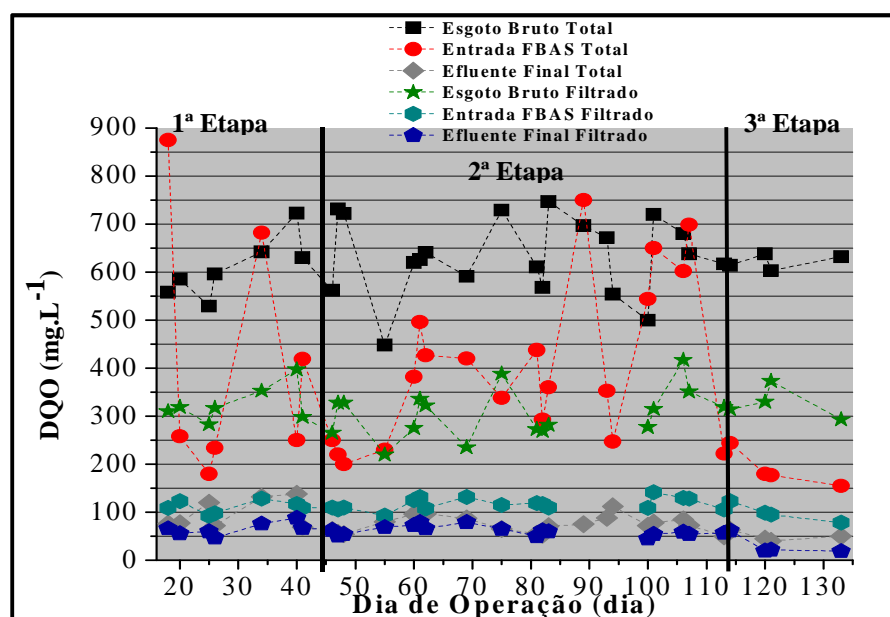


Figura 5.1- Variação de DQO Total e Filtrada ao longo dos dias de operação

Na figura 5.2 apresenta-se a média para DQO Total e filtrada para as Etapas 1, 2 e 3, assim como a média da eficiência de remoção obtida para o sistema RALF e FBAS. Observa-se o baixo desempenho do reator RALF para as Etapas 1 e 2, tendo uma eficiência média de remoção de DQO total de 32 % e 38 %, respectivamente, sendo que a literatura sugere uma eficiência média de 65 % na remoção de DQO total (JORDÃO & PESSOA, 2005). Este baixo desempenho foi afetado diretamente pelo arraste de sólidos suspensos (SS) na saída destes reatores, resultando em efluentes superiores aos afluentes do reator (Figura 5.1).

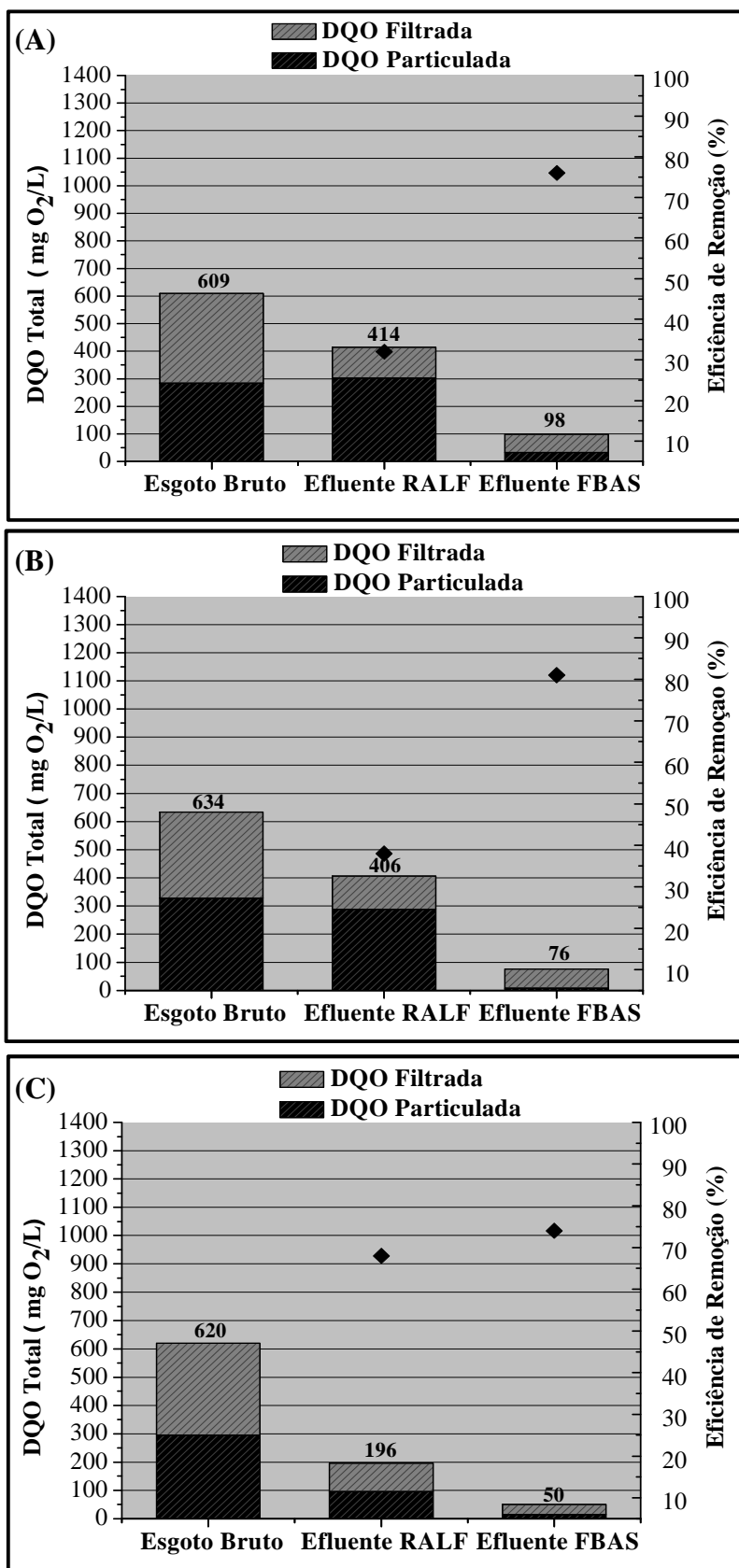


Figura 5.2- Valores de DQO Total e Eficiências de remoção para as três etapas monitoradas. (A) Etapa 1; (B) Etapa 2 e (C) Etapa 3

Esta perda de sólidos na saída do reator é confirmada pelo aumento da DQO particulada do esgoto bruto para o efluente RALF (284 mg.L⁻¹ para 303 mg.L⁻¹) na Etapa 1 e uma pequena diminuição (328 mg.L⁻¹ para 289 mg.L⁻¹) na Etapa 2. Verifica-se para alguns dias DQO maior na entrada do FBAS do que no esgoto bruto. Esta condição foi constatada quando a centrífuga responsável pelo tratamento do lodo, não estava operando impedindo a descarga de lodo dos reatores RALF. A ausência da descarga de lodo do RALF faz com que esse excesso de lodo seja encaminhado para o FBAS comprometendo o processo. Bolzani (2011) em um estudo feito nesta mesma estação verificou uma média de 352 mg.L⁻¹ DQO Total para o Efluente RALF sem a centrífuga operando, já com ela em operação obteve valores de 152 mg.L⁻¹.

Os resultados de remoção para DQO Total no FBAS para a Etapa 1 foram afetadas diretamente pela maior vazão de alimentação aplicada ($Q=0,5 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$) neste período e consequentemente uma maior carga orgânica aplicada. A perda de sólidos na saída do RALF pode ter influenciado negativamente o desempenho do FBAS, visto que contribuiu no aumento da carga orgânica. Como resultado para esta etapa obteve-se uma concentração média de 414 mg.L⁻¹ e 98 mg.L⁻¹ (Figura 5.2A) para o efluente RALF e FBAS, respectivamente. Estes valores representam uma eficiência de remoção média de 32 % e 76 % para o sistema RALF e FBAS, respectivamente. A eficiência de remoção global de 84 % foi satisfatória nesta etapa devido ao bom desempenho do sistema FBAS.

A 2ª Etapa caracterizada pela redução da vazão de alimentação ($0,2 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$) apresentou uma melhoria na qualidade do efluente, principalmente em relação ao FBAS. Para esta etapa obteve-se uma DQO Total média igual a 406 mg.L⁻¹ para o efluente do RALF de (Figura 5.2B), valor este considerado alto para efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto doméstico. Sousa *et al.*, (2006) detectou um valor médio de 220 mg.L⁻¹ de DQO Total ao passar pelo reator anaeróbio. Este resultado foi influenciado pelo acúmulo de lodo no sistema devido à paralização da centrífuga. Para o efluente FBAS obteve-se um efluente médio igual a 76 mg.L⁻¹ (Figura 5.2B). Estas concentrações representam uma remoção de 42 % e 74 %, para o sistema RALF e FBAS respectivamente, e eficiência global do sistema de 88 %.

Na 3ª Etapa as seguintes condições foram observadas vazão de alimentação ($0,2 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$) e vazão de recirculação ($0,2 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$). Nesta etapa a centrífuga voltou a operar, retirando o

excesso de lodo do sistema, não havendo arraste de sólidos do sistema (Figura 5.1) consequentemente diminuindo a concentração de DQO Total, obtendo uma média de 196 mg.L⁻¹ (Figura 5.2C). Para o efluente FBAS obteve-se também uma melhoria na qualidade do efluente final com concentração média igual a 50 mg.L⁻¹. Esta etapa em relação às duas primeiras etapas apresentou uma melhor eficiência de remoção, principalmente em relação ao efluente RALF apresentando valores médios de 68 %, enquanto o efluente FBAS apresentou um valor igual a 74 %.

Nas três etapas investigadas constata-se o bom desempenho do sistema RALF+FBAS na remoção de DQO Total, obtendo eficiências entre 84 % e 92 % estando em linha com o citado na literatura de 75% a 90% de remoção de DQO total (HIRAKAWA *et al.* 2002; GIUSTINA *et al.* 2010; VON SPERLING 2005).

Na figura 5.3 se considerados os padrões de lançamento do estado do Paraná (Resolução nº 070/2009) que prevê uma concentração máxima de DQO Total de 150 mg.L⁻¹, os valores obtidos durante as três etapas estão dentro do padrão de lançamento.

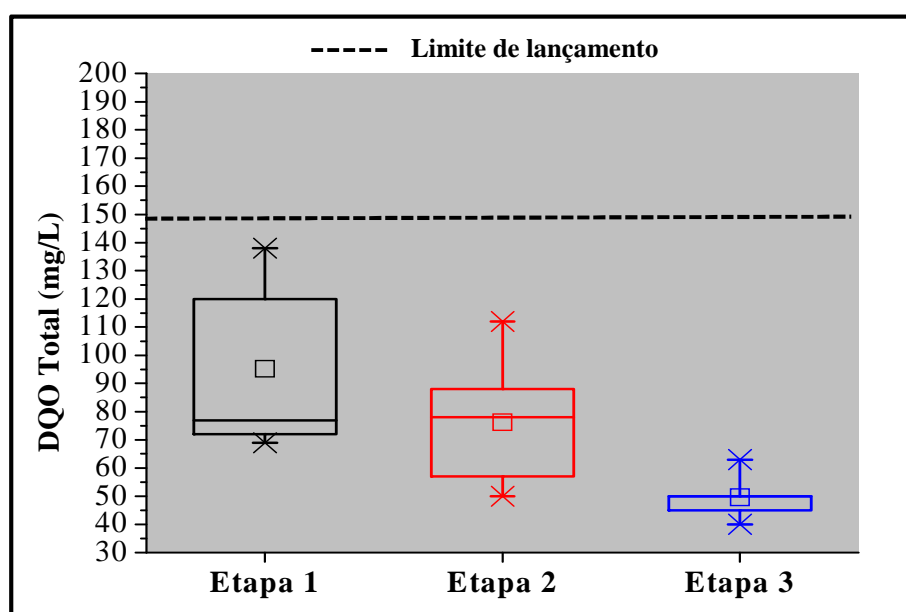


Figura 5.3- Box-Plot mostrando os valores máximos, mínimos, médios e desvios-padrão das concentrações de DQO Total para as três etapas investigadas de acordo com o padrão de lançamento

A figura 5.4 apresenta os dados de DBO Total, filtrada e particulada para as três etapas investigadas, bem como as eficiências totais para os sistemas RALF e FBAS.

Com relação a 1ª Etapa verifica-se o baixo desempenho do reator anaeróbio, na remoção de DBO e um desempenho satisfatório para o FBAS. Para esta etapa os valores da DBO foram de 110 mg.L⁻¹ e 45 mg.L⁻¹ (Figura 5.4A), para o efluente do RALF e FBAS, respectivamente, obtendo uma eficiência média de 45% e 60%. Mesmo com o baixo desempenho do sistema anaeróbio, a eficiência total de remoção de DBO obtida (RALF+FBAS) foi de 77%.

Com a mudança para a 2ª Etapa houve uma queda no desempenho do reator RALF, visto que a eficiência de remoção caiu para 43% (Figura 5.4B), eficiência esta, considerada baixa para este sistema anaeróbio que operam numa faixa de 65% a 70% na remoção de DBO (JORDAO & PESSOA, 2005; VIEIRA *et al.* 2005). Uma explicação para o baixo desempenho destas duas primeiras etapas é que a centrífuga encontrava-se desativada e com isto a relação F/M diminui. Além disso, nos horários de vazão de pico, o manto de lodo do RALF é varrido juntamente com o líquido, alterando a qualidade do efluente final. Para esta etapa obteve-se uma DBO média de 85 mg.L⁻¹ e 27 mg.L⁻¹ para o efluente do RALF e FBAS, respectivamente, correspondendo a uma eficiência de remoção de DBO de 43% e 68%, enquanto o conjunto RALF+FBAS apresentou eficiência de remoção de 82%.

Com a melhoria na qualidade do efluente na 3ª Etapa do RALF influenciado pelo funcionamento da centrífuga assim o efluente do RALF e do FBAS apresentaram um valor de DBO de 66 mg.L⁻¹ e 18 mg.L⁻¹, respectivamente. Em relação à eficiência de remoção de DBO, o sistema RALF e FBAS apresentaram um valor igual a 70% e 73%, respectivamente, enquanto a o sistema RALF+FBAS apresentou um valor médio de 92%.

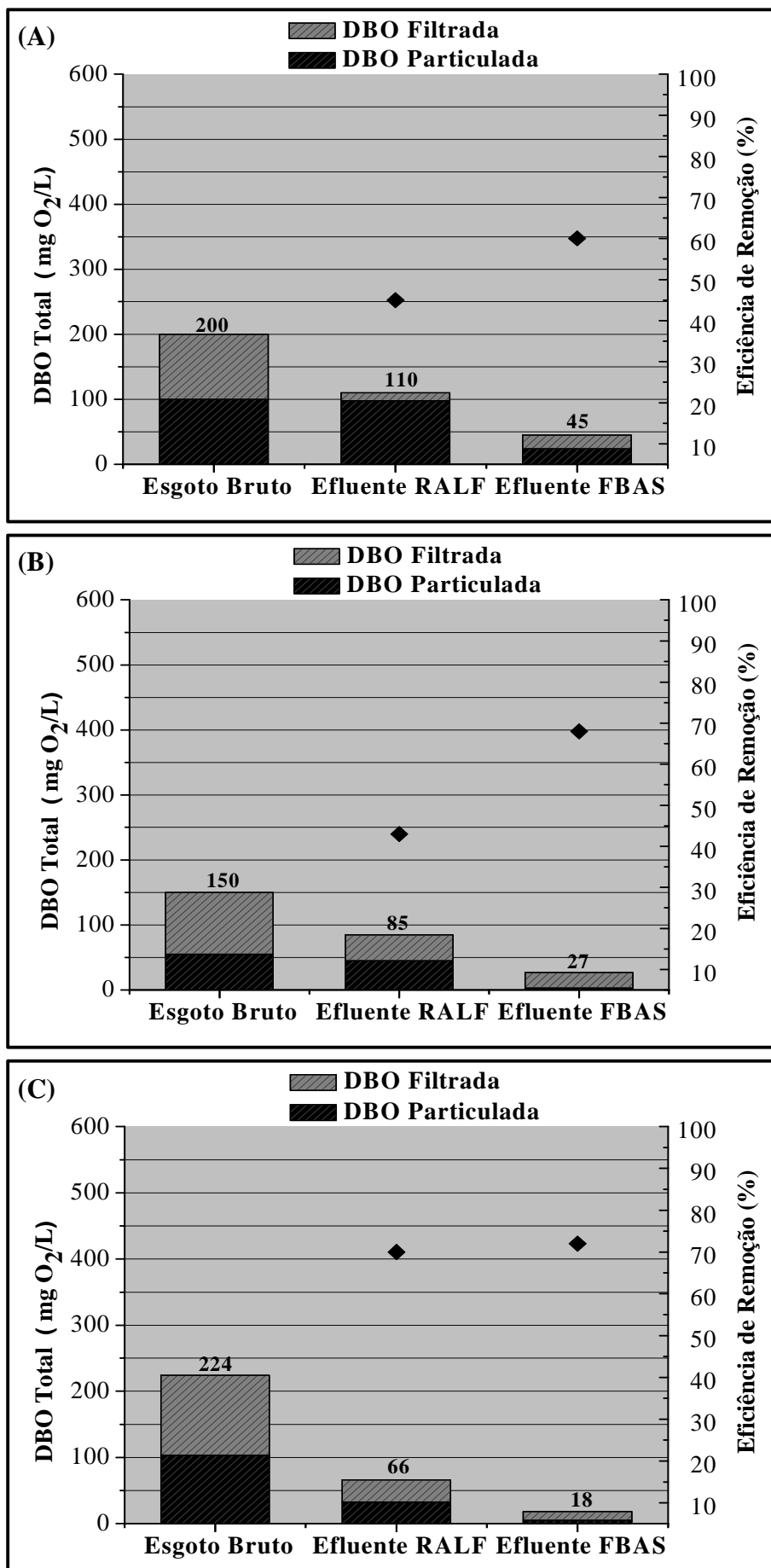


Figura 5.4- Valores de DBO Total e Eficiências de remoção para as três etapas monitoradas. (A) Etapa 1; (B) Etapa 2 e (C) Etapa 3

Assim como na remoção de DQO, o sistema RALF+FBAS apresentaram bons resultados com relação à DBO durante as três etapas experimentais, principalmente a Etapa 3. Com isso esta associação obteve eficiências entre 77% e 92% (Figura 5.5). CHAGAS (2008) estudando um FBAS como pós-tratamento de reatores UASB obteve um percentual de 76% na remoção de DBO Total.

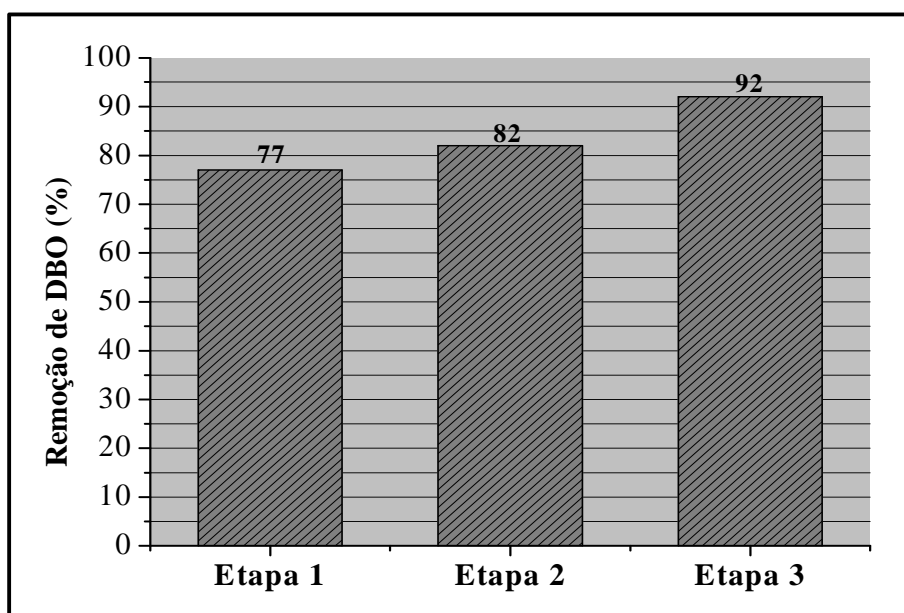


Figura 5.5- Eficiências totais obtidas de DBO (RALF+FBAS) para as três etapas avaliadas

Na Figura 5.6 se considerados os padrões de lançamento do estado do Paraná (Resolução nº 070/2009) que preve uma concentração máxima de DBO Total de 60 mg.L^{-1} , os valores obtidos durante as três etapas estão dentro do padrão de lançamento.

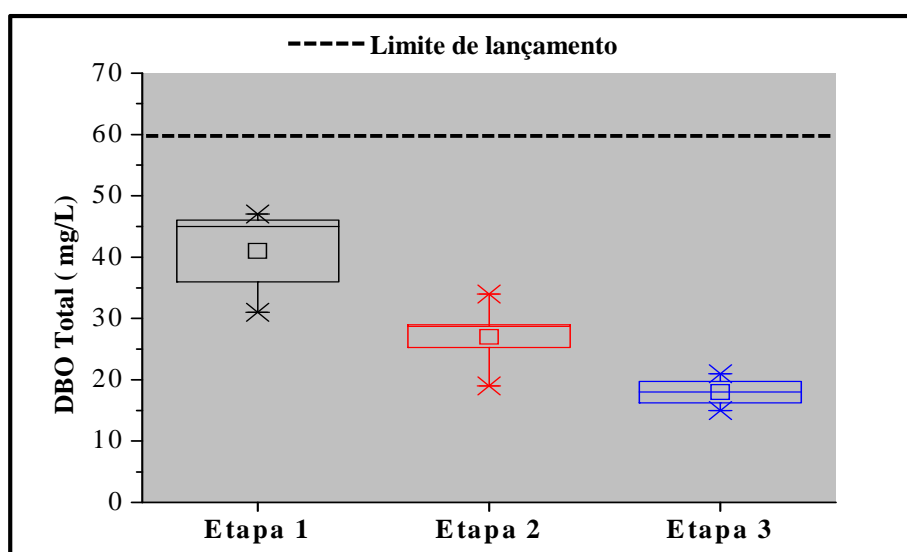


Figura 5.6- Box-Plot mostrando os valores máximos, mínimos, médios e desvios-padrão das concentrações de DQO Total para as três etapas investigadas de acordo com o padrão de lançamento

5.2 Remoção de Sólidos Suspensos

Na figura 5.7, 5.9 e 5.11 as concentrações obtidas para SST para as três etapas são apresentadas e a estatística descritiva das concentrações de SST é mostrada nas figuras 5.8, 5.10 e 5.12.

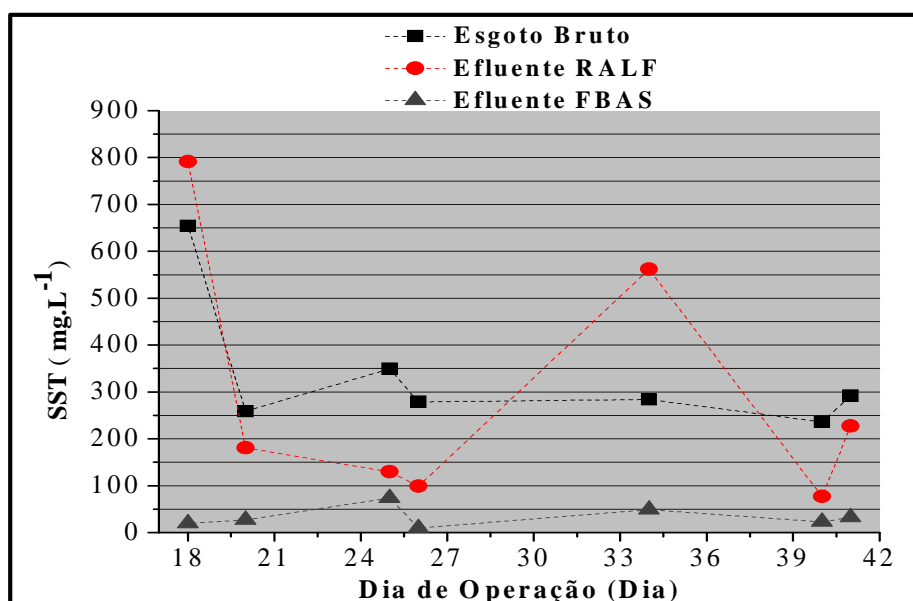


Figura 5.7- Resultados de sólidos suspensos totais (SST) ao longo dos dias de operação para Etapa 1

Verifica-se na figura 5.7 os picos registrados no 18º e 34º dia para o efluente RALF. Estas altas concentrações para o esgoto bruto está relacionada ao horários da coleta representando a vazão de pico (entre 12:00 e 15:00 hs) além disso, a centrífuga não estava operando havendo um acúmulo de lodo nos reatores, provocando em horários de alta vazão a lavagem dos sólidos para fora do RALF. Nestes dias havia também a recirculação do lodo do decantador secundário (sistema que integra o filtro biológico percolador da ETE 2-Sul) para a entrada do RALF fatores estes que propiciaram o aumento na concentração de SST. Em relação ao FBAS verifica-se o bom desempenho na remoção de sólidos suspensos totais (SST), mantendo-se estável ao longo dos dias de operação. A figura 5.8, mostra os valores obtidos, para a primeira etapa, em que o efluente do RALF apresentou um valor igual a $295 \pm 273,28 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto o sistema FBAS apresentou melhores resultados com

concentração média de $33 \pm 21,47 \text{ mg.L}^{-1}$. Para estes sistemas foi obtida uma eficiência de remoção média de 12 % e 89%, para o sistema RALF e FBAS, respectivamente.

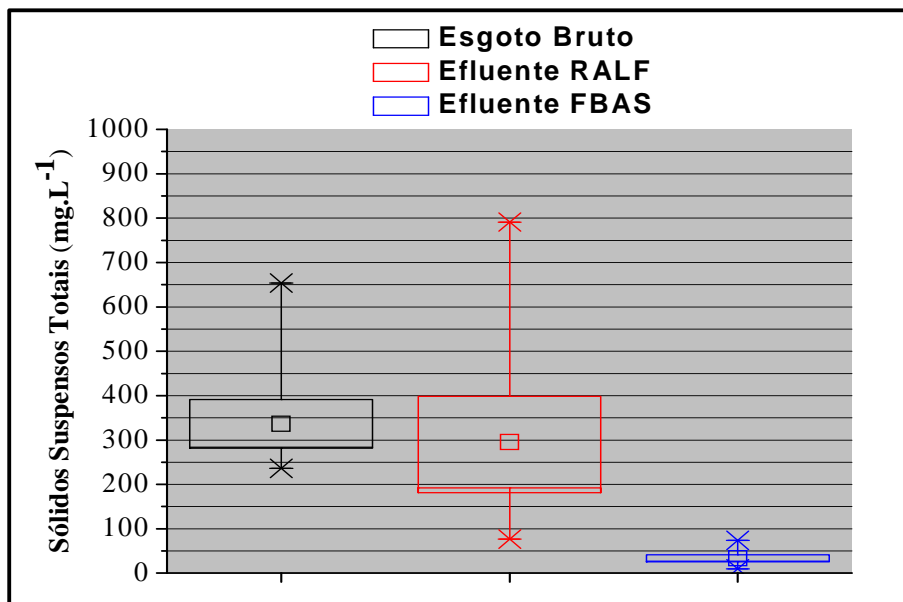


Figura 5.8- Box-Plot mostrando os valores máximos, mínimos, médios e desvios-padrão das concentrações de SST referente à Etapa 1

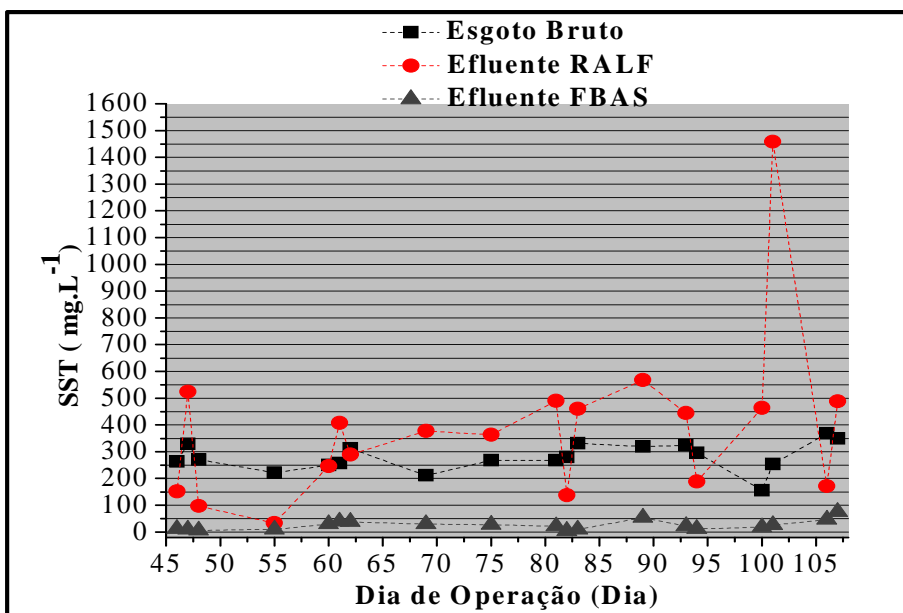


Figura 5.9- Resultados de sólidos suspensos totais (SST) ao longo dos dias de operação para Etapa 2

Na 2ª Etapa as concentrações de SST em relação ao esgoto bruto se mantiveram alto na maioria dos dias de operação. Com a centrífuga desativada e as coletas feitas em horários em que a recirculação do lodo do decantador secundário era retornado para a entrada do RALF tornou a situação pior. Com a redução da vazão aplicada no FBAS na segunda etapa houve uma redução da carga de SST volumétrica ($4,87 \text{ kg SST.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$) (Figura 5.14), assim o FBAS apresentou um bom desempenho na remoção de sólidos. Para esta etapa o sistema RALF e FBAS apresentaram um efluente com concentração média de $379 \pm 299,26 \text{ mg.L}^{-1}$ e $26 \pm 18,20 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 5.10). Em relação à eficiência de remoção o reator RALF teve seu desempenho negativo, enquanto que o FBAS atuou de forma muito eficiente, desempenhado principalmente pelo decantador secundário em que se obteve 93% de remoção de SST.

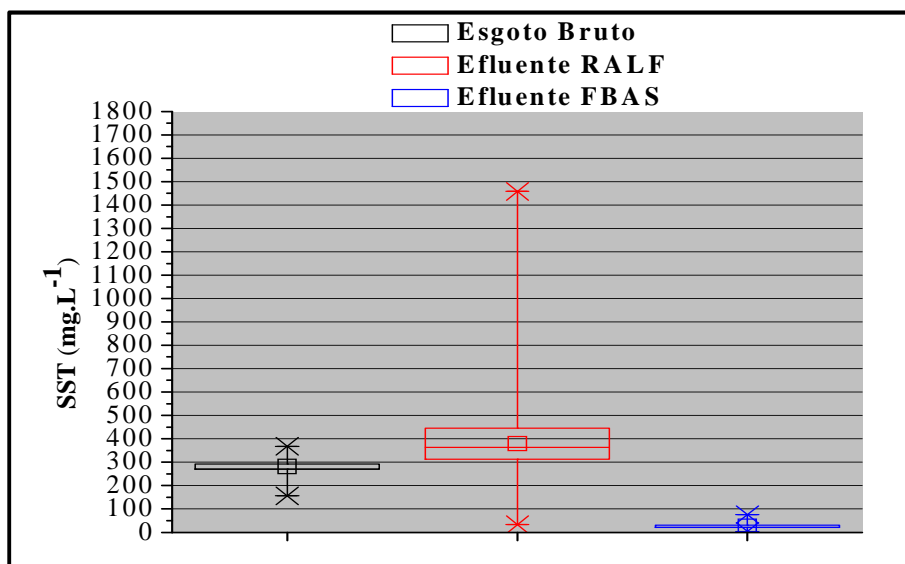


Figura 5.10- Box-Plot mostrando os valores máximos, mínimos, médios e desvios-padrão das concentrações de SST referente à Etapa 1

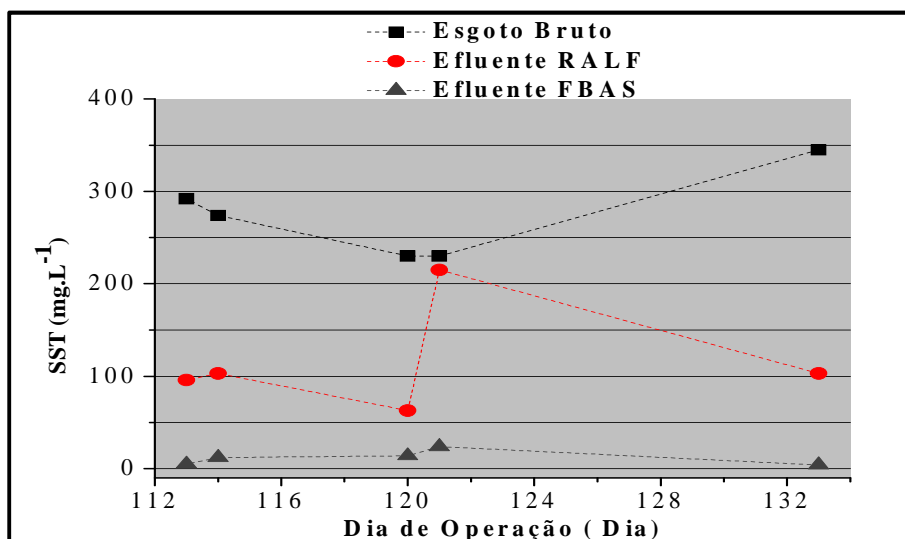


Figura 5.11- Resultados de sólidos suspensos totais (SST) ao longo dos dias de operação para Etapa 3.

Na 3ª Etapa as concentrações do efluente do RALF estão abaixo a do afluente (Esgoto Bruto) período em que a centrífuga estava funcionando, havendo um maior descarte de lodo para a etapa de tratamento e com isso não havia mais arraste de sólidos e, portanto, menores concentrações de SST foram verificadas. Nesta etapa a carga volumétrica de sólidos aplicada no FBAS foi reduzida pra 1/3 da aplicada na etapa 1 (1,45 Kg SST.m⁻³.dia⁻¹) (Figura 5.14), esta redução significativa está ligado ao bom desempenho do reator RALF, enquanto o FBAS se manteve como nas etapas anteriores. Com o sistema RALF operando em sua condição normal de tratamento obteve-se um efluente com concentração média de 116±65,44 mg.L⁻¹ (Figura 5.12), enquanto o FBAS apresentou um valor médio de 13 mg/L±8,22 mg.L⁻¹ (Figura 5.12), correspondendo, respectivamente a uma eficiência de 60% e 88%.

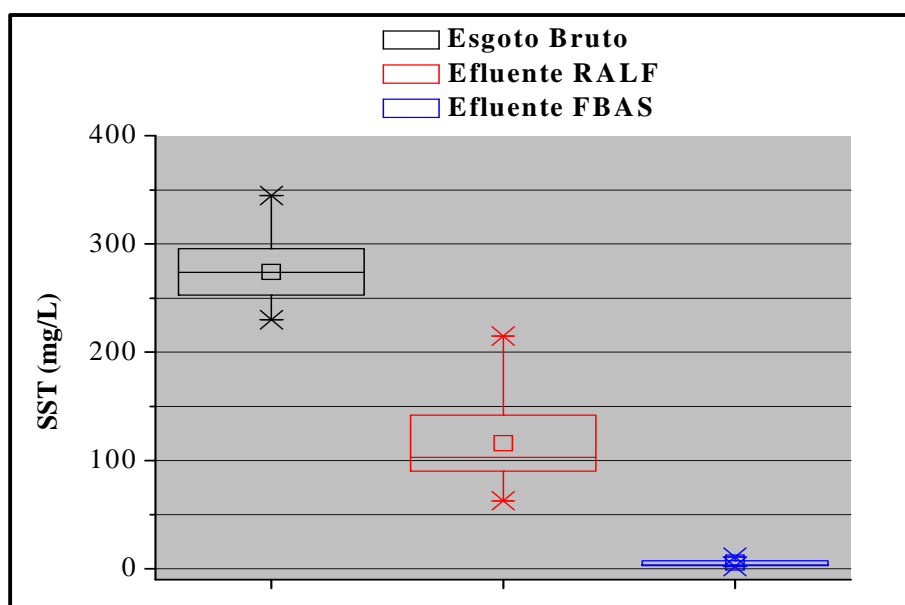


Figura 5.12- Box-Plot mostrando os valores máximos, mínimos, médios e desvios-padrão das concentrações de SST referente a Etapa 3

Na figura 5.13 se levado em consideração o padrão de lançamento do estado do Paraná (Resolução nº 070/2009) que preve uma eficiência minima de 20% na remoção de Sólidos Suspensos Totais (SST) as concentrações obtidas nas 3 etapas para a unidade experimental FBAS estão dentro do padrão de lançamento.

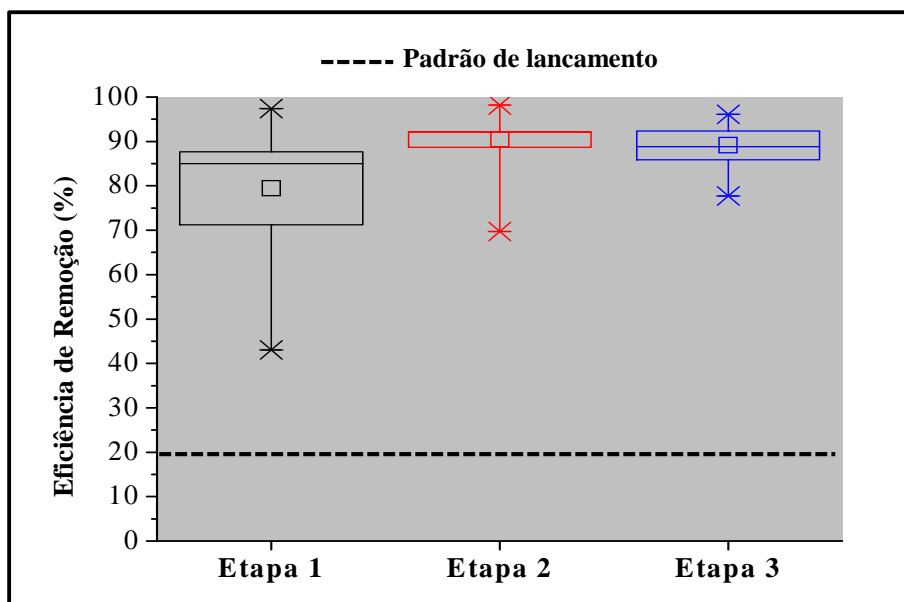


Figura 5.13- Box-Plot mostrando os valores máximos, mínimos, médios e desvios-padrão das eficiências de SST para as três etapas investigadas de acordo com o padrão de lançamento

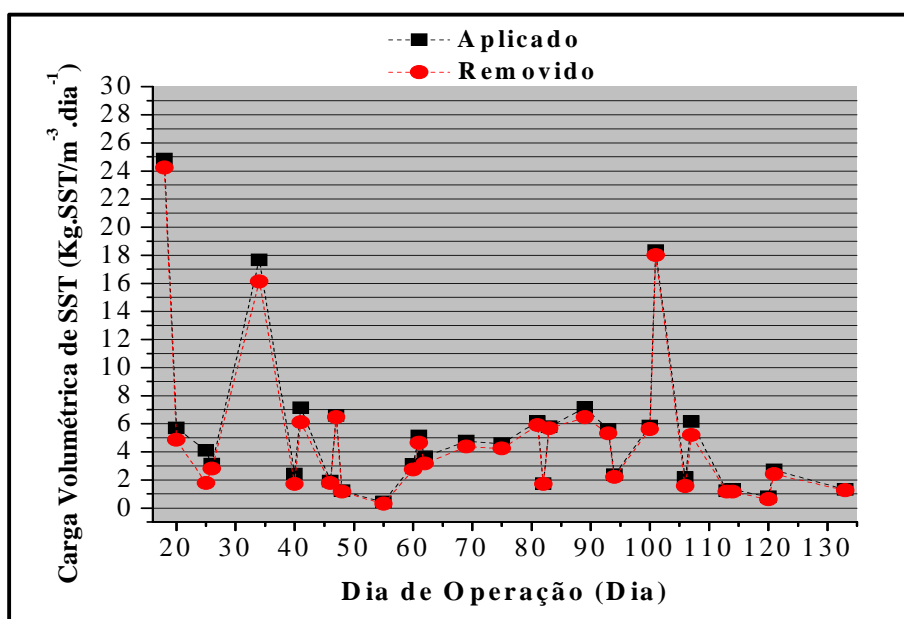


Figura 5.14- Cargas aplicadas e removidas de SST ao longo dos dias de operação

Conclui-se, que a unidade experimental (FBAS) promoveu a remoção de sólidos suspensos totais (SST) em grau satisfatório nas três etapas avaliadas, produzindo um efluente final com médias de 33 mg.L^{-1} , 26 mg.L^{-1} e 13 mg.L^{-1} , alcançando eficiências médias de 89%, 91% e 95% para as Etapas 1, 2 e 3, respectivamente.

Von Sperling (2005) operando um sistema UASB+FBAS obteve concentrações de 20 a 40 mg.L^{-1} e eficiências de remoção variando entre 87% a 93%.

5.3 pH

A figura 5.15 representa os dados do parâmetro pH verificados para o FBAS nas diferentes etapas propostas. Analisando os gráficos percebe-se que os valores de pH do efluente final estão acima dos valores de entrada do FBAS. Como o processo de nitrificação é caracterizado pela produção de íons H^+ , estes valores tenderiam a valores mais baixos em relação aos de entrada. A princípio pode-se constatar que o processo de nitrificação não ocorre, mas não é isso que realmente ocorre nas etapas monitoradas.

Durante a Etapa 1, observou-se que a média dos resultados de pH monitorado no efluente final estiveram próximos a 8,0 enquanto que o da entrada do FBAS apresentou valor 7,0, verificando-se um aumento no pH do efluente.

A 2ª etapa apresentou valores muito próximos em relação à etapa 1, o efluente final apresentou uma mediana de 8,06 enquanto que o da entrada do FBAS apresentou 7,44, porém nesta etapa constatou-se o processo de nitrificação.

Para a 3ª etapa investigada observou-se que a média dos resultados de pH monitorado no efluente final estiveram em 7,61, enquanto que o efluente final apresentou valores de 7,91.

Observa-se nestas etapas monitoradas o aumento dos valores de pH quando comparados o afluente e efluente. Pode-se destacar ainda que os valores de pH do efluente final estiveram acima de 7 em todas as etapas estudadas. Como pode ser observado através dos gráficos de pH e produção de nitrato não houve uma correlação em ambas as etapas o que permite deduzir que o pH não exerceu grande influência sobre o processo de nitrificação.

Estes resultados obtidos mostram que o processo de nitrificação em reatores de biomassa imobilizada não sofrem influência do parâmetro pH (BIENSTENFELD *et al.* 1992 *apud* MEDEIROS 2011). Entretanto vale destacar que valores afastados da neutralidade podem favorecer a formação de amônia livre ou ácido nítrico em concentração tóxica as bactérias nitrificantes e influenciar no mau desempenho da unidade no processo de nitrificação caso este que não foi verificado na pesquisa.

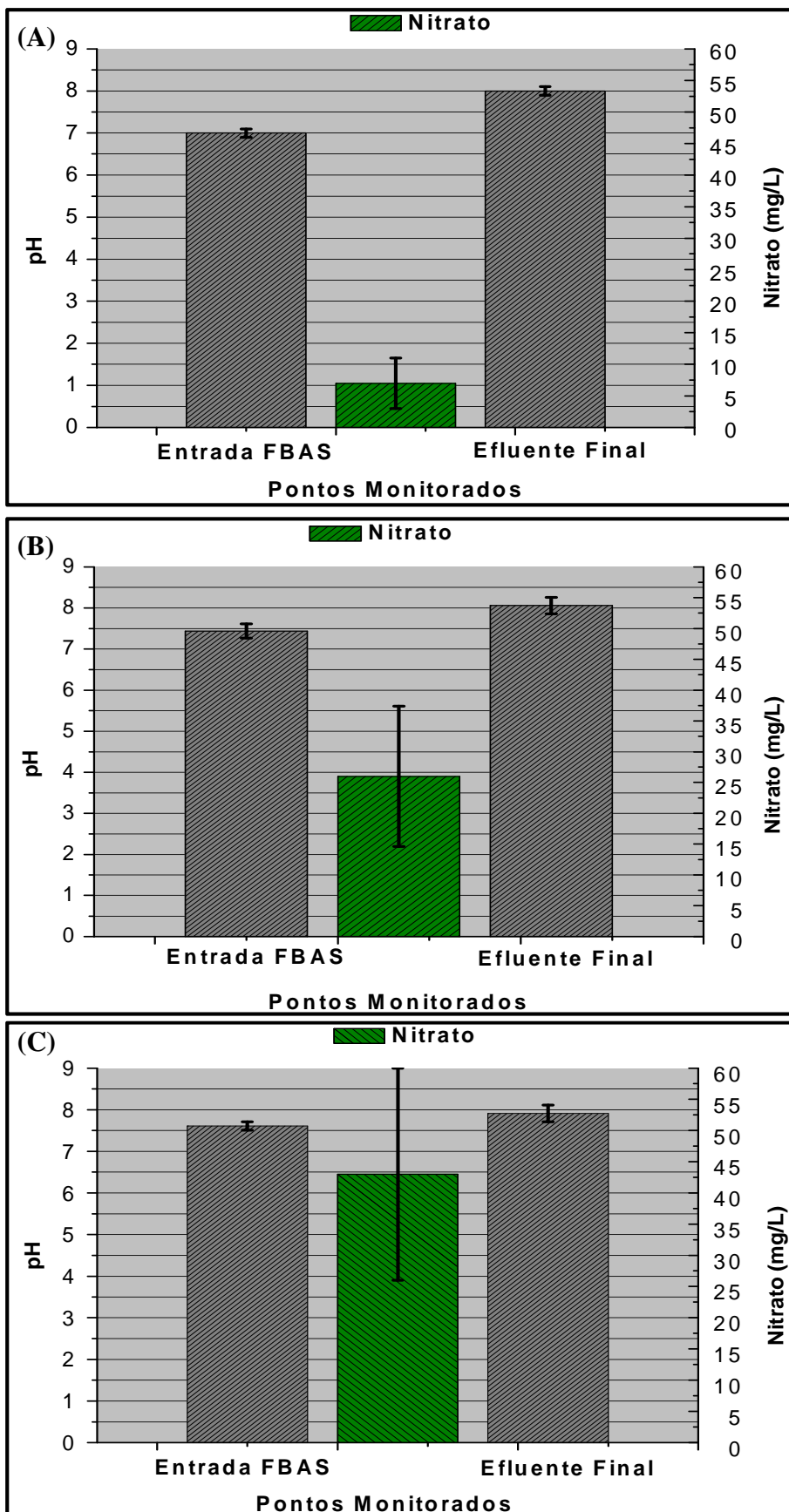


Figura 5.15- Valor médio de pH e Produção de Nitrato. (A) Etapa 1; (B) Etapa 2 e (C) Etapa 3. Barras de erro = Desvio Padrão

5.4 Alcalinidade Total

A alcalinidade pode ser entendida como a capacidade das águas em neutralizar compostos ácidos devido à presença de bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos em solução. O monitoramento da alcalinidade encontra-se como importante aplicação em sistemas de tratamento destinados a nitrificação e desnitrificação. Segundo Metcalfy & Eddy (2003) a nitrificação consome 7,14 g de alcalinidade total como CaCO_3 do meio para cada grama de nitrogênio amoniacal convertida a nitrato. A figura 5.16 apresenta as concentrações médias de alcalinidade e a produção de nitrato média do efluente final para as etapas 1 a 3.

Para a etapa 1 verificou-se um baixo consumo de alcalinidade e uma baixa produção de nitrato. Para esta etapa houve um consumo médio de $49 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ em relação ao efluente final e uma produção média de $7 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$, fato este que comprova a baixa taxa de nitrificação. Este desempenho pode estar associado às altas COV's aplicadas durante esta etapa. A mudança do regime hidráulico para etapa 2 possibilitou um maior consumo de alcalinidade total e uma maior produção de nitrato.

Para a etapa 2 houve um aumento na taxa de nitrificação, ao qual apresentou uma concentração média de nitrato no efluente final de $26 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ e um consumo de $181 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ para esta etapa, conforme a Figura 5.23.

Esta melhora no processo de nitrificação foi verificado para a etapa 3, ao qual possibilitou uma maior produção de nitrato ($43 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$) e um maior consumo de alcalinidade total ($260 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$). Este comportamento pode ser associado a baixas cargas orgânicas aplicadas durante esta etapa.

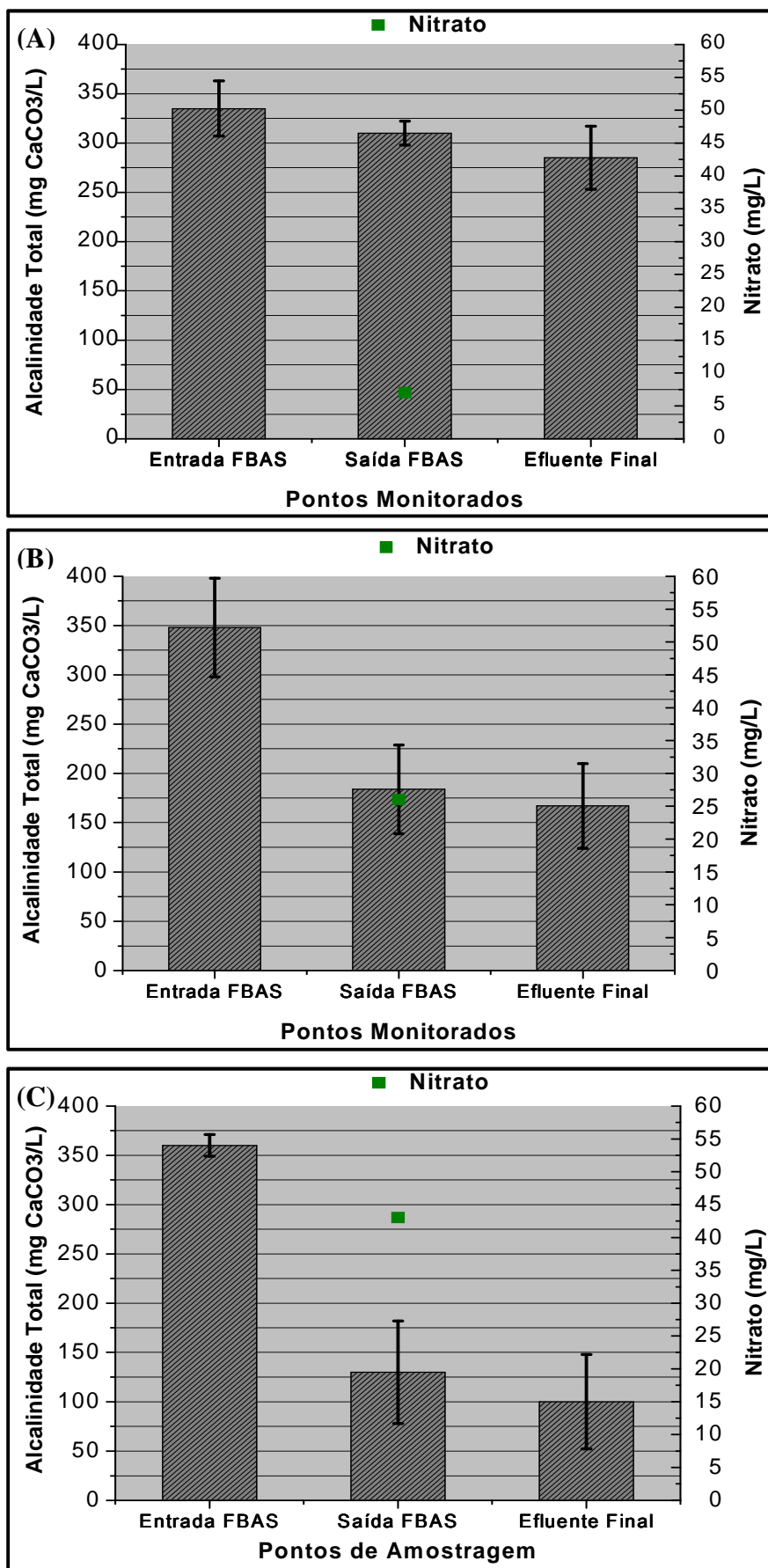


Figura 5.16- Consumo médio de alcalinidade total e produção de nitrato. (A) Etapa 1; (B) Etapa 2 e (B) Etapa 3. Barras de erro = desvio padrão

Tabela 1- Consumo médio de alcalinidade, produção de nitrato e amônia oxidada

| Etapa | Consumo Total Alcalinidade Total | Alcalinidade Entrada FBAS | Alcalinidade Residual | Produção de Nitrato | Amônia Oxidada |
|--------------|-----------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | (mg CaCO ₃ /L) | | | (mg N-NO ₃ /L) | (mg N-NH ₄ /L) |
| 1 | 49 | 346 | 286 | 6 | 7 |
| 2 | 181 | 348 | 167 | 26 | 28 |
| 3 | 260 | 360 | 100 | 43 | 42 |
| Média | 163 | 351 | 184 | 25 | 26 |

De acordo com a tabela 5.1 pode ser verificado que durante o trabalho o processo de nitrificação foi responsável por um consumo médio de alcalinidade total de 163 mg CaCO₃ e 26 mg N-NH₄⁺ oxidado, o que corresponde estequiometricamente a um consumo de 6,26 mg CaCO₃/ mg N-NH₄⁺ relação esta próxima aos valores obtidos por Villaverde *et al.*,(1997), de 7,1 mg CaCO₃/ mgN em Biofiltros Aerados Submersos (BAS) para nitrificação.

Vale destacar que a concentração de alcalinidade residual esteve acima do valor recomendado de 45 mg CaCO₃/L ao qual o processo de nitrificação em reatores de biomassa imobilizada é interrompido (BIESTERFELD *et al.* 2003).Portanto, pode-se dizer desta forma que a concentração de alcalinidade residual ainda é elevada, portanto o FBAS pode ser melhor utilizado em termos no desempenho da remoção de N-amoniacoal, de acordo com o consumo de alcalinidade.

5.5 Oxigênio dissolvido

Na figura 5.17 os dados de oxigênio dissolvido para as Etapas 2 e 3 na unidade experimental FBAS são apresentados. O monitoramento do OD na etapa 1 não foi realizado devido a falta do aparelho. Nota-se que a concentração foi mantida elevada (>4 mg.O₂.L⁻¹) ao longo das etapas 2 e 3, para que o OD não se tornasse limitante para a biomassa nitrificante. O monitoramento de OD ao longo das etapas manteve-se na faixa entre 4 mg.L⁻¹ e 8,5 mg.L⁻¹.

Este parâmetro é de fundamental importância para o controle da nitrificação, pois em baixas concentrações a nitrificação pode ser inibida. Nestas concentrações os microorganismos oxidadores de nitrito (*Nitrobacter*) poderão ser inibidos, visto que possuem uma menor taxa de crescimento em relação aos oxidadores de amônia (*Nitrosomonas*) havendo um acúmulo de nitrito.

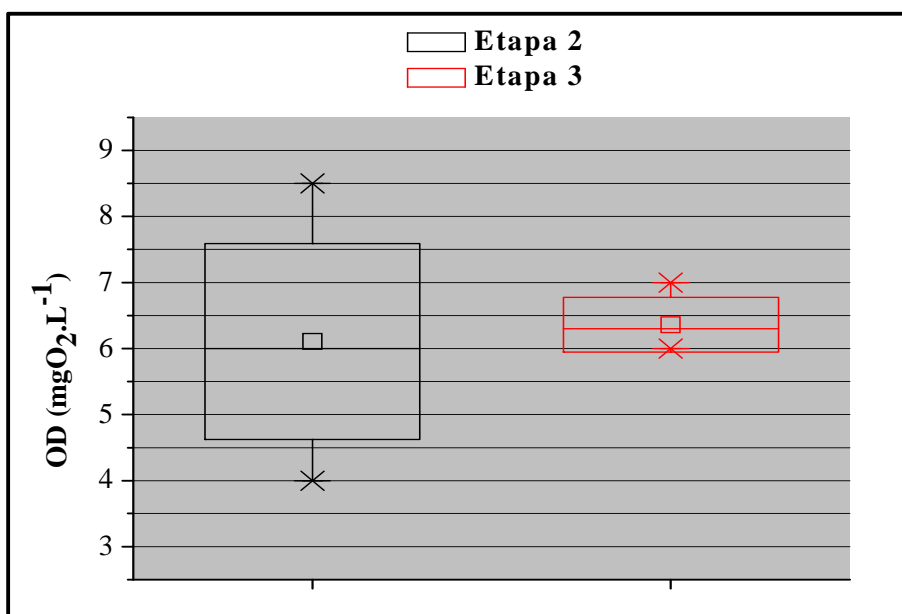


Figura 5.17- Box-Plot mostrando os valores máximos, mínimos, médios e desvios-padrão das concentrações de Oxigênio dissolvido (OD) referente as Etapa 2 e 3

Ao analisar a figura 5.18, percebe-se que nas maiores concentrações de oxigênio dissolvido tiveram-se as maiores remoções de nitrogênio amoniacal o que pode evidenciar uma correlação entre estas duas variáveis.

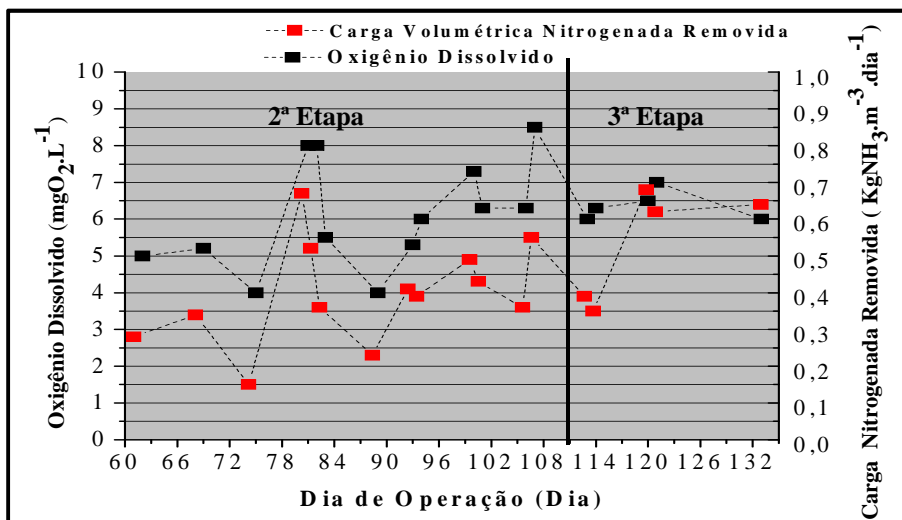


Figura 5.18- Valores de Oxigênio dissolvido e cargas removidas de nitrogênio amoniacal para as etapas 2 e 3

5.6 Nitrogênio Amoniacal

Na figura 5.19 e 5.20 apresenta, respectivamente, os valores médios de Nitrogênio amoniacal, assim como as eficiências de remoção e os dados de entrada e saída ao longo das etapas 1, 2 e 3 para o FBAS.

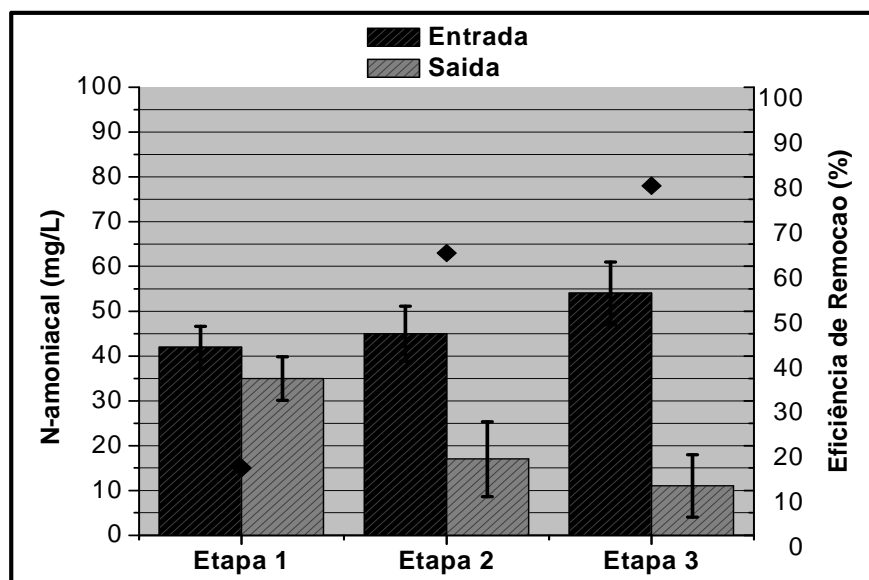


Figura 5.19- Valores de N-amoniacoal e eficiência de remoção para as três etapas avaliadas. Barras de erro=Desvio Padrão

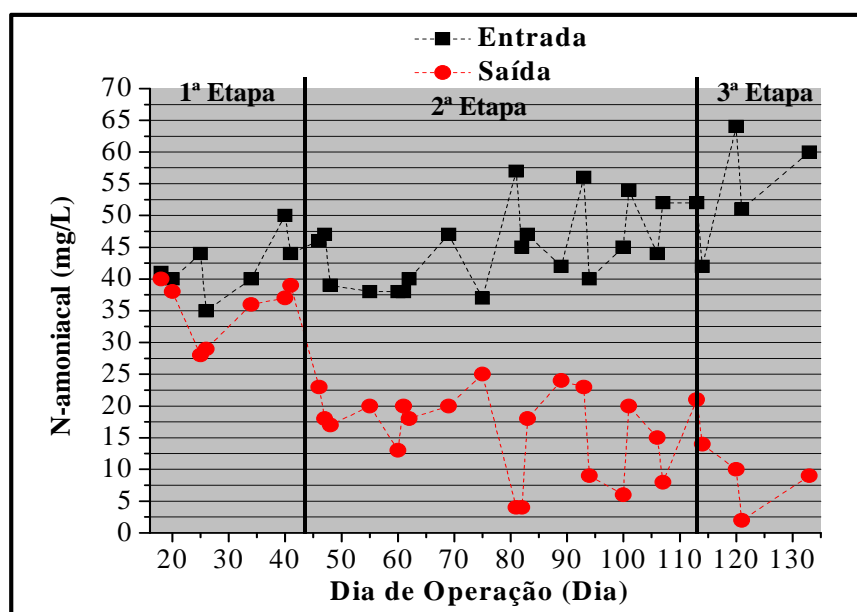


Figura 5.20- Valores de N-amoniacoal ao longo dos dias de operação para as três etapas avaliadas

Para a primeira etapa configurada pela vazão de entrada ($0,5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) e recirculação ($0,1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) a nitrificação não ocorre de maneira efetiva, como pode ser observado na figura 5.20, ocorre uma pequena conversão do N-amoniaco a nitrito e nitrato nesta etapa, possivelmente pela maior carga hidráulica aplicada em que possivelmente a biomassa heterotrófica sobrepõe a nitrificante. O sistema FBAS apresentou um efluente com concentração igual a $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 5.19), o que corresponde a um eficiência de 18%.

Na 2ª Etapa caracterizada pela alteração do regime hidráulico ($0,5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ para $0,2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) observou-se o início do processo de nitrificação (46º dia) que ao longo dos dias de operação, apresentou oscilações devido a carga hidráulica nitrogenada não ser constante ao longo dos dias, conforme figura 5.20, com a redução da carga hidráulica aplicada este favoreceu a formação da biomassa nitrificante. O FBAS apresentou 63% (Figura 5.19) na remoção de nitrogênio amoniacal, obtendo um efluente com concentração igual a $17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

A nitrificação na Etapa 3 apresentou um pequeno acréscimo na transformação do nitrogênio amoniacal. A vazão de alimentação foi mantida, enquanto a vazão de recirculação foi alterada de $0,1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ para $0,2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Como resultado obteve-se uma remoção de 78% (Figura 5.19), enquanto o efluente FBAS apresentou um valor médio igual $11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Constata-se que os valores obtidos para as Etapas 2 e 3 foram satisfatórias, resultando em concentrações médias de Nitrogênio amoniacal abaixo de 20 mg/L resultando em efluentes de acordo com o padrão de lançamento preconizado pela Resolução CONAMA nº 430/2011 que é de 20 mg/L .

5.6.1 Influência da COV no processo de nitrificação

A análise dos dados obtidos no item anterior permite concluir que o atendimento a melhores eficiências na remoção do material nitrogenado no FBAS exigiu a aplicação de menores taxas de aplicação hidráulica, como ocorreu a partir da 2ª Etapa em que foi reduzida a carga hidráulica aplicada, a qual houve uma melhoria no desempenho do processo de nitrificação, mantendo-se estável até o fim do experimento. Procurou-se verificar como a COV influenciava a remoção de nitrogênio.

De acordo com a literatura o aumento da COV resulta em um menor desempenho do processo de nitrificação, isto pode ser explicado pela competição de micro-organismos heterotróficos e nitrificantes em biofilmes. Sabe-se que em reatores com carga orgânica elevada, favorece o crescimento de micro-organismos heterotróficos, responsáveis pelo consumo da matéria orgânica, ao qual possui uma alta taxa de crescimento específico. Como eles competem por oxigênio e espaço no biofilme com a biomassa nitrificante, estes acabam prevalecendo sobre os micro-organismos nitrificantes.

Alem Sobrinho *et al.*, (2007) aplicando uma taxa na faixa de 0,5-1,0 kgDQO.m⁻³.dia⁻¹ em um Filtro Biológico Aerado Submerso obteve uma eficiência entre 50% a 70% na eficiência de remoção de N-amoniacal.

Le Bihan & Lessard (2003) comenta que cargas orgânicas aplicadas entre 0,10 e 0,40 kgDBO.m⁻³.dia⁻¹ estimulam o desenvolvimento de micro-organismos nitrificantes em reatores de biomassa aderida. A tabela 5.2 apresenta os dados das cargas orgânicas volumétricas aplicadas à unidade experimental FBAS e ao sistema RALF e as eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal obtidas para as três etapas do experimento para a unidade experimental FBAS. Para mostrar que unidade experimental dependia do bom desempenho do reator RALF na remoção da carga orgânica para a melhoria no processo de nitrificação foi utilizado dados obtidos por Golveia da Costa (2000).

Tabela 2- Carga orgânica removida pelo sistema RALF e carga orgânica aplicada ao FBAS

| Etapa | Carga Orgânica Volumétrica (COV) | | | | Remoção N-NH ₃ (%) |
|-------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | (kgDQO/m ³ . dia) | (kgDBO/m ³ . dia) | (kgDQO/m ³ .dia) | (kgDBO/m ³ . dia) | |
| | RALF | | FBAS | | |
| 1 | 5,26 | 2,32 | 13 | 6,72 | 15 |
| 2 | 6,47 | 3 | 5,2 | 1,95 | 63 |
| 3 | 10,20 | 3,77 | 2,5 | 0,83 | 78 |

De acordo com os dados da tabela, foi verificado uma melhor resposta do FBAS ao que foi preconizado por Alem Sobrinho *et al.* (2007) em termos de remoção de nitrogênio

amoniaco aplicando carga orgânica superior de até $5,2 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$ para se obter eficiências entre 50% e 70% obtidas pelo pesquisador.

A tabela mostra o papel importante do reator RALF na redução da carga orgânica aplicada ao FBAS. Essas reduções foram muito importantes para alcançar cargas orgânicas reduzidas na entrada da unidade experimental, colaborando para um melhor desempenho no processo de nitrificação do FBAS.

O FBAS não apresentou bons resultados na remoção de nitrogênio amoniacal para a primeira etapa. Isto pode ser explicado pela elevada carga orgânica adotada neste período que influenciou no baixo desempenho do processo de nitrificação, podendo ser um indicativo da constatação obtida por Alem Sobrinho *et al.* (2007).

5.7 Nitrito

O nitrito, produto intermediário do processo de nitrificação, também foi quantificado. A figura 5.21 representa as concentrações de nitrito na entrada e saída para o FBAS relativo aos dias de operação durante as três etapas operacionais.

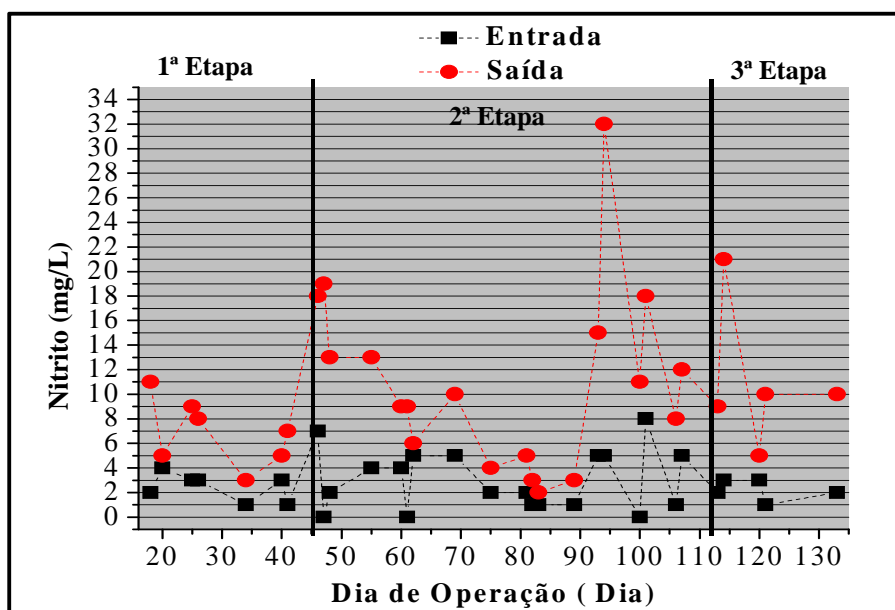


Figura 5.21- Perfil de concentração de Nitrito na entrada e saída do sistema FBAS

Na 1ª Etapa, nota-se uma baixa produção de nitrito, o que sustenta o fato de não ter ocorrido o processo de nitrificação. Durante esta etapa obteve concentração média de 7 mg.L⁻¹.

Com a introdução da 2ª Etapa observou-se o aumento da produção de nitrito, que com o início do processo de nitrificação houve uma maior oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito, etapa também chamada de nitritação, obtendo uma concentração média de 12 mg.L⁻¹.

Na 3ª Etapa a conversão de nitrogênio amoniacal a nitrito (Nitritação) se manteve próximo a 11 mg.L⁻¹.

5.8 Nitrato

O nitrato foi monitorado no ponto de saída da unidade experimental FBAS. Na figura 5.22 apresenta-se a evolução do nitrato ao longo dos dias de operação para as três etapas experimentais. Durante a 1ª Etapa nota-se a baixa concentração de nitrato produzida com valor médio de 6 mg.L⁻¹ (Figura 5.24).

Na Figura 5.34 apresenta-se a evolução do nitrato ao longo dos dias de operação para as três etapas experimentais. Durante a 1ª Etapa nota-se a baixa concentração de nitrato produzida com valor médio de 6 mg.L⁻¹ (Figura 5.24).

Com relação à segunda etapa nota-se uma maior produção de nitrato a partir do 46º dia de operação. Com uma maior produção de nitrato tem-se uma maior oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito e nitrato, portanto um melhor desempenho no processo de nitrificação. Esta etapa foi responsável pela produção de nitrato com concentração igual a 24 mg.L⁻¹. (Figura 5.24).

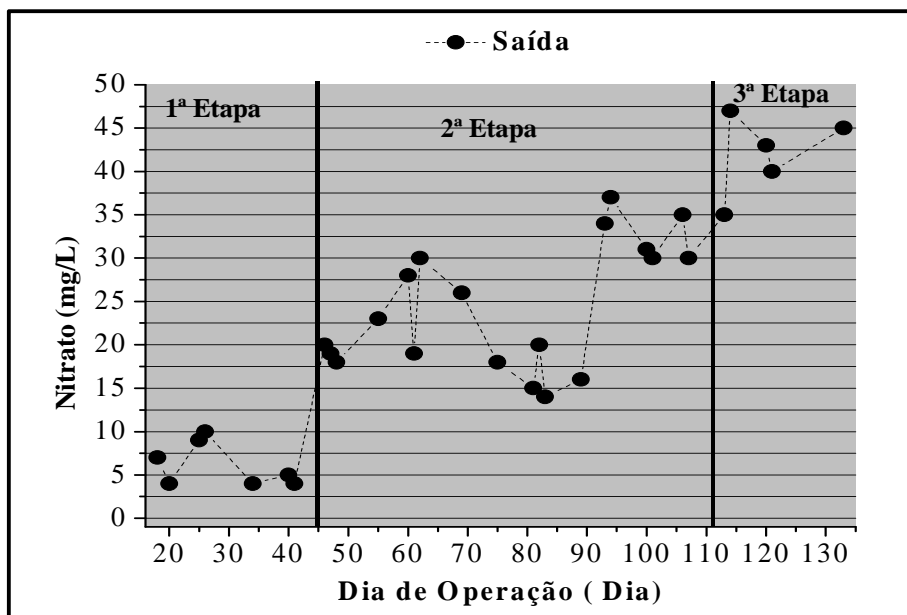


Figura 5.22- Perfil de concentração de Nitrato na saída do sistema FBAS

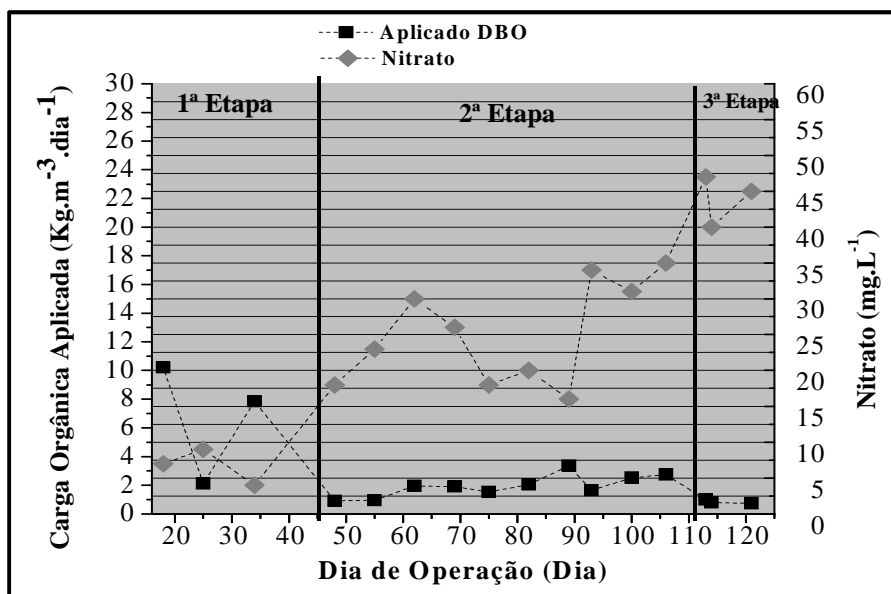


Figura 5.23- Carga orgânica aplicada (DBO) e produção de nitrato no FBAS durante as 3 etapas investigadas

O aumento da concentração de nitrato evidenciado durante a Etapa 2, confirma a ocorrência de nitrificação, mantendo-se na Etapa 3 com uma maior produção de nitrato, e conseqüentemente uma maior conversão de nitrogênio amoniacal a nitrato, confirmando

um melhor desempenho no processo de nitrificação. Nestas duas etapas foram aplicadas a mesmas vazões ($0,2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), portanto mesmas cargas hidráulicas, mas vale destacar que Etapa 3 proporcionou uma melhoria na qualidade do efluente RALF, que em seguida era fornecido a unidade experimental, essa melhoria foi em termo de matéria orgânica, portanto a última etapa teve uma menor carga hidráulica (Figura 5.23)

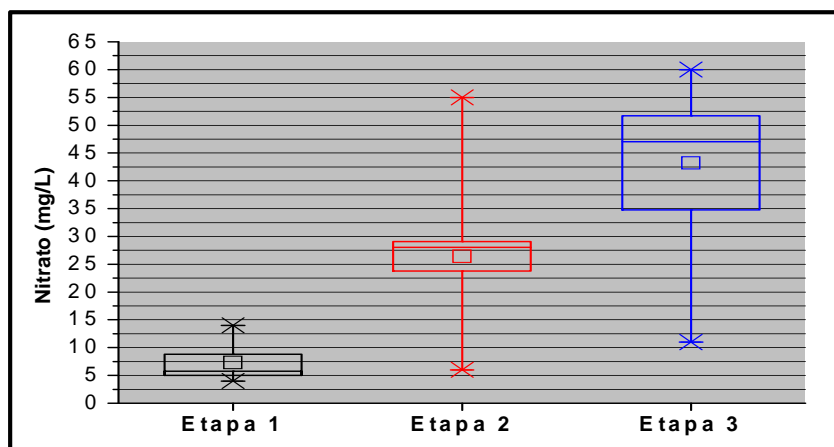


Figura 5.24- Box-Plot mostrando os valores máximos, mínimos, médios e desvios-padrão dos valores de nitrato

5.9 Monitoramento microbiológico do sistema

Com o objetivo específico do trabalho testou três diferentes cargas orgânicas volumétricas (Etapa 1: $1,29 \text{ kgDBO}/\text{m}^3 \cdot \text{dia}$; Etapa 2: $0,40 \text{ kgDBO}/\text{m}^3 \cdot \text{dia}$ e Etapa 3: $0,19 \text{ kgDBO}/\text{m}^3 \cdot \text{dia}$) para verificar o comportamento da comunidade microbiana nitrificantes responsável pelo processo de nitrificação.

Para o monitoramento microbiológico do sistema foi utilizado à técnica FISH que permite detectar os diferentes grupos filogenéticos presentes no reator. Para este trabalho foram utilizadas sondas específicas para bactérias oxidadoras de amônia (AOB) pertencentes ao grupo das *β -Proteobacteria* representada pela sonda NSO 190 que detecta todas as espécies deste grupo sendo estas: (i) *Nitrospira briensis*, (ii) *Nitrosovibrio tenuis*, (iii) *Nitrosolobus multiformis*, (iv) *Nitrosomonas europaea*, (v) *Nitrosomonas eutropha*, (vi) *Nitrosococcus mobilis* e (vii) *Nitrosomonas C56* (AOI *et al.* 2000; MOBARRY *et al.* 1996). Para especificar ainda mais as bactérias oxidadoras de amônia optou-se por utilizar a sonda NSM 156 que detecta o grupo *Nitrosomonas* sendo esta a clássica e principal bactéria oxidadora de amônia encontrada em reatores para o processo de nitrificação. Para as bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) pertencentes ao grupo α -

Proteobacteria utilizou-se as sondas NIT 3 e NTSPA 662 representado pelo grupo *Nitrobacter* (MOBARRY *et al.*, 1996) e *Nitrospira* (DAIMS *et al.*, 2000), respectivamente. Os resultados do número de células totais (DAPI) em relação a cada sonda foram quantificados nas duas amostras estudadas durante as três etapas experimentais, conforme mostrado na figura 5.25.

As diferentes condições operacionais impostas durante as três etapas propiciaram diferentes condições ambientais, isto é, com a aplicação de decrescentes cargas orgânicas na parte superior do reator favoreceu um maior desempenho no processo de nitrificação, ou seja, uma maior oxidação do nitrogênio amoniacal e produção de nitrato, que fizeram possíveis as diversas abundâncias de *Bacteria*, AOB e NOB encontradas neste reator.

De acordo com a figura 5.25 observa-se um aumento na abundância relativa em relação ao DAPI de células do domínio *Bacteria* marcada pela sonda EUB338 para a amostra de biofilme ao decorrer das etapas, que também foi verificado com as bactérias nitrificantes (NSM 156, NIT3 e NTSPA662). Vale destacar que a sonda NSO190 que representa as principais bactérias oxidadoras de amônia nas etapas 2 e 3 foram impossíveis de serem quantificadas, devido ao grande número de células detectadas o que é estranho, já que esta sonda possui um número de células inferior ao do domínio *Bacteria* representado pela sonda EUB338, a qual engloba todas as sondas empregadas. Isto pode ser justificado possivelmente por uma falha na metodologia no momento de pipetar a amostra no pocinho.

Para a Etapa 1 (Figura 5.25A) verifica-se uma baixa concentração de nitrificantes AOB+NOB (NSO190, NSM156, NIT 3 e NTSPA662) devido à alta COV ($1,29 \text{ kgDBO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$) imposta nesta etapa. Isto pode ser explicado pela intensa competição por oxigênio e espaço entre nitrificantes e bactérias heterotróficas, em que estas se sobrepõem na camada externa do biofilme inibindo o fornecimento de oxigênio para as camadas mais internas onde as nitrificantes se desenvolvem. Este fato é constatado pela baixa abundância de bactérias oxidadoras de amônia (AOB), sonda NSO 190 representando 15% das células totais. Elenter *et al.*, (2007) obteve 3,5% de células em relação a sonda EUB 338, aplicando taxas de aplicação superficial (TAS) de $0,015 \text{ KgDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$ sob a forma de acetato em um reator tubular de biofilme. As nitrito oxidantes representaram 38% das células totais coradas com DAPI, enquanto a sonda EUB 338 chegou a um total de 93%.

A mudança do comportamento da comunidade nitrificante é verificada na 2ª etapa, com a redução gradual da carga orgânica para $0,40 \text{ kgDBO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ favoreceu o desenvolvimento de um maior número de bactérias nitrificantes (AOB+NOB) igual a 68%, principalmente de *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, marcadas pela sonda NSM 156 e NTSPA 662, respectivamente. A sonda NSO 190 que representa o grupo das bactérias oxidadoras de amônia aumentou consideravelmente até que sua quantificação ficou impossível de ser realizada, mesmo com as diluições realizadas. AOI *et al.*, (2000) constatou que a redução da relação COT/NH_4^+ de 4 para 1,5 as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) marcadas pela sonda NSO 190 ampliaram a sua área de crescimento para a parte exterior do biofilme ocupado antes pelas bactérias heterotróficas. Isto reforça a ideia de que a aplicação de cargas de até $0,40 \text{ KgDBO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ condiciona o desenvolvimento de micro-organismos nitrificantes em reatores de biomassa imobilizada (LE BIHAN & LESSARD, 2003).

Tabela - Abundância totais de células do *Dominio Bacteria*, AOB (NSO 190, NSM 156) e NOB (NIT 3 e NTSPA 662)

| Etapa | COV | <i>Dominio Bacteria</i> | | AOB | | | NOB | |
|-----------------------------|------|------------------------------|------------|------------|-------|--------------|-----|--|
| | | EUB 338 | NSO 190 | NSM 156 | NIT 3 | NTSPA 662 | | |
| (KgDBO.m ³ .dia) | | Abundância Relativa DAPI (%) | | | | | | |
| 1 | 1,29 | 93±3 | 15±26 | 8±13 | 5±7 | 10±21 | | |
| 2 | 0,4 | 96±25 | - | 30±8 | 12±13 | 16±17 | | |
| 3 | 0,2 | 95±17 | - | 35±10 | 9±28 | 25±17 | | |

Com a introdução da 3ª Etapa configurada pela aplicação de uma menor COV ($0,20 \text{ kg.DBO. m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$) houve um maior desempenho no processo de nitrificação, acarretando um maior número de bactérias nitrificantes dentro do sistema. As *Nitrosomonas*, principal bactéria oxidadora de amônia (AOB) teve um aumento de 30% para 35% (Tabela 5.1) em relação à 2ª Etapa evidenciando uma maior oxidação do nitrogênio amoniacal, enquanto as NOB (NIT 3 e NTSPA 662) apresentaram 34% de células totais em relação ao DAPI. Missagia (2010) observou remoções de amônia significativas quando abundância relativa de NOB estava acima de 30%, considerando a aplicação de uma COV de $0,24 \text{ kgDBO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$. Kindaichi *et al.*, (2004) relataram porcentagens de 22% para as AOB e 28% para as NOB em relação a EUB 338.

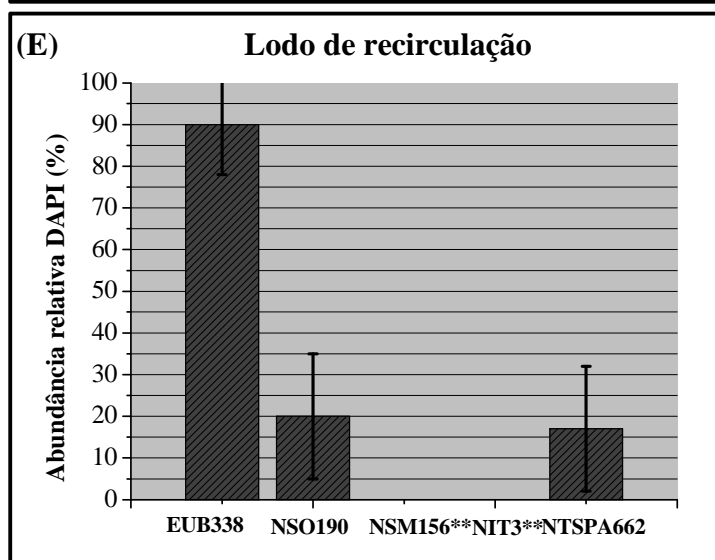
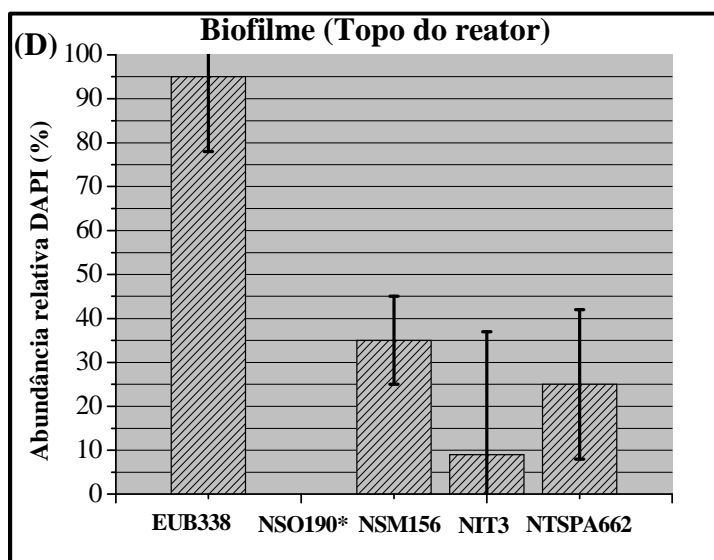
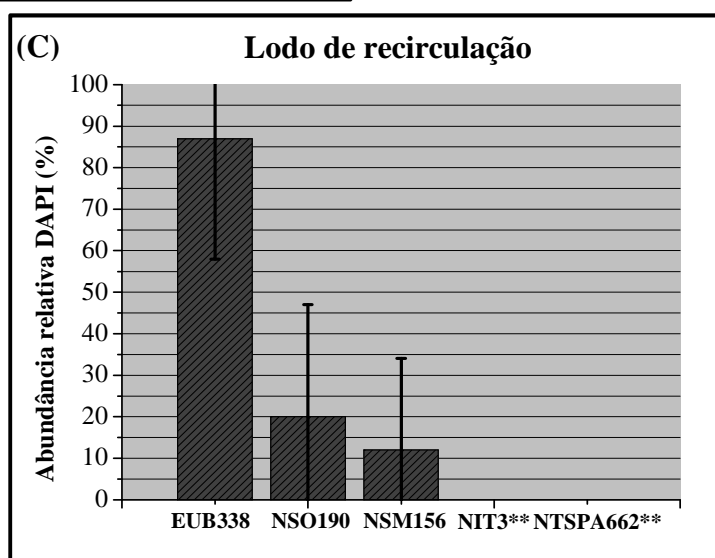
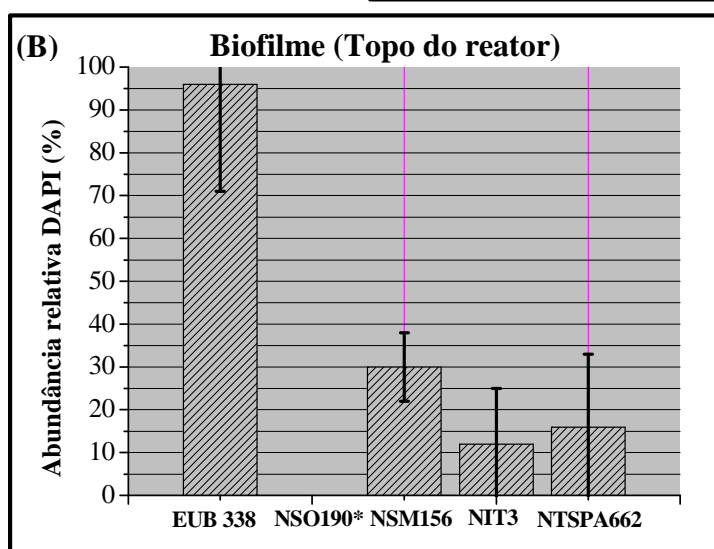
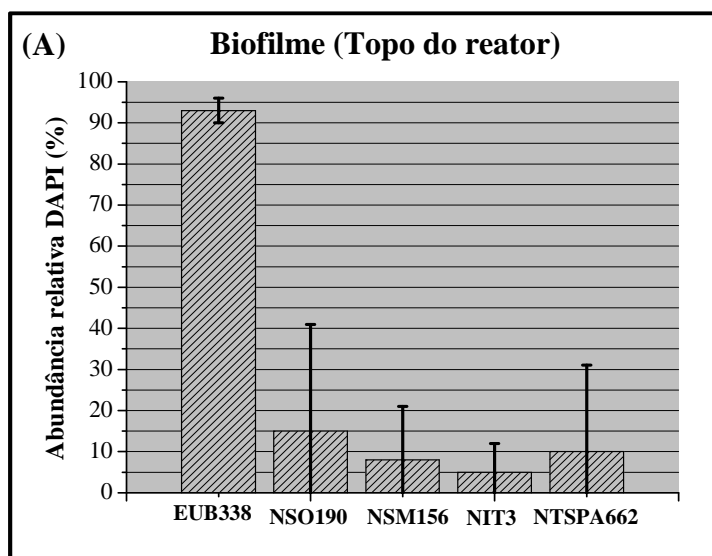


Figura 5.25- Quantidade de *Bacteria*, AOB e NOB. Cada gráfico mostra a quantidade relativa de cada sonda comparada ao DAPI (eixo y) contados em 10 campos microscópicos aleatoriamente em duas amostras analisadas (Biofilme no topo do reator e lodo de recirculação). Etapa 1 (A); Etapa 2 (B e C) e Etapa 3 (D e E). Barras de erro=Desvio padrão

*Esta sonda apresentou um grande número de células ficando inviável a sua contagem

5.9.1 Relação entre a abundância de micro-organismos com os resultados físico-químicos

Os resultados das análises físico-químicas das etapas propostas apresentara boa correlação com os dados dos perfis microbiológicos para amostra do biofilme, uma vez que houve uma maior oxidação da amônia e produção de nitrato a partir da aplicação de menores COV ($0,40 \text{ KgDBO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$) verificados a partir da 2ª Etapa.

Os testes de correlação de Pearson apresentaram uma forte correlação entre as contagens de AOB, mais especificamente a sonda NSM 156 que detecta o gênero *Nitrosomonas* e as concentrações de amônia oxidada e DBO Filtrada. Como era esperado a abundância de NSM 156 marcadas com DAPI, apresentaram correlação negativa com as concentrações de amônia oxidada ($r=0,9992$) e DBO Filtrada ($r=0,9941$) (Figura 5.26), ou seja concentrações mais baixas de DBO Filtrada resultaram em maiores quantidades de *Nitrosomonas* e conseqüentemente uma maior oxidação da amônia ao decorrer das etapas.

Estes resultados reforçam a hipótese de que a nitrificação em reatores de biomassa aderida inicia-se quando a DBO Filtrada estiver abaixo de 20 mg.L^{-1} (PARKER & RICHARDS, 1986; ALMEIDA, 2007), resultados próximos ao obtido no presente trabalho (Figura 5.26).

O aumento no número de células NOB em conjunto com a maior produção de nitrato a partir da 2ª Etapa (Figura 5.26) constatou a melhoria no desempenho do processo de nitrificação. O estabelecimento de um maior número de células NOB, principalmente *Nitrospira* (NTSPA 662) na parte superior do reator, apresentou correlação positiva com a concentração de nitrato ($r=0,9449$). Em relação à abundância de células *Nitrobacter* (NIT 3) esta apresentou também uma boa correlação com as concentrações de nitrato ($r=0,8695$).

De acordo com a Figura 5.26 verifica-se que o gênero *Nitrospira* foi predominante maior que a *Nitrobacter* em todas as etapas investigadas, confirmando como a principal bactéria oxidadora de nitrito (NOB) dominantes em ETE's (JURETSCHKO *et al.* 1998; DAIMS *et al.* 2000; SCHRAMM *et al.* 1999). Este resultado aliado às concentrações de nitrato e nitrito (Figura 5.26) confirma que o gênero *Nitrospira* é considerado K-estrategistas, adaptados a baixas concentrações de nitrito e oxigênio, enquanto, a *Nitrobacter* pode ser

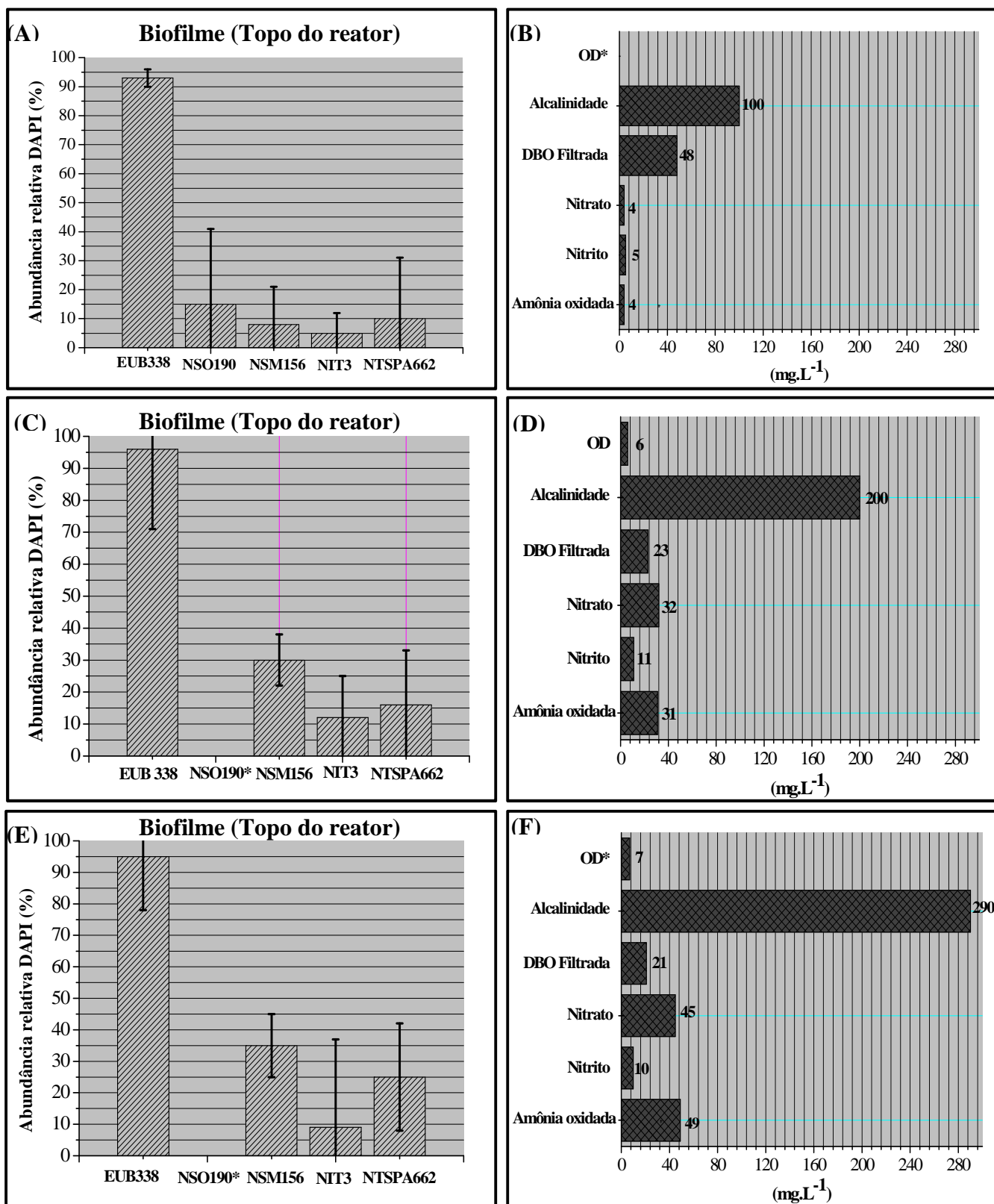


Figura 5.26- Distribuição de *Bacteria* (EUB338), AOB (NSO190 e NSM156), NOB (NIT3 e NTSPA662). Cada gráfico mostra a quantidade relativa de cada sonda comparada ao corante DAPI (eixo y) em diferentes etapas propostas. Ao lado o gráfico das concentrações de Amônia oxidada (mg.L⁻¹), Nitrito (mg.L⁻¹), Nitrato (mg.L⁻¹), DBO filtrada (mg.L⁻¹) e Oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹). Etapa 1 (A e B); Etapa 2 (C e D) e Etapa 3 (E e F)

*A leitura do Oxigênio dissolvido para a Etapa não foi mensurada

considerada uma r-estrategista, com um crescimento acelerado em ambientes com alta concentração de nitrito, possuindo baixa afinidade por nitrito e oxigênio (SCHRAMM *et al.* 1999).

Este comportamento verificado é um reflexo das diferentes estratégias de sobrevivência na maioria das Estações de tratamento de esgoto em que o gênero *Nitrobacter* perde a competição para a *Nitrospira* em ambientes com baixas concentrações de nitrito encontradas na maioria dos sistemas de tratamento de esgoto doméstico (DAIMS *et al.* 2001).

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

❖ O FBAS como pós-reator RALF mostrou um bom desempenho no processo de nitrificação aplicando COV's a partir de 5,1 kgDQO/m³.dia. Considerando os padrões de lançamento previsto pela Resolução CONAMA 430/2011 para N-amoniacal (20 mg N-NH₃-N.L⁻¹), os resultados obtidos mostraram que as Etapas 2 e 3 produziram efluentes capazes de atender a legislação;

❖ O desempenho do sistema FBAS como pós-tratamento do reator RALF na remoção de matéria orgânica foi satisfatória nas 3 etapas investigadas, produzindo efluentes finais para DQO (150 mgO₂.L⁻¹) e DBO (60 mgO₂.L⁻¹) abaixo da legislação do estado do Paraná (CEMA 0070/2009);

❖ O FBAS produziu efluente com baixas concentrações de SST, mostrando o bom desempenho na remoção de sólidos. Considerando o padrão de lançamento vigente do estado, todas as etapas apresentaram eficiências superiores a presente legislação;

❖ A diminuição da COV de 1,29 KgDBO.m⁻³.dia⁻¹ para 0,40 KgDBO.m⁻³.dia⁻¹ contribuiu para o estabelecimento de um maior número de bactérias nitrificantes (AOB e NOB);

❖ A adoção de uma menor COV (0,19 KgDBO.m⁻³.dia⁻¹) propiciou uma modificação na comunidade nitrificante do FBAS evidenciado pelo aumento de AOB e NOB. As *Nitrosomonas* (NSM 156) apresentaram-se em maior número de células. Estas apresentaram forte correlação com a DBO Filtrada e amônia oxidada, justificando que menores concentrações de matéria orgânica, maiores as remoções de amônia;

❖ A densidade de bactérias do gênero *Nitrospira* (Sonda NTSPA 662) foi predominantemente maior que a *Nitrobacter* (NIT 3) em todas as etapas sendo a principal bactéria oxidadora de nitrito (NOB) presente na unidade experimental FBAS. A contagem apresentou fortes correlações com as concentrações de nitrato.

Os resultados mostram a unidade experimental FBAS como um bom sistema no pós-tratamento de reatores anaeróbios por se apresentar com um reator compacto, ter bom desempenho na remoção da matéria orgânica, sólidos suspensos, além de produzir efluentes com Nitrogênio amoniacal abaixo da legislação ambiental, mostrando boas eficiências no processo de nitrificação. A utilização da técnica FISH, foi adequada para detecção de micro-organismos, especialmente a comunidade nitrificante. As diferentes COV's aplicadas durante o trabalho mostraram as distintas abundâncias de bactérias heterotróficas e nitrificantes e como elas se adaptam a diferentes condições ambientais. A maior concentração de nitrato pode ser justificada pelo maior desenvolvimento de bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) como, por exemplo, a *Nitrospira*.

Recomendações para a melhoria da unidade experimental FBAS instalada na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), conhecida como ETE 2-Sul como pós-tratamento de reatores anaeróbios com ênfase na nitrificação incluem um maior controle operacional dos reatores RALF; como limpeza da espuma; técnicos específicos para monitorar a centrífuga, visto que ela se encontrava a maior parte do tempo parada dependendo de pessoas qualificadas. . Com relação ao FBAS podemos citar o aumento dos pontos de monitoramento ao longo da altura do reator para verificar as concentrações de amônia, nitrito, nitrato, DBO em relação à abundância de micro-organismos específicos para a nitrificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAKRA, A; UTAKER, J.B; NES, I.F. Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. p. 237-242, 2001.

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

AISSE, M. M; JUNGERSEN, D; ALEM SOBRINHO, P (2001). **Avaliação do sistema reator UASB e Filtro biológico para o tratamento de esgoto sanitário**. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: Coletânea de trabalhos técnicos.

AISSE, M.M.; LOBATO,M.B.;BONA,A.;GARBOSA,L.P.;ALÉM SOBRINHO, P.A. Avaliação do sistema Reator UASB e Filtro Biológico Aerado Submerso para o Tratamento de Esgoto Sanitário. **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 21, João Pessoa, 2001. Anais. Rio de Janeiro, ABES. 8p. II-052, 2001b.

ALEM SOBRINHO, P; ROLO, M.C; CHAGAS, F.A. Alterações operacionais em filtros biológicos aerados submersos de alta taxa para se obter nitrificação. In: **24º CONGRESSO DE ENGENHARIA SANITARIA E AMBIENTAL - ABES**, Anais..., Belo Horizonte, 2007.

ALMEIDA, P. G. S. **Efeito de diferentes tipos de meio suporte no desempenho de filtros biológicos percoladores aplicados ao pós-tratamento de efluentes de reatores UASB, com ênfase na nitrificação**. 113 p. Dissertação. Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2007.

ALMEIDA, A. O. **Reator com leito de biomassa aderida aerado parcialmente aplicado ao tratamento de esgoto sanitário**. 158 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), 2010.

AMANN, R. I; KRUMHOLZ, L; STAHL, D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**. v. 172, nº 2, p. 762-770, 1990.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 59, nº 2, p. 143-169, 1995.

AMANN, R. I; FUCHS, B. M; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. **Environmental Biotechnology**. v. 12, p. 231-236, 2001.

AMANN, R.I., FUCHS, B.M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. **Natural Reviews Microbiology**. v. 6,p. 339–348, 2008.

AMANN, R; GLOCKNER, F. O; NEEF, A. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. **FEMS Microbiology Reviews**. p. 191-200, 1997.

AOI, Y; MIYOSHI, T; OKAMOTO, T; TSUNEDA; HIRATA, A; KITAYAMA, A; NAGANUME, T. Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 90, n° 3, p. 234-240, 2000.

AOI, Y. *In Situ* Identification of microorganisms in biofilm communities. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 94, n° 6, p. 552-556, 2001.

APHA. **Standard Methods for the Examination of water and Wastewater**. 20ª ed. United States of América. American Public Health Association, 2005.

ASLAN, S., CAKICI, H., 2007, "Biological denitrification of drinking water in a slow sand filter", **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, n. 1-2, pp. 253-258.

BARÉA, L, C (2006). RALF, Reator anaeróbio de manto de lodo e fluxo ascendente reduzindo custo e economizando energia no tratamento de esgotos. Disponível em: [http://www.sanepar.com.br/sanepar/calandrakbx/filesmng.nsf/1B9DF09C9EAE4D2B832573760042EB40/\\$File/APRESENTA%C3%87%C3%83O_RALF_SANEPAR%20-.pdf?OpenElement](http://www.sanepar.com.br/sanepar/calandrakbx/filesmng.nsf/1B9DF09C9EAE4D2B832573760042EB40/$File/APRESENTA%C3%87%C3%83O_RALF_SANEPAR%20-.pdf?OpenElement). Acessado em: 26/08/12 às 23:10 hs.

BIESTERFELD, S.; FIGUEROA, L. Nitrifying biofilm development with time: activity versus phylogenetic composition. **Water Environment Research**, 74 :(5), pp. 470-478, 2003.

BOLZANI, H. R. **O efeito da manutenção e das condições operacionais no desempenho de estações de tratamento de esgoto**. 152 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Urbana)- Universidade Estadual de Maringá, 2011.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (2001). Portaria nº 1.469/2000. 29 de outubro de 2000, Controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, **Fundação Nacional de Saúde**, 2001. 32 p.

CHAGAS, A. F. **Influência da taxa de recirculação de lodo no processo de nitrificação em sistema de FBAS precedido de reator UASB**. 2006. 152 p. Dissertação de Mestrado-Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CHEN, S; LING, J; BLANCHETON, J. Nitrification kinetics of biofilm as affected water quality factors. **Aquacultural Engineering**. v. 34, p. 179-197, 2006.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Vol. 5 – reatores anaeróbios**, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG, 2a. edição, 380 p. 2007.

CONAMA. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em:<www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>Acesso em: 25 Abril 2011.

COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DO PARANÁ. **Programa de Educação e Qualificação**: Tratando o Esgoto - Ambiente Legal. 2005.

DAIMS, H.; NIELSEN, P. H.; NIELSEN, J. L.; JURETSCHKO, S., WAGNER, M. Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and *in situ* physiology. **Water Science and Technology**. v 41, p.85-90, 2000.

DAIMS, H.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H.; SCHLEIFER, K.-H.; WAGNER, M. *In situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**.v 67, p. 5273-5284, 2001.

DELATOLLA, R; TUFENKJI; COMEAU, Y; LAMARRE, D; GADBOIS; BERK, D. In situ characterization of nitrifying biofilm: Minimizing biomass loss and preserving perspective. **Water Research**. v. 42, p. 1775-1787, 2009.

DEZZOTI, M.; SANT'ANNA JR.; BASSIN, J.P. **Processos biológicos avançados para tratamentos de efluentes e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

DIONISI, H. M.; LAYTON, A. C.; HARMS, G.; GREGORY, I. R.; ROBINSON, K. G.; SAYLER, G. S. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, 68:245–253, 2002.

ELENER, D; MILFERSTEDT, K; ZHANG, W; HAUSNER, M; MORGENROTH, E. Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. **Water Research**. v. 41, p. 4657-4671, 2007.

Environment Protect Agency. **Nutrient control design manual**. EPA/600/R-09/012. Cincinnati, Ohio.2009.

FDZ-POLANCO, F.; MÉNDEZ, E.; URUEÑA, M.A.; VILLAVERDE, S.M.; GARCÍA, P.A. Spatial distribution of heterotrophs and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification. **Water Research**. v.34, n.16, p. 4081-4089, 2000.

FIGUEROA, L; SILVERSTEIN, J. The effect of particulate organic matter on biofilm nitrification, **Water Environment Research**, v. 64, p. 728, 1992.

FLORENCIO, L; ALMEIDA, P. G. S; MENDONÇA, N. M; JUNIOR, I. V; ANDRADE NETO, C. O PIVELI, R.P; CHERNICHARO, C. A. L. **Impacto dos nutrientes do esgoto lançado em corpos d'água. Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. In: MOTA, F. S. B. e VON SPERLING, M. (Coordenadores) Nitrificação em reatores aeróbios com biomassa aderida. Rio de Janeiro: Projeto PROSAB 5, 2009. p. 263-293.

FOX, G. E; PECHMAN, K. R; WOESE, C. R. Comparative catolging of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to procaryotic systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**. p. 44-57, 1977.

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 Microbiology Biotechnology**. v.26, p. 1981-1990, 2010.

GÁLVEZ, J.M; GÓMEZ, M. A; HONTORIA, E; GONZÁLEZ-LOPEZ. Influence of hydraulic loading and flowrate on urban wastewater nitrogen removal with a submerged fixed-film reactor. **Journal of Hazardous**. V. 101, p. 219-229, 2003.

GIESEKE, A; PURKHOLD, U; WAGNER, M; AMANN, R; SCHRAMM, A. Community Structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 1351-1362, 2001.

GIOVANNONI, S.J., et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v. 345, p. 60-63, 1990.

GIUSTINA, S. V. D; MIRANDA, L, A, S; MONTEGGIA, L, O. Remoção de matéria orgânica e sólidos suspensos por nova configuração de biofiltro aeróbio submerso no pós-tratamento de efluente de reator UASB. **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. V. 15, nº 03, p. 257-266, 2010.

GONÇALVES, R.F.; ARAÚJO, V.L.; CHERNICHARO, C.A. Tratamento secundário de esgoto doméstico sanitário através da associação em série de reatores UASB e biofiltros aerados submersos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19, Foz do Iguaçu, 1997. Anais, Rio de Janeiro, ABES. p. 450-61, 1996.

GONÇALVES, R.F. et al. **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores de biofilme**. In: CHERNICHARO, C.A.L. (Coord.). Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Belo Horizonte: Projeto PROSAB 2, 2001. p. 171-278.

GOUVEIA DA COSTA. CONSULTORIA E PROJETOS DE ENGENHARIA S/C. **Projeto de Engenharia da Ampliação e Pós Tratamento, Disposição de Lodo e Lançamento de Efluentes das ETE's de Maringá - PR**. SANEPAR, Maringá, 2000.

GRADY, C.P.L.J; LIM, H.C. **Biological wastewater treatment: theory and applications**. New York: Marcel Dekker Inc, 1980. 964 p.

HAGOPIAN, D.S; RILEY, J.G. A closer look at the bacteriology of nitrification. **Aquacultural Engineering**, v.18. p.223-244, 1998.

HELMER-MADHOK, C.; SCHMID, M.; FILIPOV, E.; GAUL, T.; HIPPEN, A.; ROSENWINKEL, K. H.; SEYFRIED, C. F.; WAGNER, M.; KUNST, S. Deammonification in biofilm systems: population structure and function. **Water Science and Technology**, v.39, p.13-21, 2002.

HIRAKAWA, C.; PIVELI, R.P.; ALEM SOBRINHO, P. Biofiltro aerado submerso aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator UASB-Estudo em escala piloto com esgoto sanitário. In: **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2002. V.7, nº 1.

IAMAMOTO, C. Y. **Remoção de nitrogênio de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal em reator contendo biomassa em suspensão operado em bateladas sequenciais e aeração intermitente**. Tese de Doutorado (

Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 157 p. 2006.

JORDÃO, E.P & PESSÔA, C.A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 4ª ed. Rio de Janeiro: ABES, 720p, 2005.

JURETSCHKO, S; TIMMERMANN, G; SCHIMID, M; SCHLEIFER, K.H; POMMERING-ROSER, A; KOOPS, H.P; WAGNER, M. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 3042-3051, 1998.

KIELING, D.D. **Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas**. Tese de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2004.

KINDAICHI, T., ITO, T., OKABE, S. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography– fluorescence in situ hybridization. **Applied Environmental and Microbiology**. 70 (3), 1641–1650, 2004.

KOENIG, A.; LIU, L. H. Kinetic model of autrophic denitrification in sulphur packed-bed reactors. **Water Research**. v. 35, nº 08, p. 1969-1978, 2001.

KOOPS, H. P; ROSER, A.P. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria amphasizing cultured species. **FEMS Microbiology Ecology**. v.37, p. 1-9, 2001.

LESSARD, P; LE BIHAN, Y. Fixed film process. In: MARA, D.; HORAN, N. **The handbook of water and wastewater microbiology**. Elsevier: 2003. 819 p.

LIU, Y. X; YANG, T. O; YUAN, D. X; WU, X. Y. Study of municipal wastewater treatment with oyster shell as biological aerated filter medium. **Desalination**, p. 149-153, 2010.

MEDEIROS, M. **Pós-tratamento de efluente de lagoa facultativa fotossintética em filtros biológicos percoladores visando remoção de nitrogênio amoniacal**. 157 p. Dissertação de Mestrado-Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2011.

MENDONZA-ESPINOSA, L; STEPHENSON, T. A review of biological aerated filters (BAFs) for wastewater treatment. **Environmental Engineering Science**. V. 16, Nº 3, 1999.

MERTOGLU, B; CALIL, B; GIRGIN, E; INANC, B; OZTURK, I. Comparative Analysis of nitrifying bacteria in full-scale oxidation ditch and aerated nitrification biofilter by using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Environmental Science and Health**. v. 40, p. 937-948, 2005.

METCALFY; EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4ª ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 1819 p.

MISSAGIA, B. **Estudo das comunidades bacterianas em filtros biológicos percoladores utilizados para o pós-tratamento de efluentes de um reator UASB**. 2010. 113 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais. 2010.

MOBARRY, B.K., WAGNER, M., URBAIN, V., RITTMANN, B.E., STAHL, D.A. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. **Applied Environmental Microbiology**. p. 2156–2162, 1996.

MORGAN-SAGASTUME, J.M; NOYOLA, A. Evaluation of an aerobic submerged filter packed with volcanic scoria. **Bioresource Technology**. V. 99, p. 2528-2536, 2008.

OHASHI A; SILVA D. G; RITTMANN B.E. Influence of substrate C/N ratio on biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. **Water Science and Technology** 32(8):75–84, 1995.

OLSEN, G. J; LANE, D. J; GIOVANNONI, S. J; PACE, N; STAHL, D. A. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. **Annual Reviews Microbiology**. V. 40, p. 337-365, 1986.

OKABE, S; SATOH, H; WATANABE, Y. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. **Applied and Environmental Microbiology**. Julho, p. 3182-3191, 1999.

OSORIO, F., HONTORIA, E. Wastewater treatment with a double-layer submerged biological aerated filter using waste materials as biofilm support. **Journal Environmental Manager**. 65, 79–84, 2002.

PARK, H. D; NOGUEIRA, D. R. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. **Water Research**. v.38, p. 3275-3286, 2004.

PARKER, D.S.; RICHARDS, T. Nitrification in trickling filters. **Journal WPCF**, v. 58, nº9, p 896-901, 1986.

PERSON, F; WIK, T; SORENSSON, F; HERMANSSON, M. Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter. **Water Research**. v. 36, p.1439-1448, 2002.

ROZIC, M; CERJAN-STEFANOVIC, S; KURAJICA, S; VANCINA, V; HODZIC, E. Ammoniacal nitrogen removal from water by treatment with clays and zeolites. **Water Research**. V. 34, Nº 14, p. 3675-3681, 2000.

SANTOS, A.S.P. **Avaliação de desempenho de um filtro biológico percolador em diferentes meios suporte plásticos**. 2005. 81p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

SANZ, J. L; KOCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry** 42: 119–133, 2007

SCHMIDT *et al.* New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater. **FEMS Microbiology**. v. 27, p. 481-492, 2003.

SCHRAMM, A., LARSEN, L.H., REVSBECH, N.P., RAMSING, N.B., AMANN, R., SCHLEIFER, K.H. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 4641-4647, 1996.

SCHRAMM, A; DE BEER, D; VAN DEN HEUVEL, J.C; OTTENGRAF, S; AMANN, R. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. Along a macrosclae gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 3690-3696, August, 1999.

SCHRAMM, A; DE BEER, D; GIESEKE, A; AMANN, R. Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. **Environmental Microbiology**. p. 680-686, 2000.

SOUSA, J. T.; HENRIQUE, I. N.; LEITE, V. D.; LOPES, W. S. Tratamento de águas residuárias: uma proposta para a sustentabilidade ambiental. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Paraíba, Suplemento Especial, n. 1, p. 90-97. 2006.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J.W. Biofilm as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p.187-209, 2002.

SURAMPALLI, R.; TYAGI, R.D.; SCHEIBLE, O.K.; HEIDMAN, J.A. Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 61, p. 151-157, 1997.

VANDEVIVERE, P. e KIRCHMAN, D. L. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a *Bacterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, 59:3280-3286, 1993.

VIEIRA, W. L. P. B.; CARVALHO, E. H.; CAMPOS, L. C. Desempenho do reator UASB da ETE Lages - Aparecida de Goiânia em sua fase inicial de operação. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**, 23., 2005. Campo Grande. Anais... Campo Grande: ABES, 2005.

VILLAVERDE, S.; GARCIA-ENCINA, P.A.; FDZ-POLANCO, F. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. **Water Research**, v.31, p. 1180-1186, 1997.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. In: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto**. 3a ed. Minas Gerais: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, v.1, 452 p, 2005.

WAGNER, M; AMANN, R; LEMMER; SCHLEIFER, K. H. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 1520-1525, Maio, 1993.

WAGNER, M., AMANN, R., KAMPFER, P., ASSMUS, B., HARTMANN, A., HUTZLER, P., SPRINGER, N., SCHLIEFER, K.-H.. Identification and in situ detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. **Syst. Appl. Microbiol.** 17, 405–417, 1994.

WIJEYEKOON, S.; MINO, T.; SATOH, H.; MATSUO, T. Effects of substrate loading rate on biofilm structure, **Water Research**, 38:2479-2488, 2004.

WOESE, C. R; FOX, G, E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** V. 74, p. 5088-5091, 1977.

WOESE, C. R; KANDLER, O; WHELLIS, M. L. Towards a natural system of organism proposal for the domains Archea, Bacteria and Eucarya. **Prac. Nat. Acad. Sci. USA.** V. 87, p. 4576-4579, 1990.

XAVIER, J. B *et al.* Monitorização e Modelação da Estrutura de Biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, n. 76, p.2-13, 2003.

