



REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NUTRIENTES EM SISTEMAS COMPACTOS E
ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA
MOLECULAR

João Paulo Bassin

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: Márcia Walquíria de Carvalho
Dezotti
Alexandre Soares Rosado
Mark van Loosdrecht

Rio de Janeiro
Junho de 2012

REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NUTRIENTES EM SISTEMAS COMPACTOS E
ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA
MOLECULAR

João Paulo Bassin

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Profª. Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti, D.Sc.

Prof. Alexandre Soares Rosado, D. Sc.

Prof. Tito Livio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr., D.Sc.

Prof. Marcos von Sperling, PhD

Prof. Eugênio Foresti, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2012

Bassin, João Paulo

Remoção Biológica de Nutrientes em Sistemas Compactos e Estudo da Diversidade Microbiana por Técnicas De Biologia Molecular/ João Paulo Bassin – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

XXI, 209 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Alexandre Soares Rosado

Mark van Loosdrecht

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2012.

Referencias Bibliográficas: p. 184-209.

1. Remoção de nutrientes. 2. Biofilmes. 3. Nitrificação. 4. Biologia molecular. I. Dezotti, Márcia Walquíria de Carvalho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Durante todo o período de doutorado, muitas pessoas estiveram direta ou indiretamente envolvidas nos meus projetos de pesquisa. Dessa forma, eu gostaria de prestar agradecimento a essas pessoas.

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Márcia Dezotti, a qual sempre me incentivou e sempre confiou na execução de um trabalho consistente e promissor. Além disso, permitiu que eu ocupasse grande parte das dependências do laboratório para a execução de uma quantidade significativa de experimentos. A minha ida para o exterior está diretamente relacionada à sua excelente visão de mundo e comprometimento com o aprendizado de seus alunos. Os meus sinceros agradecimentos por tudo!

Gostaria de agradecer ao meu também orientador, Professor Alexandre Rosado, por ter me concedido a possibilidade de fazer parte de seu laboratório, no qual me deparei com um mundo totalmente distinto daquele que eu estava acostumado a vivenciar. Esse mundo, referente às técnicas de biologia molecular, possibilitou a realização de estudos mais completos na área de tratamento biológico de águas residuárias e certamente permitiu um grande avanço nos meus conhecimentos.

Gostaria de agradecer ao meu orientador na Universidade Técnica de Delft (TU Delt - Holanda), Professor Mark van Loosdrecht, por ter me aceitado como seu aluno (no início como aluno convidado) em seu excelente grupo de pesquisa. Jamais vou esquecer essa oportunidade única de ter trabalhado em um dos melhores grupos (senão o melhor) de biotecnologia ambiental do mundo. Muito obrigado por ter permitido executar tantas pesquisas distintas, todas elas contando com as melhores condições experimentais e infraestrutura de laboratório. Agradeço pela confiança ao ter posteriormente estendido minha estadia em seu grupo e me aceitado como aluno da TU Delft, após a execução de inúmeros trabalhos e publicação dos mesmos na literatura.

Ao meu supervisor direto na TU Delft, Robbert Kleerebezem, os meus sinceros agradecimentos por ter sido um excelente conselheiro e uma pessoa amiga e descontraída. Todas as minhas realizações na TU Delft não teriam sido as mesmas sem a sua ajuda. Muito obrigado!

Gostaria de agradecer ao Gerard Muyzer, meu supervisor nos estudos envolvendo técnicas de ecologia microbiana molecular, com o qual aprendi muitas

coisas importantes na área, fazendo com que o nível dos trabalhos tenha aumentado substancialmente.

Sou também muito grato ao Professor Geraldo Lippel Sant'Anna Jr., uma pessoa que sempre vem acompanhando as minhas pesquisas desde o meu mestrado. Muito obrigado pela ajuda em diversos momentos (inclusive nos primeiros contatos com o exterior) e pelas trocas de ideias valiosas que sempre me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço ao Professor Willibaldo Schmidell Netto, a quem devo a escolha da área do conhecimento que abracei. Certamente minha vida poderia ter tomado outros rumos caso não encontrasse esse grande mestre durante a minha jornada estudantil.

Gostaria de agradecer ao apoio financeiro fornecido pelo CNPq e CAPES e pelo auxílio prestado pela TU Delft.

Aos amigos de laboratório na TU Delft, Mario Pronk, Mari Winkler e Yuemei Lin, com os quais desenvolvi pesquisas em conjunto, meus sinceros agradecimentos. Foram grandes aprendizados nesses trabalhos em cooperação.

Agradeço aos técnicos de laboratório da TU Delft, Ben Abbas, Jan Hemmink, Udo van Dongen, Rob Kerste e Dirk Geerts, por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos, facilitando o desenvolvimento dos projetos de pesquisa.

Eu agradeço aos meus colegas do LABPOL, Vivian Andrade, Samanta Pereira, Isabelli Dias, Rafael Almada, Barbara Andrade, Bianca Souza, Bruno Santos, Antonio Couto e Marcela Brasil, e do LEMM, Raquel Peixoto, Lia Teixeira, Caio Rachid, Deborah Leite, Henrique Fragoso, Edir Martins, Adriana Lopes, Flavia Lima, Hugo Jesus, Kátia Araújo, Luiza Andrade, Simone Marques e Flávio Alves, pelo ambiente de amizade e descontração durante o período de pesquisa no Brasil.

Obrigado aos demais amigos da TU Delft, Tommaso Lotti, Marco Casola, Florence Marty, Miranda Verhulst, Yang Jiang, Jelmer Tamis, Helena Moralejo Gárate, Andrea Radu, Simona Bottero, Matthijs Daelman, Shiva Shayegan Salek, Leoni Marang, Ehab Yassin, Nienke Bruinsma, Javier Claros, Olga Ilie, Cristian Picioreanu, Weren de Vet, Peter Mooij, Henk Jonkers, Kees van Sluis, Merle de Kreuk, Marlies Kampschreur, Gijs Kuenen, Geert van der Kraan, Samira Mohamad, Albertas Janulevicius, Robbert Binneveld e demais estudantes que passaram pelo nosso grupo. Certamente a convivência harmoniosa foi muito importante durante a minha estadia no exterior.

Gostaria de agradecer a algumas pessoas da Petrobrás, em especial à Ana Claudia Cerqueira e Vânia Santiago pelo companheirismo em diversos momentos ao longo da jornada do doutorado e pela colaboração em diversas ocasiões.

Agradeço aos funcionários da secretaria do PEQ, Luciana Lancellote, Arthur H. dos Santos, Paula Barbosa e Vera L. S. da Cruz, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agradeço ao pessoal de apoio da TU Delft, Sjaak Lispet, Jos Lispet, Robert van Tuijll, Astrid van Uijen, Hans Kemper e todos os empregados da oficina pelo auxílio técnico em diversas ocasiões.

Agradeço a contribuição prestada pelos membros da banca de doutorado, Professores Marcos Von Sperling, Eugênio Foresti e Tito Livio Moitinho Alves.

Meus agradecimentos especiais aos meus amigos do Brasil, com os quais dividi grande parte da minha vida desde minha chegada ao Rio de Janeiro: Carlos Alberto das Chagas Jr., Fabio Souza Toniolo, Fabiano Castoldi e Robinson Manfro. Obrigado pela amizade e pelo ambiente agradável que propiciaram. Nossas aventuras serão lembradas para sempre em minha memória.

Por fim, eu expresso minha gratidão máxima à minha família, minha mãe Gema P. Bassin, meu pai, Ijair J. Bassin e minha irmã, Gabriele Bassin, por estarem sempre presentes em minha vida, me dando força e acreditando no meu potencial. Essa vitória é nossa mãe!

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NUTRIENTES EM SISTEMAS COMPACTOS E
ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA
MOLECULAR

João Paulo Bassin

Junho/2012

Orientadores: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Alexandre Soares Rosado

Mark van Loosdrecht

Programa: Engenharia Química

Esse trabalho esteve associado a diferentes investigações a respeito da remoção biológica de nutrientes em sistemas compactos. Em estudo envolvendo a formação de biofilme em sistemas de leito móvel, observou-se que a aplicação de um período de partida heterotrófico favoreceu o enriquecimento do biofilme em nitrificantes. Em pesquisa vinculada à operação de reatores de lodo granular aeróbio, destinados à remoção simultânea de nitrogênio e fósforo, foi possível controlar a competição entre organismos acumuladores de polifosfato (PAO) e organismos acumuladores de glicogênio (GAO) por meio da remoção seletiva de biomassa de diferentes partes do leito de lodo estratificado. Baixas concentrações de oxigênio dissolvido favoreceram o desenvolvimento de PAO desnitrificantes, intensificando a remoção anóxica de fosfato acoplada à desnitrificação. Estudos adicionais ligados ao efeito da salinidade em sistemas de lodo nitrificante suspenso e de lodo granular aeróbio também foram realizados. Observou-se que diferentes estratégias de adaptação ao sal ocasionaram diferentes modificações na comunidade microbiana na cultura nitrificante. No processo de grânulos aeróbios, completa inativação da remoção biológica de fosfato e acúmulo excessivo de nitrito foram observados em concentrações de sal de 33 gNaCl/L.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

BIOLOGICAL NUTRIENT REMOVAL IN COMPACT SYSTEMS AND STUDY OF
MICROBIAL DIVERSITY BY MOLECULAR TECHNIQUES

João Paulo Bassin

June/2012

Advisors: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Alexandre Soares Rosado

Mark van Loosdrecht

Department: Chemical Engineering

This work aimed at investigating several aspects regarding biological nutrient removal in compact systems. In a study focusing on biofilm development in moving-bed systems, the application of a heterotrophic start-up phase was observed to favour the enrichment of the biofilm for nitrifiers. In a research involving the operation of aerobic granular sludge reactors accomplishing simultaneous nitrogen and phosphorus removal, an operational strategy of selective sludge removal from specific parts of the segregated sludge bed allowed controlling the competition between polyphosphate-accumulating organisms (PAO) and glycogen-accumulating organisms. Low oxygen concentration favoured the development of denitrifying PAO, enhancing the anoxic removal coupled to denitrification (denitrifying dephosphatation). Additional studies regarding the effect of salt on a suspended nitrifying culture and on the aerobic granular sludge process were also carried out. Different salt adaptation strategies were observed to cause different shifts in the microbial community of the suspended nitrifying culture, although nitrification performance was kept stable. In the aerobic granular sludge process, a complete deterioration of biological phosphate removal and excessive nitrite accumulation were observed at a salinity level of 33 gNaCl/L.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS..... | 2 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 11 |
| 2.1. <i>REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO DE EFLUENTES LÍQUIDOS.....</i> | 11 |
| 2.1.1. <i>Introdução aos processos de remoção de nitrogênio.....</i> | 11 |
| 2.1.2. <i>Nitrificação.....</i> | 13 |
| 2.1.3. <i>Desnitrificação.....</i> | 16 |
| 2.1.4 <i>Novos processos para remoção de Nitrogênio.....</i> | 19 |
| 2.2. <i>REMOÇÃO BIOLÓGICA DE FÓSFORO.....</i> | 21 |
| 2.3. <i>SISTEMAS BIOLÓGICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS.....</i> | 24 |
| 2.3.1. <i>Sistemas biológicos convencionais.....</i> | 24 |
| 2.3.2. <i>Sistemas biológicos compactos.....</i> | 25 |
| 2.4. <i>TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA O ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA.....</i> | 44 |
| 3. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME, NA NITRIFICAÇÃO E NA POPULAÇÃO DE ORGANISMOS NITRIFICANTES EM REATORES DE LEITO MÓVEL COM BIOFILME..... | 48 |
| 3.1. <i>INTRODUÇÃO.....</i> | 48 |
| 3.2. <i>MATERIAIS E MÉTODOS.....</i> | 50 |
| 3.2.1. <i>Reatores de leito móvel com biofilme: configuração e condições operacionais.....</i> | 50 |
| 3.2.2. <i>Análise microscópica do biofilme.....</i> | 54 |
| 3.2.3. <i>Hibridização in situ por fluorescência (FISH).....</i> | 55 |
| 3.2.4. <i>Medidas analíticas e procedimentos de cálculo.....</i> | 56 |
| 3.3. <i>RESULTADOS.....</i> | 59 |
| 3.3.1. <i>Fase de partida: desenvolvimento do biofilme.....</i> | 59 |
| 3.3.2. <i>Polissacarídeos e proteínas do biofilme.....</i> | 63 |
| 3.3.3. <i>Desempenho da nitrificação nos reatores de leito móvel com biofilme.....</i> | 65 |
| 3.3.4. <i>Populações de bactérias oxidadoras de amônio (AOB) e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) avaliadas por meio de hibridização in situ por fluorescência (FISH).....</i> | 70 |
| 3.4. <i>DISCUSSÃO.....</i> | 73 |
| 3.4.1. <i>Influência da estratégia de alimentação na formação do biofilme.....</i> | 73 |
| 3.4.2. <i>Efeito da composição do meio de alimentação no processo de nitrificação.....</i> | 75 |
| 3.5. <i>CONCLUSÕES.....</i> | 78 |

| | |
|--|------------|
| 4. REMOÇÃO SIMULTÂNEA DE NITROGÊNIO E FÓSFORO EM REATORES DE LODO GRANULAR OPERADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS | 81 |
| 4.1. INTRODUÇÃO..... | 81 |
| 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS | 85 |
| 4.2.1. Aparato experimental e condições operacionais..... | 85 |
| 4.2.2. Experimentos adicionais..... | 88 |
| 4.2.3. Determinação das propriedades físicas dos grânulos..... | 90 |
| 4.2.4. Medições analíticas | 90 |
| 4.2.5. Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)..... | 91 |
| 4.3. RESULTADOS | 92 |
| 4.3.1. Fase de partida (start-up)..... | 92 |
| 4.3.2. Operação dos reatores de lodo granular aeróbio..... | 93 |
| 4.3.3. Testes de ciclo realizados em condições normais de operação..... | 99 |
| 4.3.4. Experimentos em batelada em condições anóxicas e testes de ciclo em condições completamente anóxicas ou aeróbias..... | 103 |
| 4.3.5. Caracterização geral da comunidade microbiana por meio da técnica de FISH. | 109 |
| 4.3.6. Propriedades físicas dos grânulos aeróbios..... | 111 |
| 4.4. DISCUSSÃO | 112 |
| 4.4.1. Fatores controladores da competição entre PAO e GAO | 112 |
| 4.4.2. Relação entre os principais fatores que influenciam a segregação de biomassa no leito de lodo | 114 |
| 4.4.3. Nitrificação/desnitrificação e consumo de fosfato em condições aeróbias/anóxicas | 116 |
| 4.4.4. PAOI/PAOII e DGAO: implicações nas conversões de nitrogênio e fósforo..... | 119 |
| 4.5. CONCLUSÕES | 121 |
| 5. EFEITO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE ADAPTAÇÃO AO SAL NA DIVERSIDADE MICROBIANA, ATIVIDADE E SEDIMENTAÇÃO DE LODO NITRIFICANTE EM REATORES EM BATELADA SEQUENCIAL | 124 |
| 5.1. INTRODUÇÃO..... | 124 |
| 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS | 125 |
| 5.2.1. Aparato experimental e condições de operação..... | 125 |
| 5.2.2. Métodos analíticos e procedimentos de cálculo..... | 127 |
| 5.2.3. Extração de DNA e amplificação por PCR..... | 127 |
| 5.2.4. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE)..... | 128 |
| 5.2.5. Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)..... | 129 |
| 5.3. RESULTADOS | 130 |

| | |
|---|------------|
| 5.3.1. Nitrificação..... | 130 |
| 5.3.2. Concentração de biomassa e propriedades do lodo..... | 132 |
| 5.3.3. Análise das populações de bactérias oxidadoras de amônio (AOB) e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) por meio da técnica de FISH..... | 140 |
| 5.4. DISCUSSÃO..... | 141 |
| 5.4.1. Efeito de sal na concentração de biomassa e propriedade do lodo..... | 141 |
| 5.4.2. Diferentes estratégias de adaptação ao sal: implicações no processo nitrificante e na estrutura da comunidade microbiana..... | 144 |
| 5.5. CONCLUSÕES..... | 148 |
| 6. EFEITO DE ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE SAL NO PROCESSO DE LODO GRANULAR AERÓBIO: RELACIONANDO ATIVIDADE E ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA | 151 |
| 6.1. INTRODUÇÃO..... | 151 |
| 6.2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 153 |
| 6.2.1. Unidade experimental e condições de operação..... | 153 |
| 6.2.2. Experimentos em batelada..... | 154 |
| 6.2.3. Medições analíticas..... | 155 |
| 6.2.4. Extração de ácidos nucléicos..... | 155 |
| 6.2.5. Transcriptase reversa de RNA e amplificação por PCR..... | 155 |
| 6.2.6. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), excisão e eluição de bandas de DGGE, sequenciamento de DNA e análise filogenética..... | 156 |
| 6.2.7. Hibridização in situ por fluorescência (FISH)..... | 156 |
| 6.3. RESULTADOS..... | 158 |
| 6.3.1. Efeito a longo e curto prazo de sal nos processos de nitrificação/desnitrificação e remoção de fosfato..... | 158 |
| 6.3.2. Análise da comunidade microbiana por meio de DGGE dos fragmentos do gene 16S rRNA..... | 161 |
| 6.3.3. Análise comparativa do DGGE derivado DNA (diversidade) e RNA (funcionalidade)..... | 165 |
| 6.3.4. Estrutura da comunidade de bactérias oxidadoras de amônio (AOB)..... | 166 |
| 6.3.5. Hibridização in situ por fluorescência (FISH)..... | 167 |
| 6.4. DISCUSSÃO..... | 170 |
| 6.4.1. Impacto do aumento da concentração de NaCl na competição entre PAO e GAO170..... | 170 |
| 6.4.2. Impacto do aumento da concentração de NaCl sobre a nitrificação..... | 172 |
| 6.4.3. Mudanças adicionais na estrutura da comunidade microbiana com o aumento da concentração salina..... | 175 |

| | |
|---|------------|
| 6.5. CONCLUSÕES | 176 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 178 |
| 7.1. LODO GRANULAR AERÓBIO VERSUS REATOR DE LEITO MÓVEL COM BIOFILME | 178 |
| 7.2. EFEITO DA SALINIDADE EM SISTEMAS COM BIOMASSA SUSPensa E BIOMASSA GRANULAR.. | 180 |
| 7.3. RELEVÂNCIA DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS A PROCESSOS DE ENGENHARIA AMBIENTAL | 181 |
| REFERÊNCIAS | 184 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Processo acelerado de eutrofização em diferentes corpos d'água, caracterizado pelo excessivo crescimento de algas e plantas aquáticas na superfície dos mesmos. Fonte: Disponível em http://www.flickrriver.com/photos/tags/eutrophication/interesting e http://www.green-blog.org/2008/06/16/eutrophication/ | 4 |
| Figura 2.1: Conversões possíveis entre compostos nitrogenados (adaptado de YE e THOMAS, 2001). | 12 |
| Figura 2.2: Metabolismo de organismos acumuladores de polifosfato em condições anaeróbias ou aeróbias (anóxicas) (adaptado de VAN LOOSDRECHT <i>et al.</i> , 1997a). O metabolismo aeróbio (anóxico) mostrado no esquema representa a situação na qual o substrato externo não está disponível. Os PHA estão representados por PHB no esquema. | 23 |
| Figura 2.3: Ilustração das principais etapas envolvidas no processo convencional de lodos ativados. | 25 |
| Figura 2.4: Representação esquemática de um ciclo de operação de um reator em batelada sequencial (SBR) (adaptado de VON SPERLING, 1996). | 35 |
| Figura 2.5: Reator de leito móvel com biofilme (adaptado de RUSTEN <i>et al.</i> , 2006). | 37 |
| Figura 2.6: Diferentes tipos de materiais suporte da AnoxKaldnes [®] contendo o biofilme aderido (Fonte: Cortesia Veolia). | 38 |
| Figura 2.7: Estrutura do lodo granular. Tamanho real (a), aumento de 7,5x (b), aumento de 20x. | 41 |
| Figura 2.8: Esquema das principais conversões ocorrendo nas diferentes camadas do lodo granular aeróbio durante a fase <i>feast</i> (a) e fase <i>famine</i> (b). A composição das diferentes zonas durante a fase aeróbia depende da concentração de oxigênio dissolvido no <i>bulk</i> . NO _x : NO ₂ ⁻ e/ou NO ₃ ⁻ | 43 |
| Figura 3.1: Representação esquemática dos sistemas MBBR ₁ e MBBR ₂ : 1) afluente acondicionado em bombonas; 2) bomba peristáltica; 3) reator; 4) decantador; 5) ar comprimido; 6) rotâmetro para ajuste da vazão de ar; 7) efluente tratado; 8) eletrodo de pH (não fixo); 9) eletrodo de oxigênio dissolvido (não fixo). | 50 |
| Figura 3.2: Fotos ilustrativas do sistema SBBR; a) Reator (volume útil de 7L); b) Controlador de pH; c) Medidor de oxigênio dissolvido; d) rotâmetro; e) válvula solenóide de entrada; f) válvula solenóide de saída; g) válvula solenóide para adição de barrilha; h) válvula solenóide para controle da aeração; i) reservatório de barrilha; j) eletrodo de pH; l) eletrodo de oxigênio dissolvido; m) agitador; n) painel de controle do PLC; o) computador com programa conectado ao PLC..... | 51 |
| Figura 3.3: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme aderido ao material suporte no final de diferentes regimes operacionais dos reatores de leito móvel com biofilme: (a) regime 3 e (b) regime 5 do MBBR ₁ ; (c) regime 6 e (d) regime 7 do MBBR ₂ ; e (e) regime 11 e (f) regime 12 do SBBR..... | 62 |
| Figura 3.4: Microfotografias da biomassa desprendida dos suportes do (a) MBBR ₁ , aumento de 400×; (b) MBBR ₂ , aumento de 400×; (c) SBBR, aumento de 1000×..... | 63 |
| Figura 3.5: Relação entre concentração de biomassa (expressa em SSV) e concentrações de polissacarídeos (▲) e proteína (■) para os sistemas de leito móvel com biofilme..... | 64 |
| Figura 3.6: Concentrações de polissacarídeos e proteínas do biofilme de todos os sistemas de leito móvel com biofilme. | 65 |

- Figura 3.7: Concentração de amônio afluente (\blacktriangle) e concentração de amônio (Δ), nitrato (\square) e nitrito (\circ) efluente do MBBR₁ (a), MBBR₂ (b) and SBBR (c). A fase de partida (*start-up*) se refere ao período destinado à formação do biofilme. 68
- Figura 3.8: Perfis de concentração de amônio (\blacktriangle), nitrato (\blacksquare), nitrito (\bullet) e oxigênio dissolvido (\diamond) obtidos ao longo dos ciclos de operação durante operação em estado estacionário nos regimes 11-15. As concentrações de amônio, nitrato e nitrito no início do ciclo (tempo 0) foram medidas após a alimentação, no qual o afluente foi diluído com o líquido remanescente do ciclo anterior (percentual de troca de volume de 85%). Uma seta indica o momento a partir do qual a taxa de oxidação de amônio diminuiu ao longo do ciclo, quando as concentrações de nitrito excederam 50 mgNO₂⁻-N/L. 69
- Figura 3.9: Populações de AOB (em vermelho) e NOB (em verde) na comunidade bacteriana total (em azul): a) MBBR₁, regime 1; b) MBBR₁, regime 5; c) MBBR₂, regime 6; d) MBBR₂, regime 9; e) SBBR, regime 11; f) SBBR, regime 14. As AOB aparecem na cor violeta devido à superposição das sondas AOBmix e EUBmix, enquanto as NOB aparecem na cor verde claro devido à superposição das sondas NOBmix e EUBmix. A barra de escala representa 20 μ m. ... 72
- Figura 3.10: Bactérias Anammox (em vermelho) detectadas entre toda a comunidade microbiana (em azul): (a) regime 14 e (b) regime 15. Testes preliminares mostraram que as duas sondas utilizadas para detectar bactérias anammox (AMX 368 e AMX 820) hibridizaram com as mesmas células. Sendo assim, somente uma (AMX 368) foi utilizada para detectar esses organismos específicos. As bactérias anammox aparecem na cor violeta devido à superposição das sondas AMX 368 e EUBmix. A barra de escala indica 10 μ m. 73
- Figura 4.1: Esquema das principais conversões ocorrendo em paralelo na estrutura dos grânulos aeróbios. AOB: bactérias oxidadoras de amônio; NOB: bactérias oxidadoras de nitrito; PAO: organismos acumuladores de polifosfato; DPAO: organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes; GAO: organismos acumuladores de glicogênio; DQO: demanda química de oxigênio; PP: polifosfato. Os organismos desnitrificantes são exemplificados pelos DPAOs e organismos acumuladores de glicogênio desnitrificantes (DGAOs). 84
- Figura 4.2: Representação esquemática da unidade experimental. OD: oxigênio dissolvido; CFM: controlador de fluxo mássico. Os círculos marrons representam o lodo granular aeróbio, enquanto círculos brancos com contorno preto indicam as bolhas de gás. 86
- Figura 4.3: Concentrações de fosfato no afluente (\bullet) e efluente (\circ), liberação de fosfato durante o período de alimentação anaeróbio (\blacktriangle) e remoção de fosfato (\blacksquare) durante a operação dos SBR. A remoção de fosfato não foi levada em consideração na fase C1 (SBR₂₀) e fase C2 (SBR₃₀) quando a concentração de fosfato afluente foi de apenas 2 mgPO₄³⁻-P/L. 94
- Figura 4.4: Concentrações de amônio (Δ), nitrito (\circ) e nitrato (\square) no efluente e remoção de nitrogênio (\diamond) durante a operação dos SBR. A concentração de amônio afluente foi mantida em 60 mgN/L. 94
- Figura 4.5: Análise das populações de PAO/GAO entre todas as bactérias presentes no SBR₂₀ durante as fases A1 e B1 por meio da técnica de FISH. Foram utilizadas combinações de sondas específicas para PAO (PAO462, PAO462 and PAO846, mostrada em vermelho), GAO (GAOQ431 e GAOQ989, mostrada em verde) e toda população bacteriana EUB338 (EUB338I, EUB338II e EUB338III; mostrada em azul). Os PAO aparecem na cor violeta devido à superposição da combinação PAOmix, em vermelho, com a combinação EUBmix, em azul. Os GAO aparecem na cor azul turquesa devido à superposição da combinação GAOmix, em verde, com a combinação EUBmix, e azul. 96
- Figura 4.6: Análise das populações de PAO/GAO entre todas as bactérias presentes no SBR₃₀ durante as fases A2 and B2 por meio da técnica de FISH. Foram utilizadas combinações de sondas específicas para PAO (PAO462, PAO462 and PAO846, mostrada em vermelho), GAO (GAOQ431 e GAOQ989, mostrada em verde) e toda população bacteriana EUB338 (EUB338I, EUB338II e EUB338III; mostrada em azul). Os PAO aparecem na cor violeta devido à

superposição da combinação PAOm_{ix}, em vermelho, com a combinação EUBm_{ix}, em azul. Os GAO aparecem na cor azul turquesa devido à superposição da combinação GAOm_{ix}, em verde, com a combinação EUBm_{ix}, e azul. 97

Figura 4.7: Grânulos de cor branca (a) e análise, por meio de FISH, das populações de PAO/GAO entre todas as bactérias presentes nesses grânulos (b) coletados no SBR₃₀ durante a fase B2a. Foram utilizadas combinações de sondas específicas para PAO (PAO462, PAO462 e PAO846, mostrada em vermelho), GAO (GAOQ431 e GAOQ989, mostrada em verde) e todo o conjunto bacteriano EUB338 (EUB338I, EUB338II e EUB338III; mostrada em azul). A barra de escala indica 20 µm. 98

Figura 4.8: Análise das populações de PAO/GAO entre todas as bactérias presentes no SBR₂₀ (fase C1) e SBR₃₀ (fase C2). Foram utilizadas combinações de sondas específicas para PAO (PAO462, PAO462 e PAO846, mostrada em vermelho), GAO (GAOQ431 e GAOQ989, mostrada em verde) e todo o conjunto bacteriano EUB338 (EUB338I, EUB338II e EUB338III; mostrada em azul). A barra de escala indica 10 µm. 99

Figura 4.9: Testes de ciclo realizados nos SBR durante diferentes fases operacionais: fosfato (▲), amônio (◆), nitrito (●) e nitrato (■) nas fases A1 (SBR₂₀) e A2 (SBR₃₀); fosfato (Δ), amônio (◇), nitrito (○) e nitrato (□) nas fases B1 (SBR₂₀) e B2a (SBR₃₀). As concentrações de amônio e fosfato mostradas no início do ciclo (tempo 0) foram calculadas com base na concentração afluente (60 mgNH₄⁺-N/L e 20 mgPO₄³⁻-P/L) e na diluição no reator. As concentrações de nitrito e nitrato representadas no tempo 0 foram calculadas levando-se em consideração suas respectivas concentrações no final do ciclo e a diluição no reator após o mesmo ter sido alimentado. Medições ao longo da fase anaeróbia não foram possíveis devido à não homogeneização do conteúdo do reator. 100

Figura 4.10: Perfis de concentração de fosfato (▲), nitrito (■) and nitrato (●) obtidos nos experimentos em batelada em condições anóxicas com biomassa proveniente do SBR₂₀. Os testes foram realizados com dosagem de nitrito ou nitrato. 104

Figura 4.11: Perfis de concentração de fosfato (▲), nitrito (■) and nitrato (●) obtidos nos experimentos em batelada em condições anóxicas com a biomassa proveniente do SBR₃₀. Os testes foram realizados com dosagem de nitrito ou nitrato. 104

Figura 4.12: Testes de ciclo realizados em condições anóxicas no SBR₂₀ (Fases B1 e C1) e SBR₃₀ (Fases B2a e C2). Phosphate (▲) no eixo-y esquerdo, nitrito (■) e nitrato (●) no eixo-y direito. A linha tracejada representa a adição de nitrito ou nitrato (eixo-y esquerdo). Os resultados dos experimentos nos quais nitrito ou nitrato foram dosados a uma taxa equivalente a duas vezes a taxa de desnitrificação observada em condições normais de operação não estão mostrados. Ad.: adicionado. 107

Figura 4.13: Análise por FISH da população de PAOI+PAOII (DPAOm_{ix}) entre toda população de PAO no SBR₂₀ (fase B1) e SBR₃₀ (fase B2a). A combinação PAOI+PAOII é mostrada em vermelho; a combinação PAOm_{ix} é mostrada em verde; a combinação EUB338m_{ix} é mostrada em azul. A cor amarela é devido à superposição da cor vermelha (PAOI+PAOII) e verde (PAOm_{ix}). 110

Figura 4.14: Análise por meio da técnica de FISH da população de PAOI/PAOII entre toda população de PAO no SBR₂₀ durante o período de partida desse sistema e durante as fases A1 e B1. PAOI (Acc-I-444) mostrado em vermelho; PAOII (Acc-II-444) mostrado em verde; PAOm_{ix} (PAO462, PAO462 e PAO846) mostrado em azul. 110

Figura 4.15: Análise, por meio da técnica de FISH, da população de PAOI/PAOII entre toda população de PAO no SBR₃₀ durante as fases A2 e B2a. PAOI (Acc-I-444) mostrado em vermelho; PAOII (Acc-II-444) mostrado em verde; PAOm_{ix} (PAO462, PAO462 e PAO846) mostrado em azul. 111

| | |
|--|-----|
| Figura 4.16: Fração de AOB (Nso1225/Nso190/Neu653, mostrada em vermelho) e de NOB (Ntspa662/Nit1035, mostrada em verde) entre toda a comunidade bacteriana (EUB338 mix, mostrada em azul) nos grânulos de ambos os reatores..... | 111 |
| Figura 4.17: Representação esquemática da rota da nitrificação/desnitrificação na estrutura do lodo granular aeróbio no SBR ₂₀ e SBR ₃₀ . Os micro-organismos envolvidos nas diferentes conversões estão indicados em cores diferentes: AOB (azul), NOB (laranja), PAO (vermelho) e GAO (verde)..... | 121 |
| Figura 5.1: Concentração de amônio no afluente (●) e concentrações de amônio (○), nitrato (Δ) e nitrito (□) no efluente dos reatores em batelada sequencial durante todo o período experimental..... | 131 |
| Figura 5.2: Perfis de concentração de amônio obtidos nos testes de ciclo no SBR ₁ (a) e SBR ₂ (b) em diferentes fases de operação..... | 132 |
| Figura 5.3: Taxa específica de oxidação de amônio (q_{NH_4}) em função da máxima taxa de oxidação de amônio (q_{max}) obtida durante a operação do SBR ₁ (■) e SBR ₂ (□) em diferentes concentrações de sal. Resultados obtidos por MOUSSA <i>et al.</i> (2006) estão mostrados nas linhas pontilhadas. | 132 |
| Figura 5.4: Perfil de bandas do gel de DGGE refletindo a diversidade microbiana dos reatores expostos ao aumento da concentração de sal. A análise de agrupamento mostrando as similaridades está graficamente mostrada na forma de um dendrograma. “D” indica as duplicatas de cada amostra..... | 135 |
| Figura 5.5: Árvore filogenética das sequências de 16S rRNA obtidas a partir das bandas excisadas do gel de DGGE. As sequências obtidas nesse trabalho estão mostradas em negrito. | 137 |
| Figura 5.6: Padrões de bandejamento mostrando a composição das bactérias oxidadoras de amônio (AOB) ao longo das fases experimentais..... | 138 |
| Figura 6.1: Concentrações de amônio, nitrato, nitrito e fosfato obtidas nos testes de ciclo realizados no final das fases I – IV. As concentrações de amônio e fosfato mostradas no início do ciclo (instante 0) foram calculadas com base na concentração afluente (60 mgNH ₄ ⁺ -N/L e 20 mgPO ₄ ³⁻ -P/L) e na diluição no reator com a alimentação. As concentrações de nitrito e nitrato no instante 0 foram calculadas levando-se em consideração as suas concentrações no final do ciclo e na diluição no reator..... | 160 |
| Figura 6.2: Efeito a curto prazo da salinidade nas taxas específicas de consumo de fosfato e amônio nos testes com biomassa adaptada a 0 gNaCl/L, 11 gNaCl/L, 22 gNaCl/L e 33 gNaCl/L..... | 161 |
| Figura 6.3: Gel de DGGE ilustrando a diversidade de micro-organismos nas fases II (11 gNaCl/L), III (22 gNaCl/L) e IV (33 gNaCl/L). Cinco amostras representativas das fases II-IV foram levadas em consideração nessa análise. Os dias de operação no qual as amostras analisadas foram coletadas estão indicados na parte inferior do gel..... | 162 |
| Figura 6.4: Análise filogenética das sequências de 16S rRNA excisadas do gel de DGGE. As sequências determinadas nessa pesquisa estão marcadas em negrito. A barra de escala indica uma diferença de 10% entre as sequências..... | 164 |
| Figura 6.5: Perfil de bandas derivados do DNA e RNA (cDNA). Duas amostras representativas das fases II – IV foram selecionadas para análise diversidade versus funcionalidade. As bandas de mesmo número foram excisadas de diferentes canaletas e apresentaram sequências idênticas..... | 166 |
| Figura 6.6: Diversidade de AOB avaliado por meio de DGGE com fragmentos do gene <i>amoA</i> | 167 |

Figura 6.7: Hibridização *in situ* por fluorescência das populações de PAO (em vermelho) e GAO (em verde) entre todas as bactérias presentes no reator (em azul) no final da fase II (a), final da fase III (b), primeira semana da fase IV (c), segunda semana da fase IV (d) e terceira semana da fase IV (e); fração das populações de PAO+GAO (em vermelho) e AOB+NOB (em verde) entre toda a comunidade bacteriana dos grânulos durante a fase II (f). A barra de escala indica 20 μm 169

Figura 6.8: Proporção de PAO e GAO entre toda a comunidade de bactérias nas fases II, III e IV. Na análise quantitativa, foram consideradas pelo menos 10 imagens para cada condição de salinidade, conforme indicado no item 6.2.7..... 170

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 2.1: Estados de oxidação do nitrogênio em diferentes compostos (MADIGAN <i>et al.</i> , 1997). | 11 |
| Tabela 2.2: Características de alguns suportes desenvolvidos pela AnoxKaldnes® (adaptado de Rusten <i>et al.</i> , 2006 e http://www.anoxkaldnes.com). | 38 |
| Tabela 3.1: Componentes inorgânicos e orgânicos do meio sintético. | 52 |
| Tabela 3.2: Composição da solução de micronutrientes. | 52 |
| Tabela 3.3: Condições experimentais do MBBR ₁ , MBBR ₂ e SBBR. | 53 |
| Tabela 3.4: Sondas oligonucleotídicas específicas a determinados grupos microbianos. | 56 |
| Tabela 4.1: Fases experimentais dos reatores de lodo granular aeróbio. | 88 |
| Tabela 4.2: Sondas oligonucleotídicas e os grupos microbianos alvo. | 92 |
| Tabela 4.3: Resultados obtidos nos testes de ciclo conduzidos em condições normais de operação em ambos os sistemas de lodo granular aeróbio. | 100 |
| Tabela 4.4: Densidade, diâmetro médio e velocidade de sedimentação dos grânulos do topo e da base do leito de lodo dos SBR. | 102 |
| Tabela 4.5: Taxa de desnitrificação (taxa de redução de nitrito/nitrato), taxa de consumo anóxico de fosfato e razão entre consumo anóxico de fosfato e nitrogênio removido (P/N) nos experimentos em batelada mantidos em condição anóxica. | 103 |
| Tabela 4.6: Taxa de dosagem de nitrito/nitrato, taxa de redução de nitrito/nitrato, taxa de consumo anóxico de fosfato e razão entre consumo anóxico de fosfato e nitrogênio reduzido (P/N) nos testes de ciclo anóxicos em ambos os SBR durante o período no qual os PAO e os GAO coexistiram (fase B1 no SBR ₂₀ e fase B2a no SBR ₃₀) e quando os PAO foram removidos de ambos os sistemas (fase C1 no SBR ₂₀ e fase C2 no SBR ₃₀). | 106 |
| Tabela 5.1: Fases de operação do SBR ₁ and SBR ₂ | 126 |
| Tabela 5.2: Sondas oligonucleotídicas e grupos microbianos alvo. | 130 |
| Tabela 5.3: Sólidos suspensos totais (TSS), sólidos suspensos voláteis (SSV), tempo de retenção de sólidos (TRS) e índice volumétrico de lodo nas diferentes fases de operação do SBR ₁ e SBR ₂ | 134 |
| Tabela 6.1: Fases experimentais do SBR de lodo granular aeróbio em função da concentração salina. | 154 |
| Tabela 6.2: Sondas oligonucleotídicas e grupos microbianos alvo. | 157 |

Lista de Símbolos e Abreviaturas

| | |
|--------------------------------|--|
| AGV | Ácidos graxos voláteis |
| AGS | <i>Aerobic granular sludge</i> (Lodo granular aeróbio) |
| AOB | <i>Ammonium-oxidizing bacteria</i> (Bactérias oxidadoras de amônio) |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BAF | <i>Biological Aerated Filters</i> (Filtros biológicos aerados) |
| BAS | <i>Biofilm Airlift Suspension reactors</i> (Reatores <i>airlift</i> com biofilme em suspensão) |
| DGAO | <i>Denitrifying glycogen-accumulating organisms</i> (Organismos acumuladores de glicogênio desnitrificantes) |
| DGGE | <i>Denaturing Gradient gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPAO | <i>Denitrifying phosphate-accumulating organisms</i> (Organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes) |
| DQO | Demanda química de oxigênio |
| DQO/N | Razão demanda química de oxigênio/nitrogênio |
| EBPR | <i>Enhanced biological phosphorus removal</i> |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| EPS | Substâncias poliméricas extracelulares |
| ETIG | Estação de tratamento de efluentes da Ilha do Governador |
| GAO | <i>Glycogen-accumulating organisms</i> (Organismos acumuladores de glicogênio) |
| MBBR | Reator de leito móvel com biofilme |
| MBR | <i>Membrane Reactors</i> (Bioreatores com membranas) |
| m/v | Razão massa/volume |
| N-NH ₄ ⁺ | Nitrogênio amoniacal |
| N-NO ₂ ⁻ | Nitrogênio-nitrito |
| N-NO ₃ ⁻ | Nitrogênio-nitrato |
| NOB | <i>Nitrite-oxidizing bacteria</i> (Bactérias oxidadoras de nitrito) |
| OD | Oxigênio dissolvido |
| PAO | <i>Polyphosphate-accumulating organisms</i> (Organismos acumuladores de polifosfato) |

| | |
|-------|--|
| pb | Pares de base |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase) |
| PHA | Polihidroxialcanoatos |
| PHB | Polihidroxibutirato |
| PS | Polissacarídeos |
| PT | Proteína |
| PS/PT | Razão polissacarídeos/proteína |
| RBC | <i>Rotating Biological Contactors</i> (Contactores biológicos rotativos) |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| SBR | <i>Sequencing batch reactor</i> (Reator em batelada sequencial) |
| SST | Sólidos suspensos totais |
| SSV | Sólidos voláteis totais |
| TRH | Tempo de retenção hidráulica |
| TRS | Tempo de retenção de sólidos |
| UASB | <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> (Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) |
| UPGMA | <i>Unweight pair group method using arithmetic averages</i> (Método de Pareamento não ponderado dos grupos, usando médias aritméticas) |

Introdução e Objetivos

1. Introdução e Objetivos

A ação antropogênica sobre os recursos naturais, a despeito de ter contribuído enormemente para o incremento da qualidade de vida das pessoas, tem apresentado inúmeras influências maléficas ao meio ambiente. O descaso da população com o meio em que vive muitas vezes corrobora para o esquecimento da conservação do pilar mestre de nossa sobrevivência: a natureza.

A poluição ambiental é algo que se propaga gradualmente por todo o planeta, posto que não existem fronteiras quando se trata desse assunto. Especificamente no que se refere à poluição hídrica, são diversas as fontes efetivas ou potencialmente poluidoras capazes de lançar poluentes que afetam os cursos d'água, alterando significativamente a sua qualidade e seu equilíbrio ecológico.

Esgotos domésticos, constituídos de água utilizada para fins higiênicos, e esgotos industriais, nos quais predominam dejetos químicos, são muitas vezes portadores de altas concentrações de matéria orgânica e inorgânica, extremamente prejudiciais à saúde humana e ao equilíbrio do meio natural. A ausência ou má operação de estações de tratamento, que na verdade constituem a problemática central enfrentada na conjuntura atual, implicam no lançamento dessas águas poluidoras diretamente no solo ou ainda na sua distribuição irregular para os cursos d'água mais próximos, propiciando a deterioração do ecossistema em questão. Por conseguinte, efeitos irreversíveis ao ambiente aquático podem ser causados, aumentando os riscos à saúde humana.

A abordagem dada ao tratamento de águas residuárias tem sofrido inúmeras alterações ao longo do tempo. Historicamente, esse tratamento envolvia apenas a remoção de matéria orgânica dissolvida e sólidos em suspensão das águas residuárias, levando-se em consideração a sua aguçada capacidade poluidora do meio ambiente. Com o decorrer dos anos, a crescente preocupação com a poluição das águas fez com que outra categoria de poluentes com elevado potencial poluidor do meio natural fosse levada em consideração. Esses poluentes se referem aos nutrientes, dentre os quais os principais são nitrogênio e fósforo.

As principais fontes de nitrogênio e fósforo no meio ambiente provêm do uso de fertilizantes na agricultura, detergentes utilizados para limpeza e outros compostos químicos sintéticos. A ação antrópica também contribui decisivamente para o aumento

do aporte desses nutrientes por meio do descarte de esgoto sanitário e de águas residuárias industriais desprovidas de tratamento.

Altas concentrações de nitrogênio e fósforo apresentam efeitos negativos nos ambientes aquáticos. O principal problema oriundo da disponibilidade excessiva desses nutrientes está relacionado à eutrofização. Esse é um processo que ocorre naturalmente tanto em ambientes de água doce ou salgada. No entanto, é acelerado pela atividade humana sobre o meio ambiente, a qual é responsável pelo aumento da concentração de nutrientes além da capacidade de tolerância do ambiente aquático, desencadeando uma cascata de problemas.

No processo de eutrofização, observa-se uma elevação da produção primária, exemplificada pelo crescimento excessivo de espécies fitoplanctônicas (algas e outras plantas). Em tais condições, a população microbiana responsável pela degradação da matéria orgânica das plantas e algas aumenta exponencialmente e, por conseguinte, a demanda de oxigênio necessária para essa depuração sofre um substancial incremento. Em determinadas condições, a queda do nível de oxigênio é tão elevada que pode levar à morte de peixes e de outros organismos aquáticos por asfixia. O aumento da quantidade de matéria orgânica devido à explosão da produção primária nas águas eutrofizadas encarece o seu tratamento, podendo ainda torná-la inadequada para diversos usos. A necessidade de uso de agentes químicos (desinfetantes, por exemplo) para o tratamento dessas águas pode promover a produção de produtos carcinogênicos, tais como compostos clorados. A Figura 1.1 apresenta imagens de corpos d'água nos quais um intenso nível de eutrofização é observado.

O florescimento exagerado de algas pode ainda resultar em uma cobertura vegetal na superfície do corpo aquático receptor, a qual pode bloquear parcialmente ou totalmente a luz solar. Como consequência, a atividade fotossintética de plantas situadas sob a superfície da água será afetada. A produção de toxinas por algumas espécies de algas, tais como cianobactérias (HARDMAN *et al.*, 1993), também contribuiu para causar danos aos organismos presentes no ambiente em questão. Consequentemente, problemas ao longo da cadeia alimentar são inevitáveis. O uso de águas eutrofizadas contendo cianobactérias para a produção de água potável apresenta riscos à saúde, uma vez que a remoção das toxinas liberadas por essas algas é realizada por meio de processos relativamente complexos e muitas vezes não se obtém a remoção integral das mesmas.



Figura 1.1: Processo acelerado de eutrofização em diferentes corpos d'água, caracterizado pelo excessivo crescimento de algas e plantas aquáticas na superfície dos mesmos. Fonte: Disponível em <http://www.flickrriver.com/photos/tags/eutrophication/interesting> e <http://www.green-blog.org/2008/06/16/eutrophication/>.

O material em decomposição é geralmente carregado por águas correntes em direção a lagos e reservatórios, contribuindo gradualmente para o assoreamento desses corpos d'água. Baixas concentrações de oxigênio dissolvido também pode provocar a liberação de diversos compostos, incluindo diversas formas de fosfato, contribuindo para intensificar o processo de eutrofização. Problemas de odor podem também ser oriundos do aporte excessivo de nutrientes em determinado meio aquático, afetando o uso de rios e lagos para fins recreativos.

A razão entre compostos nitrogenados ou fosforados é um fator importante que determina quais dos dois elementos, nitrogênio ou fósforo, será o fator limitante e, conseqüentemente, aquele que deverá ser controlado no intuito de reduzir o crescimento exagerado de algas e outras formas de vida aquática. Em geral, o fósforo tende a ser o nutriente limitante para o fitoplâncton em água doce (rios e lagos), enquanto que em extensas áreas marinha, nitrogênio tem sido considerado como o fator limitante (VOLTERRA *et al.*, 2002).

Além do problema relacionado à eutrofização, altas concentrações de compostos nitrogenados podem vir a ser tóxicas para a vida de diversos organismos. Amônia livre apresenta toxicidade para a vida aquática, causando massiva mortalidade de peixes e outros organismos. Nitrito e nitrato estão relacionados à metemoglobinemia, doença também conhecida como “síndrome do bebê azul”. Esse distúrbio, que ocorre no sangue, apresenta como efeito principal a redução do fornecimento de oxigênio aos tecidos. Um problema adicional ocasionado pela presença de nitrito é a formação de nitrosaminas carcinogênicas por meio da interação de nitrito com outros compostos

orgânicos nitrogenados (aminas) (MULLIKEN e JOLLY, 1916), especialmente em condições ácidas.

Nos Estados Unidos, por exemplo, aproximadamente 25% dos problemas relacionados à poluição hídrica são causados pela presença excessiva de nutrientes e por suas consequências, tais como diminuição do teor de oxigênio, florescimento de algas produtoras de toxinas e turbidez (EPA, 2007). Levando-se em consideração todos os efeitos nocivos causados pelo aporte excessivo de nutrientes nos recursos naturais, fica evidente que sua remoção é um fator imperativo. Essa é a razão pela qual os limites de descarte desses nutrientes vem sendo reduzidos constantemente em todo mundo pelos órgãos ambientais competentes.

A decomposição de poluentes, sejam eles de origem orgânica ou inorgânica, é realizada preferencialmente por processos de tratamento que fazem uso de micro-organismos, comumente denominados processos biológicos. Esses processos são, na verdade, uma aplicação prática de micro-organismos em sistemas concebidos pela engenharia, conhecidos como reatores biológicos ou biorreatores. Esses sistemas fazem uso da habilidade de bactérias capazes de metabolizar matéria orgânica (carboidratos, ácidos graxos e proteínas) e nutrientes (nitrogênio e fósforo) presentes nas águas residuárias, para o seu crescimento, manutenção celular e produção de energia. Em plantas de tratamento de águas residuárias, os processos biológicos geralmente fazem parte do tratamento secundário, situado a jusante do tratamento primário, o qual compreende as etapas de gradeamento e remoção de areia e muitas vezes decantação primária. Algumas vezes o tratamento biológico é realizado sem que ocorra um tratamento primário prévio.

Os processos biológicos que ocorrem em biorreatores são basicamente os mesmos daqueles que ocorrem naturalmente no ambiente. Entretanto, uma vez que as condições de operação (pH, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e outros parâmetros) sejam bem controladas nesses sistemas, os processos de degradação dos poluentes são intensificados de forma significativa quando comparados com aqueles que ocorrem na natureza.

Sempre ocupando posição de destaque face às múltiplas vantagens de caráter econômico a eles associadas, os processos de tratamento biológico vêm sofrendo inovações tanto nas variantes dos processos existentes como na amplitude de suas aplicações. Essas modificações dos processos biológicos visando ao seu aperfeiçoamento são consequência, em grande parte, do crescimento exponencial da

população e, por conseguinte, da geração de esgoto, do aumento da complexidade e variabilidade das águas residuárias, e da existência de legislações ambientais que estabelecem limites cada vez mais restritos de descarte de poluentes nos corpos d'água receptores. Por sua vez, a disponibilidade reduzida de espaço físico que aflige tanto os centros urbanos quanto as indústrias, torna mais atraente a construção de plantas de tratamento que privilegiem instalações compactas e que consigam manter operação estável com impacto ambiental reduzido.

A maioria dos processos utilizados para o tratamento biológico de águas residuárias se baseia na capacidade de reter biomassa ativa. As concentrações de substrato das águas residuárias são geralmente baixas, especialmente quando se trata de esgotos domésticos. Como consequência, a produção de biomassa se torna reduzida. Para aumentar a capacidade volumétrica do sistema, é conveniente aumentar a retenção de bactérias no reator. No processo de lodos ativados, por exemplo, esse objetivo é atingido por meio da criação de lodo floculento capaz de sedimentar e ser separado da corrente líquida nos sedimentadores. O tamanho desses sedimentadores é grande, justamente devido ao fato de que a sedimentação dos flocos por gravidade é um processo relativamente lento. Esse fator, somado às baixas concentrações de biomassa nos reatores convencionais (em geral de 3 - 4 g/L de sólidos suspensos), fazem com que áreas relativamente extensas sejam necessárias para a instalação do sistema biológico no intuito de garantir uma eficiência de remoção de poluentes satisfatória. Ademais, problemas de sedimentação dos flocos de lodo são passíveis de ocorrer, podendo ocasionar arraste de sólidos do reator e consequente redução da qualidade do efluente.

Novos desenvolvimentos tecnológicos impulsionaram a geração de novos sistemas de tratamento de águas residuárias mais compactos e com maiores eficiências de tratamento, os quais vêm sendo considerados como alternativas aos tradicionais sistemas de biomassa dispersa. Uma característica peculiar desses novos sistemas é a alta capacidade de reter biomassa, o que aumenta a capacidade de tratamento e diminui o espaço requerido para construção da planta. Para alcançar tais objetivos, o uso de sistemas com biofilme se tornou popular ao longo dos anos. Por meio da imobilização das bactérias na forma de biofilmes, os sistemas reacionais puderam ser projetados de forma muito mais compacta e diversos problemas relacionados à sedimentabilidade do lodo passaram a ser evitados.

Diante desse contexto que se configura, tem se observado um aumento crescente no interesse por processos com biofilmes destinados ao tratamento de águas residuárias

municipais e industriais. Além de possuírem maior capacidade de retenção de biomassa e consequentemente serem capazes de suportar cargas maiores, apresentam boa eficiência de remoção de compostos orgânicos e de nutrientes (N e P) e maior estabilidade a variações da composição do afluente, de temperatura e de toxicidade. Além disso, a preocupação em relação à separação de sólidos a jusante do reator é muito menor em comparação com os sistemas com biomassa dispersa. Esta última característica, em particular, possui grande atratividade, uma vez que facilita a operação do sistema e diminui drasticamente o extenso espaço físico ocupado pelos sedimentadores, peça fundamental dos processos convencionais com biomassa em suspensão. Diversos reatores compactos que fazem uso da tecnologia de biofilmes serão descritos nos próximos itens.

Apesar de todas as inovações pertinentes aos sistemas biológicos de tratamento, por muito tempo eles foram considerados uma verdadeira “caixa preta”, desprovidos de elucidação completa dos fenômenos microbiológicos que neles aconteciam. Na grande maioria das vezes, o interesse estava centrado unicamente na eficiência de remoção de diversos poluentes, com o objetivo primordial de adequar a água residuária tratada aos requisitos impostos pela legislação ambiental em vigor.

Por outro lado, para se alcançar melhorias no projeto e desempenho de novas gerações de reatores e principalmente para se obter um melhor entendimento do processo biológico, é necessário o conhecimento de seus verdadeiros protagonistas, isto é, os micro-organismos. Para tanto, um estudo mais aprofundado é requerido.

Nesse contexto, surgem como ferramenta suporte os métodos de detecção e identificação de bactérias, os quais auxiliam a desvendar o que se passa no seio dos processos biológicos. De forma tradicional, esses métodos eram realizados levando-se em conta os principais meios de obtenção de carbono e energia, suas exigências nutricionais e meio de cultivo para o seu crescimento, além da observação direta por microscopia (KENNEDY, 1999, HERBERT, 1990). Embora tenham fornecido informação extensiva a respeito da diversidade de comunidades microbianas tanto em sistemas naturais quanto em sistemas concebidos pela engenharia, as técnicas microbiológicas convencionais baseadas no isolamento de culturas puras e em ensaios morfológicos, metabólicos, bioquímicos e genéticos apresentam limitação de informação, havendo desta maneira a necessidade de um refinamento (ZAK *et al.*, 1994). Na maioria das vezes, não se dispõe de informações a respeito das necessidades fisiológicas (nutricionais e físico-químicas) dos micro-organismos em estudo, e a

complexidade das relações sintróficas e simbióticas, abundantes na natureza, corrobora para aumentar a dificuldade de se obter culturas puras da maioria dos micro-organismos que vivem nos mais diversos ambientes (SANZ e KÖCHLING, 2007). Segundo PACE (1996), somente uma porção mínima equivalente a 1% dos micro-organismos presentes no meio ambiente podem ser cultivados por meio de técnicas padrão de cultivo e plaqueamento, informação que reforça a limitação das metodologias convencionais.

De forma alternativa aos métodos tradicionais e buscando-se superar a escassez de informações fornecidas por essas metodologias, foram desenvolvidas diversas técnicas, dentre as quais ganham destaque aquelas baseadas nos ácidos nucléicos. Desta forma, surge a biologia molecular como alternativa para contornar a limitação intrínseca às técnicas convencionais no estudo da diversidade de micro-organismos. Tais limitações, aliadas ao avanço tecnológico na área da biologia molecular, tornam as técnicas moleculares cada vez mais utilizadas no estudo da diversidade de comunidades microbianas (VAN ELSAS *et al.*, 1998).

A informação genotípica, ou seja, a informação trazida pelas sequências das moléculas semânticas (genes ou transcritos, DNA, RNA e proteínas) constitui o histórico da evolução e a determinação da sequência de DNA possibilita não só a medida das relações evolutivas entre as moléculas sequenciadas, mas também fornece uma visão da evolução dos organismos a partir dos quais aquelas sequências foram geradas.

Análises de sequências ribossômicas (16S rRNA para procariontes) obtidas diretamente de amostras ambientais são capazes de revelar novas espécies, quebrar antigos paradigmas ou até mesmo reestruturar a taxonomia de grupos funcionais. Dessa forma, enfatiza-se a importância da abordagem molecular para estudos de avaliação e monitoramento de micro-organismos em sistemas ambientais (ROSADO e DUARTE, 2002).

Embora a aplicação das técnicas de biologia molecular seja bastante insipiente, em grande parte devido ao fato de terem sido desenvolvidas muito recentemente e majoritariamente utilizadas em escala laboratorial, é pertinente destacar a enorme contribuição científica que as mesmas podem trazer, podendo funcionar como ferramentas poderosas tanto para o projeto quanto para o monitoramento de plantas de tratamento de águas residuárias em escala real. Quando agregadas às técnicas convencionais em uma abordagem polifásica, é possível se obter informações mais precisas e reais de um sistema (MUYZER e SMALLA, 1998).

O objetivo geral desse trabalho de pesquisa consiste no estudo de diversos aspectos relacionados à remoção biológica de nutrientes em sistemas compactos. Técnicas moleculares foram usadas como ferramenta para o melhor entendimento dos processos biológicos e de suas rotas de conversão. Por vezes, as mesmas foram utilizadas para auxiliar na melhoria o desempenho e a estabilidade dos processos biológicos colocados em operação, bem como para monitorar o efeito de certas condições operacionais na estrutura da comunidade microbiana.

Os objetivos específicos estão descritos a seguir:

- Estudo da influência de diferentes condições operacionais no desenvolvimento do biofilme, no processo de nitrificação e na população de micro-organismos nitrificantes em reatores de leito móvel com biofilme;
- Avaliação do processo de remoção simultânea de nitrogênio e fósforo em reatores de lodo granular operados em diferentes temperaturas;
- Investigação do efeito de diferentes estratégias de adaptação a altos índices salinos na diversidade microbiana, atividade e sedimentação de lodo nitrificante em reatores em batelada sequencial;
- Estudo do efeito de elevadas concentrações salinas no processo de lodo granular aeróbio, relacionado a atividade e a estrutura da comunidade de micro-organismos.

Todos os estudos específicos mencionados acima estão descritos em capítulos individuais, cada qual contendo uma breve contextualização ao assunto, materiais e métodos utilizados, resultados, discussão, e conclusões de cada estudo. Por fim, uma visão geral dos assuntos abordados nesse trabalho é apresentada, e os resultados de alguns trabalhos são comparados.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Remoção biológica de nitrogênio de efluentes líquidos

2.1.1. Introdução aos processos de remoção de nitrogênio

O nitrogênio, devido ao seu elevado número de estados de oxidação, pode apresentar-se na forma de muitos compostos, conforme pode ser observado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Estados de oxidação do nitrogênio em diferentes compostos (MADIGAN *et al.*, 1997).

| Compostos nitrogenados | Estados de oxidação |
|---|---------------------|
| Nitrogênio orgânico (variável) | Variável |
| Amônia (NH ₃) | -3 |
| Gás nitrogênio (N ₂) | 0 |
| Óxido nitroso (N ₂ O) | +1 |
| Óxido nítrico (NO) | +2 |
| Íon nitrito (NO ₂ ⁻) | +3 |
| Dióxido de nitrogênio (NO ₂) | +4 |
| Íon nitrato (NO ₃ ⁻) | +5 |

No meio ambiente, o nitrogênio encontra-se mais frequentemente na forma de nitrogênio orgânico, amônia (NH₃), amônio (NH₄⁺), nitrato (NO₃⁻) ou nitrogênio gasoso (N₂). Em relação ao equilíbrio amônia-amônio (NH₄⁺ ↔ NH₃ + H⁺), valores ácidos de pH contribuem para o aumento da concentração de H⁺, fazendo com que o equilíbrio seja deslocado para a esquerda, havendo desta forma predominância do íon amônio. Em contrapartida, em valores alcalinos de pH, a concentração de H⁺ é diminuída, sendo a amônia predominante neste caso.

As substâncias orgânicas nitrogenadas podem ser degradadas por bactérias decompositoras da matéria orgânica gerando amônia (amonificação), enquanto que o nitrogênio gasoso presente na atmosfera pode ser convertido em amônia através da atuação das bactérias fixadoras de nitrogênio (HENZE *et al.*, 1997, MADIGAN *et al.*, 1997).

A Figura 2.1 representa as transformações dos compostos nitrogenados no ciclo do nitrogênio, as quais resultam do metabolismo microbiano nos processos de fixação, nitrificação, desnitrificação, oxidação anaeróbia de amônio via nitrito e redução desassimilatória e assimilatória do nitrato (YE e THOMAS, 2001).

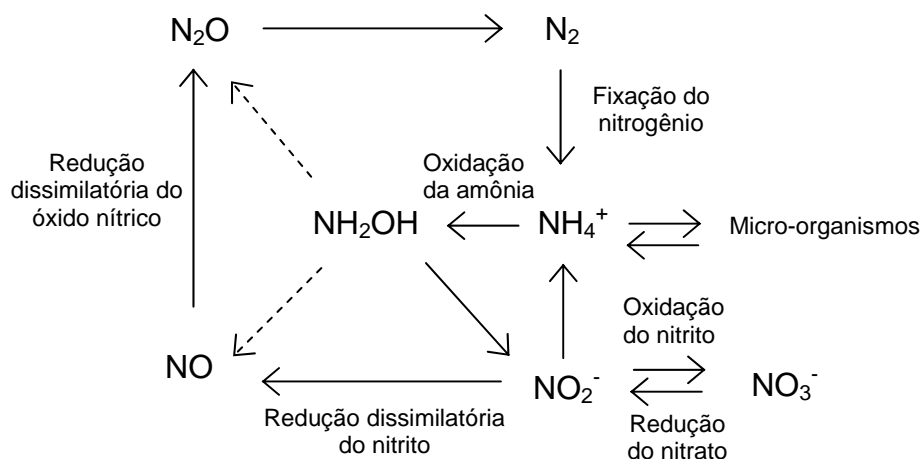


Figura 2.1: Conversões possíveis entre compostos nitrogenados (adaptado de YE e THOMAS, 2001).

Tradicionalmente, a eliminação de nitrogênio de uma água residuária é realizada por um processo que envolve duas etapas distintas. Na primeira etapa, designada por nitrificação, o amônio passa a nitrato em condições aeróbias, tendo o oxigênio como acceptor de elétrons na cadeia respiratória, permitindo a reoxidação das coenzimas e a geração de ATP. Na segunda etapa, designada por desnitrificação, o nitrato é convertido a nitrogênio gasoso (N_2), tendo como possíveis intermediários gasosos o óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O), igualmente lançados na atmosfera. A desnitrificação é realizada em condições anóxicas, tendo o nitrato como acceptor de elétrons (MADIGAN *et al.*, 1997, UEMOTO e SAIKI, 2000).

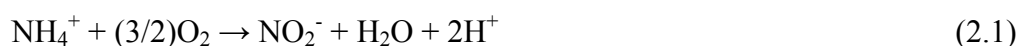
A seguir, será apresentada uma abordagem detalhada do processo convencional de remoção de nitrogênio, sendo descritas as principais características das duas etapas desse processo, isto é, a nitrificação e a desnitrificação. Além disso, dar-se-á uma breve introdução aos novos processos de remoção de nitrogênio, os quais estão ganhando cada vez mais espaço nos sistemas de tratamento.

2.1.2. Nitrificação

A nitrificação é entendida como a etapa limitante do processo convencional de remoção de nitrogênio, consistindo também na etapa mais estudada e para a qual se encontra a maior abundância de informações, além de ser de vital importância para os novos processos de tratamento.

O processo nitrificante é realizado pela ação de dois grupos de bactérias. O primeiro grupo é responsável pela nitrificação, isto é, a oxidação da amônia a nitrito, tendo a hidroxilamina (NH_2OH) como composto intermediário. Já o segundo grupo promove a conversão do nitrito em nitrato, etapa designada por nitratação (RAMALHO, 1983, METCALF e EDDY, 1991). As etapas do processo nitrificante estão descritas nas Equações (2.1) a (2.3) (HENZE *et al.*, 1997, MADIGAN *et al.*, 1997).

1. Geração de nitrito



2. Geração de nitrato



3. Reação global

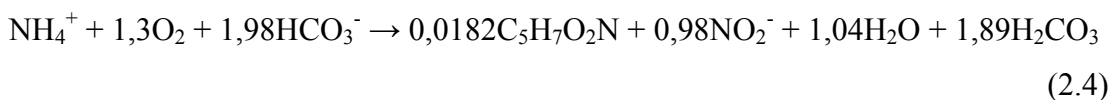


Pela estequiometria das reações (2.1) e (2.2), pode-se observar que a massa de oxigênio necessária para completar essas reações é de 4,57 gO_2/gN oxidado, sendo 3,43 g de oxigênio necessárias para a oxidação do nitrogênio amoniacal e 1,14 g requerida para a oxidação do nitrito.

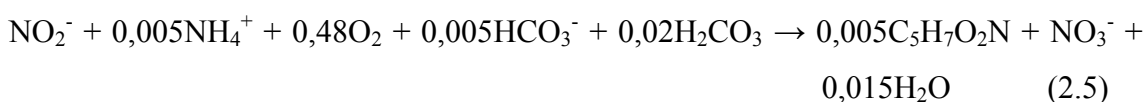
As bactérias nitrificantes apresentam crescimento lento, o que pode trazer complicações na operação dos sistemas biológicos de tratamento, contribuindo para o aumento da sensibilidade do processo e, conseqüentemente, da suscetibilidade à inibição química (SORIA e CHAVARRIA, 1978, HÄNEL, 1988). Em virtude de seu crescimento ser bastante reduzido, tempos de retenção celular relativamente elevados são necessários para que as bactérias nitrificantes sejam mantidas no interior do reator.

As reações estequiométricas da oxidação de amônio e nitrito, levando-se em consideração o seu crescimento (catabolismo e anabolismo) estão descritas nas Equações 2.4 e 2.5, respectivamente (WIESMANN e LIBRA, 1999).

Oxidação de amônio:



Oxidação de nitrito:



Como mostrado na Equação 2.4, dois moles de alcalinidade são consumidos por mol de amônio oxidado. O tampão carbonato neutraliza a produção de prótons durante a oxidação de amônio por meio do *stripping* de CO_2 . Caso a quantidade de tampão necessária não esteja disponível na água residuária ou não for externamente fornecida, o pH do sistema diminui e a taxa de oxidação de amônio diminuiu drasticamente. A quantidade de células produzidas por mol de composto nitrogenado oxidado é maior para a oxidação de amônio em comparação com a oxidação de nitrito.

As mais conhecidas bactérias oxidadoras de amônia encontradas em sistemas de tratamento de esgoto pertencem aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira*. Na nitrificação, podem estar envolvidos outros gêneros como *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus*. Por sua vez, as principais bactérias oxidadoras de nitrito fazem parte do gênero *Nitrobacter* e *Nitrospira* (CABEZAS *et al.*, 2004), embora outros gêneros tais como *Nitrocystis*, *Nitrococcus* e *Nitrospina* sejam reportados (SEDLAK, 1991, RITTMANN e McCARTY, 2001).

As bactérias atuantes no processo nitrificante são autotróficas, isto é, utilizam carbono inorgânico (CO_2) para a síntese celular. Desta forma, independem de compostos orgânicos como fontes de carbono. São igualmente denominadas quimiolitotróficas, indicando que utilizam substrato inorgânico (NH_4^+ , NH_3) como fonte de elétrons, ou seja, de energia. As bactérias nitrificantes são aeróbias, caracterizando-se assim pelo uso de oxigênio como acceptor final de elétrons (METCALF e EDDY, 1991, RITTMANN e McCARTY, 2001).

Diversos são os fatores responsáveis por afetar a eficiência da nitrificação, a saber: pH, temperatura, oxigênio dissolvido e presença de compostos inibidores. O pH ideal está em torno de 7,0, enquanto que a temperatura mais favorável para o processo nitrificante se encontra dentro da faixa de 30 - 35°C (HENZE *et al.*, 1997; METCALF e EDDY, 2003). Em geral, concentrações de oxigênio dissolvido maiores que 2 mgO₂/L são recomendadas (SURAMPALLI *et al.*, 1997; HENZE *et al.*, 1997). Em sistemas com biofilme, o nível de oxigênio dissolvido requerido pode ser ainda maior em virtude da resistência à transferência de massa no sistema. Devido à menor afinidade pelo oxigênio apresentada pelas bactérias oxidadoras de nitrito, a oxidação desse composto é mais sensível em baixas concentrações de oxigênio dissolvido em comparação com a oxidação de amônio. Por conseguinte, é comum ocorrer acúmulo de nitrito em condições de limitação de oxigênio (CAMPOS *et al.*, 2007).

As concentrações de amônio e nitrito, substratos das bactérias nitrificantes, exercem efeito direto na taxa de nitrificação. Caso as concentrações sejam muito baixas, poderá ocorrer limitação de substrato. Em contrapartida, altas concentrações de amônio e nitrito e especialmente suas formas não-ionizadas (amônia livre e ácido nitroso, respectivamente) podem inibir o processo de nitrificação (ANTHONISEN *et al.*, 1976).

A relação carbono orgânico/nitrogênio representa um dos fatores críticos dos sistemas de nitrificação. Maiores taxas de nitrificação são obtidas quando há limitação da concentração de matéria carbonácea. Altas concentrações de matéria orgânica proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos heterotróficos que competem com os autotróficos nitrificantes pelo oxigênio e nutrientes (FIGUEROA e SILVERSTEIN, 1992). Para agravar o problema, a reação de nitrificação é muito mais lenta e mais sensível a perturbadores externos em comparação com a oxidação de matéria orgânica promovida pelos micro-organismos heterotróficos (CAMPOS *et al.*, 2007).

Como todo processo biológico, a nitrificação também é sensível à presença de compostos tóxicos. Muitos compostos inibitórios estão presentes nas águas residuárias, principalmente naquelas advindas de indústrias químicas, as quais empregam uma infinidade de substâncias em seus processos. Uma ampla faixa de compostos orgânicos e metais pesados se enquadra nessa categoria (JULIASTUTI *et al.*, 2003). Fatores como pH, concentração do inibidor, espécies presentes, concentração de sólidos suspensos, idade do lodo, solubilidade do inibidor e a concentração de outros cátions e moléculas presentes, influenciam o grau de inibição. Segundo GRUNDITZ e DALHAMMAR

(2001), o fato das bactérias responsáveis pela nitrificação serem restritas a poucos gêneros, associado ao seu lento crescimento celular, tornam esse processo mais suscetível à inibição.

O efeito salino é outro capaz de alterar significativamente o desempenho dos micro-organismos, ocasionando problemas aos processos biológicos. A salinidade é conhecida por afetar a atividade metabólica das bactérias, reduzindo o crescimento microbiano (DALMACIJA *et al.*, 1996). A velocidade de crescimento de bactérias não-halofílicas é reduzida com o incremento da concentração de sal no meio devido ao fato de que parte do substrato consumido é gasto na síntese de solutos compatíveis para balancear a pressão osmótica do meio, o que implica em alto custo energético para o consórcio microbiano. Para as bactérias nitrificantes, em particular, esse encargo é adicionado ao custoso processo de redução de CO₂ (MEASURES, 1975). Dois estudos envolvendo a investigação do efeito salino em diversos processos biológicos foram investigados nessa pesquisa, sendo descritos nos capítulos 5 e 6.

2.1.3. Desnitrificação

Consistindo na etapa subsequente à nitrificação no processo convencional de remoção de nitrogênio, a desnitrificação é um processo no qual micro-organismos heterotróficos anaeróbios facultativos reduzem o nitrato gerado na nitrificação a nitrogênio molecular em condições anóxicas (MADIGAN *et al.*, 1997). É um processo de grande importância, visto que, consistindo em uma etapa integrante do processo de remoção de nitrogênio de efluentes líquidos, contribui para mitigar os diversos danos causados por esse elemento nos corpos d'água.

A desnitrificação é essencial para afluentes com baixa alcalinidade natural. A perda de alcalinidade pela liberação de íons H⁺ durante a nitrificação pode ser contornada pela desnitrificação. Além disso, concentrações elevadas de nitrato podem repercutir na geração de nitrogênio gasoso por meio da desnitrificação, o qual pode provocar lodo ascendente na fase de decantação em sistemas convencionais de lodo ativado e com isso prejudicar a operação do sistema (VON SPERLING, 1996).

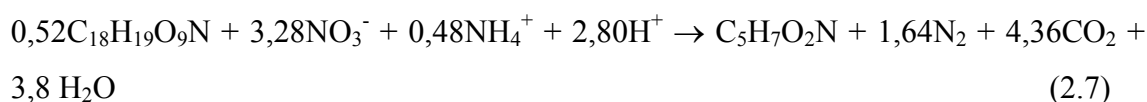
Na desnitrificação, alguns grupos de bactérias oxidam alguns substratos, que consistem em compostos de carbono orgânico tais como carboidratos, ácidos orgânicos, álcoois, aminoácidos e ácidos graxos (METCALF e EDDY, 2003). Estes servem como fonte de energia para a produção de ATP, e os equivalentes da redução são transferidos

ao nitrato, que age como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória ao invés de oxigênio. Nessas circunstâncias, a ocorrência da desnitrificação está relacionada à presença de um substrato oxidável e de uma concentração adequada de nitrato (VAN RIJN *et al.*, 2006). Muitas bactérias que oxidam matéria orgânica utilizando nitrato como acceptor final de elétrons agem como facultativas desnitrificantes. As bactérias desnitrificantes utilizam preferencialmente o oxigênio molecular, que compete com o nitrato na função de acceptor de elétrons. Assim, o processo desnitrificante se desenvolve na ausência de oxigênio e na presença de nitrato, isto é, em ambiente anóxico. Embora menos comum, a desnitrificação também pode ser realizada por bactérias quimiolitotróficas, as quais utilizam H₂ ou compostos reduzidos de enxofre como acceptor de elétrons (WIESMANN *et al.*, 2007).

Resumidamente, a redução do nitrato ocorre em etapas sequenciais, conforme a Equação 2.6. Durante esta sequência de transformação de nitrato para nitrogênio gasoso, passando pelos óxidos gasosos, o estado de oxidação do nitrogênio passa de +5 para 0 (MADIGAN *et al.*, 1997).



A Equação 2.8 representa a reação de desnitrificação, levando-se em consideração o crescimento celular. Nesse caso, considera-se que os organismos assimilam amônia (HENZE *et al.*, 2002). Caso toda a energia seja utilizada para crescimento, o fator de rendimento de substrato em biomassa é de aproximadamente 0,40 kg biomassa/kg matéria orgânica.



A completa conversão de nitrato a nitrogênio molecular se processa através de uma microbiota desnitrificante constituída de diversos grupos de micro-organismos (MANSELL e SCHROEDER, 1998), os quais representam a maior diversidade e distribuição de micro-organismos entre os demais processos de biotransformações inorgânicas. Como exemplo de alguns gêneros diversos de bactérias desnitrificantes pode-se mencionar *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Hiphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*,

Paracoccus, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas* e *Klebsiella* (RITTMAN e LANGELAND, 1985).

O funcionamento global do ecossistema desnitrificante pode ser afetado pela atuação das populações microbianas, as quais, por sua vez, podem sofrer interferências decorrentes de mudanças nas condições ambientais, como temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido, fonte de carbono, concentração de nitrato, relação carbono orgânico/nitrogênio, tempo de retenção celular, presença de substâncias inibidoras e altas intensidades de luz (NAIR *et al.*, 2007; BARAK *et al.*, 1998).

A temperatura influencia diretamente o crescimento das bactérias, sendo que a desnitrificação pode ocorrer na ampla faixa de 0 a 50 °C. Entretanto, a condição mais favorável de temperatura se encontra em torno de 35 °C. Em relação ao pH, a faixa adequada está compreendida entre 6,5 e 8, sendo que valores abaixo de 6,0 e acima de 9,0 para esse parâmetro reduzem a velocidade de desnitrificação (SURAMPALLI *et al.*, 1997). Particularmente para valores de pH abaixo de 7, a produção de óxidos de nitrogênio dotados de alta toxicidade é mais acentuada, e caso haja a presença de nitrito nestas condições de pH, elevadas concentrações de ácido nitroso podem estar presentes (ANTHONISEN *et al.*, 1976). O oxigênio dissolvido tem a capacidade de inibir tanto a atividade como a síntese de enzimas desnitrificantes. Para se ter uma ideia, concentrações desse elemento de apenas 1 mgO₂/L ou ainda menores já interferem na atividade desnitrificante (SURAMPALLI *et al.*, 1997).

A razão carbono orgânico/nitrogênio necessária para a completa redução de nitrato a nitrogênio gasoso pelas bactérias desnitrificantes depende da natureza da fonte de carbono e das espécies microbianas atuantes (PAYNE, 1973). Para a maioria das fontes de carbono, uma razão mássica de DQO/N-NO₃⁻ de 3 a 6 permite a redução completa de nitrato para nitrogênio elementar (NARCIS *et al.*, 1979, SKINDE *et al.*, 1982). Maiores taxas de desnitrificação são obtidas, por exemplo, com ácidos graxos, enquanto que a desnitrificação suportada pelo decaimento celular consiste em um processo lento. É interessante ressaltar que a limitação de carbono pode resultar no acúmulo de produtos intermediários, como NO₂ e N₂O.

Em processos convencionais, como o de lodos ativados, os processos de nitrificação e desnitrificação são realizados em reatores distintos. A configuração mais utilizada é conhecida como pré-desnitrificação, na qual o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso utilizando a matéria orgânica afluente do processo como doador de elétrons em um tanque anóxico. O nitrato é produzido em um tanque aeróbio subsequente, no qual

ocorre a nitrificação, sendo posteriormente recirculado ao tanque anóxico. Em sistemas com penetração parcial de oxigênio, tais como reatores baseados em biofilmes, ambas as zonas aeróbias e anóxicas estão presentes simultaneamente no biofilme, permitindo a ocorrência do processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas.

2.1.4 Novos processos para remoção de Nitrogênio

O processo convencional de eliminação de nitrogênio, compreendendo a etapa de nitrificação e desnitrificação, é bastante eficaz para o tratamento de efluentes que contêm baixas concentrações de nitrogênio. Em se tratando de efluentes com alta concentração, o tratamento convencional se torna limitado, sobretudo no que se refere a questões de dimensionamento e de operação.

Nos últimos anos, o paradigma de que o único modo para converter biologicamente amônio a nitrogênio gasoso era somente possível por meio da completa oxidação daquele composto a nitrato seguido de desnitrificação heterotrófica, tornou-se obsoleto. Nesse contexto, diversos novos processos de remoção de nitrogênio têm sido desenvolvidos, muitas vezes para superar as limitações inerentes aos processos de nitrificação e desnitrificação convencionais.

Os novos processos são baseados na nitrificação parcial de amônio a nitrito (rota do nitrito). Para se conseguir atingir a nitrificação parcial, faz-se necessário reduzir a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito (NOB), fazendo com que as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) sejam favorecidas. Deste modo, pode-se interromper a oxidação do amônio em nitrito (RUIZ *et al.*, 2003).

A nitrificação parcial pode ser obtida por meio do processo SHARON (sigla da nomenclatura, em inglês, *Single Reactor System for High Ammonium Removal Over Nitrite*), o qual faz uso de um único reator. O reator é operado sem retenção de biomassa em temperaturas relativamente elevadas (35°C), condição na qual as bactérias oxidadoras de amônia são favorecidas em detrimento das bactérias oxidadoras de nitrito (VAN DONGEN *et al.*, 2001). Além da temperatura, outras variáveis tais como pH, tempo de retenção hidráulica, concentração de oxigênio dissolvido e concentração de substratos (amônio e nitrito) e especialmente as suas formas não-ionizadas (amônia livre e ácido nitrito) devem ser controladas para que a nitrificação parcial seja atingida (HELLINGA *et al.*, 1998). Fica evidente que tal controle acirrado pode ser dificultado, especialmente em aplicações em larga escala.

O sistema SHARON pode ser seguido por um reator desnitrificante convencional ou pelo processo de oxidação anaeróbia de amônio (Anammox – *Anaerobic ammonium oxidation*). No caso da desnitrificação via nitrito, é possível se obter uma redução de 40% da matéria orgânica necessária para a etapa de desnitrificação e 63% de aumento na velocidade dessa etapa (KATSOGIANNIS et al., 2003). Já o processo Anammox é baseado em micro-organismos autotróficos da ordem dos Planctomicetos (STROUS *et al.*, 1999a). Essas bactérias crescem muito lentamente, apresentando tempos de duplicação que chegam a 11 dias. Obtêm energia por meio da oxidação de amônio, utilizando nitrito como acceptor de elétrons, não necessitando de adição de fonte externa de carbono orgânico (JETTEN *et al.*, 1999; STROUS *et al.*, 2002). Um dos maiores desafios do processo Anammox é o seu longo tempo de partida. Uma vez que as bactérias Anammox crescem muito lentamente, são necessários entre 100 e 150 dias para que o reator Anammox inoculado com lodo ativado atinja capacidade máxima (VAN DONGEN *et al.*, 2001).

A ocorrência do processo de nitrificação parcial/Anammox no mesmo processo é realizado em reatores com biofilme, mantidos em condições de limitação de oxigênio. Nesse processo integrado, designado por CANON (*C*ompletely *A*utotrophic *N*itrogen *R*emoval *O*ver *N*itrite) (THIRD *et al.*, 2001), os organismos nitrificantes e as bactérias Anammox atuam em cooperação durante todo o processo, possibilitando a ocorrência de reações sequenciais de forma simultânea (AHN, 2006). Os micro-organismos nitrificantes, particularmente as AOB, são responsáveis pela oxidação de amônia a nitrito, consumindo boa parte do oxigênio e criando condições anóxicas para a conversão de amônio e nitrito em nitrogênio gasoso pelas bactérias Anammox.

As novas tecnologias desenvolvidas para a remoção biológica de nitrogênio são mais adequadas para águas residuárias contendo altas concentrações de amônio, a exemplo do efluente de digestores de lodo e de algumas indústrias específicas. Esses novos processos são geralmente aplicados como processos auxiliares (*side-stream*). Entretanto, estudos recentes vêm sendo realizados na possibilidade de aplicação do processo Anammox na corrente principal do processo de tratamento (WINKLER *et al.*, 2012).

Novas conversões entre compostos nitrogenados ainda estão sendo descobertas no vasto mundo microbiano. Como exemplo, pode-se mencionar a oxidação de amônio realizada por arqueias (KONNEKE *et al.*, 2005) e o sequenciamento de genoma de diversos organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio (STROUS *et al.*, 2006).

Maiores detalhes a respeito dos novos processos de remoção de nitrogênio podem ser encontrados na revisão feita por BASSIN (2011a).

2.2. Remoção biológica de fósforo

A remoção biológica de fósforo pode ser realizada de forma eficiente pelo processo EBPR (*Enhanced biological phosphorus removal*). Os organismos responsáveis pela remoção de fósforo, conhecidos como organismos acumuladores de polifosfato (*polyphosphate-accumulating organisms* - PAO), possuem uma fisiologia complexa, a qual envolve a formação e consumo de polímeros intracelulares (polifosfato, glicogênio e polihidroxialcanoatos) (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1997a).

A seleção de PAO pode ser obtida em sistemas mantidos em condições anaeróbias e aeróbias alternadas. Em anaerobiose, os PAO são capazes de metabolizar fontes de carbono facilmente biodegradáveis, tais como ácidos graxos voláteis (AGV) e armazená-los como polímeros intracelulares, a exemplo de polihidroxialcanoatos (PHA). Caso acetato seja a fonte de carbono, o principal polímero armazenado é o polihidroxibutirato (PHB).

A energia requerida para metabolizar os AGV e para a subsequente formação de PHA é obtida por meio da quebra das cadeias de polifosfato e liberação de fosfato da célula para o meio líquido. O potencial de redução requerido para a formação de PHA provém da glicólise do glicogênio armazenado (MINO *et al.*, 1998; SMOLDERS *et al.*, 1994a, SMOLDERS *et al.*, 1994b). A energia necessária para o transporte de AGV e fosfato através da membrana celular é altamente influenciada pelo pH. Sendo assim, o pH do meio influencia diretamente a razão entre a quantidade de AGV consumido e a liberação de fósforo para o meio líquido (SMOLDERS *et al.*, 1994a).

Na fase aeróbia subsequente, caso o acceptor de elétrons esteja presente e o substrato externo esteja ausente, os PAO utilizam o PHA acumulado como fonte de energia para absorver o fosfato, recuperar as reservas de glicogênio e polifosfato, e crescer. Devido ao crescimento bacteriano, a remoção líquida de fósforo do sistema é positiva, uma vez que lodo em excesso rico em polifosfato é removido do reator (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1997a). O crescimento em substratos intracelulares é uma vantagem competitiva apresentada pelos PAO sobre outras bactérias heterotróficas que não são capazes de metabolizar AGV sem a presença de acceptor de elétrons externo. Caso substrato externo e acceptor de elétrons estejam simultaneamente presentes na fase

aeróbia, o substrato é predominantemente convertido em PHA ao invés de ser utilizado para o crescimento (BRDJANOVIC *et al.*, 1997).

O uso de substrato externo para a formação de polímeros armazenados intracelularmente e não para o crescimento parece ser uma característica intrínseca de micro-organismos quando submetidos a um regime *feast-famine*, isto é, com e sem disponibilidade de substrato. Esse regime é comum de ocorrer em sistemas de tratamento de águas residuárias (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1997b).

Uma característica interessante dos organismos envolvidos da remoção biológica de fósforo é o fato de seu crescimento não estar relacionado diretamente com a disponibilidade de substrato. O uso primário do substrato (PHA) é destinado à recuperação das reservas de polifosfato e glicogênio e para manutenção celular. O crescimento resulta justamente da diferença entre a taxa de consumo de PHA e o consumo desse substrato intracelular para os processos mencionados acima (MURNLEITNER *et al.*, 1997).

Embora a maioria dos sistemas de remoção de fósforo seja operada em condições anaeróbias e aeróbias alternadas, a remoção desse nutriente também pode ser conseguida em sistemas submetidos a condições anaeróbias e anóxicas alternadas. Esses sistemas, em particular, contam com a participação de organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes (DPAO), capazes de utilizar nitrito e/ou nitrato ao invés de oxigênio para o consumo anóxico de fosfato. O nitrito e nitrato são gerados no reator aeróbio destinado à nitrificação. Nesses sistemas, em particular, a remoção de fósforo está acoplada à desnitrificação, processo normalmente conhecido com desfosfatação desnitrificante (KUBA *et al.*, 1993; KERRN-JESPERSEN e HENZE, 1993).

Caso a fração de fosfato removida em condições anóxicas seja maximizada, os custos de operação podem ser significativamente reduzidos devido à economia tanto de aeração despendida para a remoção aeróbia de fosfato quanto de carbono orgânico necessário à desnitrificação. Ademais, uma vez que a produção de ATP com nitrato é aproximadamente 40% menor do que aquela obtida com oxigênio como aceptor de elétrons (KUBA *et al.*, 1996), menor produção de lodo é obtida em condições anóxicas. A Figura 2.2 apresenta esquematicamente o metabolismo anaeróbio e aeróbio de PAOs.

O conteúdo de fósforo do lodo em processos EBPR pode alcançar de 4 a 5% da matéria seca total, quantidade muito maior do que aquela encontrada na biomassa de sistemas convencionais de lodos ativados destinados unicamente à remoção de material orgânico. Nesses últimos sistemas, o percentual de fósforo no lodo representa algo em

torno de 1,5 - 2,0% da matéria seca total. Em sistemas EBPR de escala laboratorial, pesquisas reportam que a quantidade de fósforo pode representar até 15% da matéria seca do lodo (CROCETTI *et al.*, 2000).

Apesar dos sistemas EBPR representarem uma forma sustentável e eficiente de remover fosfato de água residuárias, a estabilidade desse processo pode ser difícil de ser controlada. Uma das principais causas da deterioração do desempenho dos sistemas de remoção biológica de fósforo está ligada à competição entre PAO e organismos acumuladores de glicogênio (GAO). Esses últimos são frequentemente encontrados em sistemas EBPR tendo em vista que também são capazes de proliferar em condições anaeróbias e aeróbias alternadas (CROCETTI *et al.*, 2002, SAUNDERS *et al.*, 2003). Conseqüentemente, competem pelo carbono orgânico com PAO na fase anaeróbia. Os GAO obtêm energia (ATP) e potencial de redução primariamente do glicogênio para metabolizar os AGV em condições anaeróbias e armazenar PHA. Na fase aeróbia subsequente, PHA é oxidado, levando à restauração das reservas de glicogênio e ao crescimento celular (ZENG *et al.*, 2002, ZENG *et al.*, 2003a). Os GAO não contribuem para a remoção de fosfato uma vez que em seu metabolismo não há liberação nem consumo desse composto. Diante disso, esses organismos são usualmente considerados indesejáveis em sistemas EBPR (OEHMEN *et al.*, 2006a, OEHMEN *et al.*, 2006b).

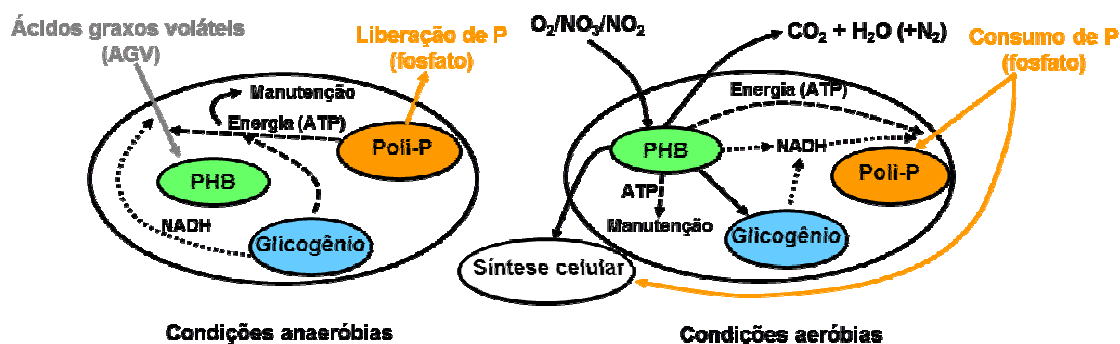


Figura 2.2: Metabolismo de organismos acumuladores de polifosfato em condições anaeróbias ou aeróbias (anóxicas) (adaptado de VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1997a). O metabolismo aeróbio (anóxico) mostrado no esquema representa a situação na qual o substrato externo não está disponível. Os PHA estão representados por PHB no esquema.

Recentemente, diversas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de investigar os fatores que influenciam na competição entre os PAO e GAO. Entre esses fatores encontram-se pH, fonte de carbono e temperatura (FILIPE *et al.*, 2001, OEHMEN *et al.*, 2005a, OEHMEN *et al.*, 2005b, LIU *et al.*, 1997a, LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2008, WHANG e PARK, 2006). Estratégias operacionais que primam por favorecer os PAO

em detrimento aos GAO são de suma importância para melhorar o desempenho e a estabilidade de sistemas de remoção biológica de fósforo.

2.3. Sistemas biológicos utilizados no tratamento de águas residuárias

2.3.1. Sistemas biológicos convencionais

Os sistemas biológicos tradicionais mais empregados no tratamento de águas residuárias são exemplificados pelo processo de lodos ativados, desenvolvido na Inglaterra em 1914 (ARDERN e LOCKETT, 1914). Esse processo é, na verdade, o mais utilizado ainda nos dias de hoje. O sistema de lodos ativados se baseia em cultura mista de micro-organismos, mantidos em suspensão, que inclui bactérias, protozoários e fungos. Toda essa biota age conjuntamente no intuito de maximizar a decomposição de compostos orgânicos e inorgânicos.

Basicamente duas etapas estão envolvidas nesse tratamento: um sistema de aeração e um decantador secundário (Figura 2.3). No tanque de aeração, ar é introduzido tanto para fornecer o oxigênio necessário para oxidação dos poluentes pelos micro-organismos quanto para misturar a água residuária a ser tratada com a biomassa. Após o tratamento biológico propriamente dito, a mistura contendo líquido e biomassa é direcionada a um decantador no qual o lodo ativado sedimenta e pode ser separado do efluente tratado por gravidade. Parte do lodo sedimentado é retornado ao tanque de aeração no intuito de manter uma concentração apropriada de biomassa no mesmo. O efluente clarificado é geralmente descartado em corpos d'água receptores.

Durante o tratamento biológico, as bactérias se reproduzem nutrindo-se dos compostos presentes nas águas residuárias e, conseqüentemente, lodo é produzido. Parte do lodo, comumente designado por lodo em excesso, deve ser descartado. O lodo em excesso pode ainda ser posteriormente digerido em digestores de lodo e desaguado em leitos de secagem ou em equipamentos mecânicos (filtro a vácuo, centrífugas, filtro prensa) antes de sua disposição final.

A eficácia do tratamento biológico em sistemas de lodos ativados depende tanto da ação da comunidade microbiana presente no reator, a qual é responsável pela degradação dos diversos poluentes, quanto da eficiência de separação sólido-líquido no sedimentador. Caso a sedimentabilidade do lodo não seja boa, pode ocorrer arraste (*washout*) de biomassa, diminuindo drasticamente a qualidade do efluente.

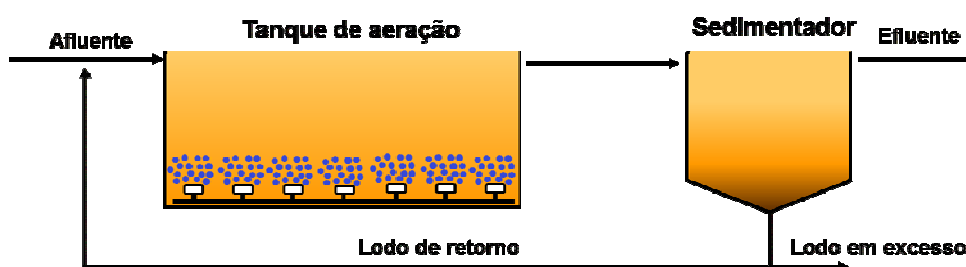


Figura 2.3: Ilustração das principais etapas envolvidas no processo convencional de lodos ativados.

No intuito de possibilitar a remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo), algumas modificações do processo de lodos ativados foram propostas. Por meio da incorporação de zonas anaeróbias, anóxicas e aeróbias (processos de tratamento multi-estágio), não somente matéria orgânica e nitrificação, mas também remoção completa de nitrogênio e fósforo tornou-se possível de ser obtida. Processos como o UCT (*University of Cape Town*) e Bardenpho (com dois, três ou quatro estágios) são alguns dos sistemas aplicados para a remoção de nutrientes de águas residuárias. Basicamente, as principais diferenças entre essas configurações se referem à disposição das diferentes zonas (anaeróbia/anóxica/aeróbia) e das correntes de reciclo.

A necessidade de diversos tanques para se atingir a remoção de matéria orgânica e de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e o requerimento de decantadores para efetuar a separação entre a biomassa e a corrente líquida corroboram para o aumento do espaço físico ocupado pela planta de tratamento. Justamente para superar os problemas relativos à limitação de espaço, inúmeros sistemas compactos foram desenvolvidos ao longo dos anos. A evolução desses sistemas esteve diretamente associada à busca da melhoria do desempenho em relação à remoção de nutrientes.

2.3.2. *Sistemas biológicos compactos*

Diversos sistemas biológicos compactos foram desenvolvidos ao longo dos anos, almejando superar certas limitações intrínsecas dos sistemas convencionais. Conforme relatado anteriormente, a pressão exercida por órgãos ambientais, restringindo cada vez mais os limites de descarte de poluentes no meio ambiente, certamente contribuiu para o avanço e desenvolvimento de diversas novas tecnologias de reatores destinados ao tratamento biológico de resíduos líquidos.

Facilitar a retenção de biomassa no intuito de aumentar a capacidade de tratamento é uma das características comum aos sistemas compactos, que, em sua grande maioria, se baseiam no uso de biofilmes. Alguns dos principais sistemas compactos empregados no tratamento de águas residuárias são:

- Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) e reator de leito de lodo expandido (EGSB - *Expanded Granular Sludge Blanket*);
- Filtros biológicos aerados (BAF – *Biological Aerated Filters*);
- Contactores biológicos rotativos (RBC – *Rotating Biological Contactors*);
- Reatores *airlift* com biofilme em suspensão (BAS - *Biofilm Airlift Suspension reactors*);
- Bioreatores com membranas (MBR – *Membrane Reactors*);
- Reator em batelada sequencial (SBR - *Sequencing batch reactor*);
- Reatores de leito móvel com biofilme (MBBR – *Moving-bed biofilm reactor*);
- Lodo granular aeróbio (AGS – *Aerobic granular sludge*).

Uma breve descrição desses sistemas será feita a seguir. Nesse trabalho de pesquisa, em particular, foram utilizados três dos sistemas mencionados acima (SBR, MBBR e AGS) para investigar importantes aspectos referentes à remoção de nutrientes. Por conveniência, os sistemas serão designados pela sua sigla em inglês.

2.3.2.1. Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) e Reator de leito de lodo expandido (EGSB)

Processos anaeróbios consistem em uma tecnologia sustentável para o tratamento de uma ampla gama de águas residuárias (LETTINGA, 1995, LETTINGA *et al.*, 1995). Na digestão anaeróbia, a matéria orgânica complexa é metabolizada na ausência de oxigênio, resultando em compostos mais simples. Esse processo de degradação é realizado em uma sequência de reações, a saber: hidrólise, acidogênese e metanogênese.

Os processos de tratamento anaeróbio oferecem diversas vantagens, tais como baixo consumo de energia (não necessitam de aeração, por exemplo), produção de

biogás e baixa produção de lodo quando comparados aos sistemas aeróbios. Como consequência, os gastos com disposição de lodo são minimizados. O leito de lodo é composto por micro-organismos que naturalmente formam grânulos de 0,5 a 2,0 mm de diâmetro. O lodo granular formado nos sistemas UASB e EGSB apresenta alta velocidade de sedimentação e, por conseguinte, pode ser facilmente retido no interior do reator sem ser arrastado, mesmo quando altas cargas hidráulicas são aplicadas (LETTINGA *et al.*, 1980; VAN DER LAST e LETTINGA, 1992). Assim, altas cargas orgânicas (de até 40 kg DQO/(m³·d)) podem ser aplicadas e reatores compactos podem ser construídos, reduzindo o requerimento de espaço para a construção da planta.

Em reatores UASB, a água residuária atravessa o leito de lodo em fluxo ascendente, nos quais os micro-organismos ficam em contato com os substratos presentes. O requerimento de energia desse processo é baixo, uma vez que um bom contato entre o lodo e a água residuária é fornecido pela própria agitação e turbulência hidráulica gerada pelo biogás produzido na degradação anaeróbia e pela distribuição uniforme da alimentação na base do reator, sem ser necessário dispositivos mecânicos para desempenhar tal função. Os principais constituintes do biogás são CH₄ e CO₂, embora pequenas quantidades de H₂S, NH₃ e de outros gases possam ser liberadas.

Parte do gás produzido no leito na manta de lodo se mantém unida ao lodo granular (HULSHOFF POL *et al.*, 1983). Durante a sua trajetória em fluxo ascendente, as partículas de lodo se chocam com a base de defletores, os quais liberam as bolhas de gás mantidas em contato com a biomassa, provocando a sua sedimentação. Para assegurar uma separação eficiente entre a água residuária, biomassa e biogás, os sistemas UASB apresentam um separador trifásico (gás-sólido-líquido) colocado no topo do reator, responsável por forçar a sedimentação das partículas, auxiliando na manutenção dos agregados do lodo no interior do reator, os quais retornam ao compartimento de digestão. O biogás produzido durante o tratamento anaeróbio pode ser capturado em dispositivos de coleta de gás posicionados no topo do sistema (LETTINGA *et al.*, 1980; HULSHOFF POL *et al.*, 1983).

O sistema EGSB pode ser considerado uma variante do sistema UASB. A principal diferença entre os dois processos se refere à velocidade ascensional do líquido que atravessa o leito de lodo, que é maior no primeiro sistema. O aumento do fluxo nos sistemas EGSB melhora o contato entre o lodo e a água residuária a ser tratada, e pode ser atingida por meio do aumento da altura do reator e/ou pela incorporação de um reciclo do efluente. Por meio da recirculação do efluente, a velocidade ascensional do

líquido pode ultrapassar 5 – 6 m/h, valor muito superior ao aplicado nos reatores UASB (0,5 – 1,5 m/h) (DE MAN *et al.*, 1988).

Embora o aumento da velocidade ascensional do líquido melhore a mistura no interior do reator, a quantidade de sólidos arrastada do sistema pode ser maior. Dessa forma, um balanço deve ser feito levando-se em consideração a velocidade do líquido necessária para manter uma mistura satisfatória e a manutenção de concentrações de sólidos que permitam boa degradação dos poluentes (KATO *et al.*, 1994). O sistema EGSB é mais indicado para o tratamento de águas residuárias com baixo teor de matéria orgânica (1 - 2 gDQO/L) ou com partículas suspensas de baixa biodegradabilidade que não devem acumular no leito de lodo.

Embora consistam em uma forma eficiente e econômica para o tratamento de águas residuárias contendo altas concentrações de matéria orgânica, os sistemas anaeróbios, como UASB e EGSB, não são tão eficientes para o tratamento de águas residuárias diluídas, tal como esgoto doméstico. Além disso, os processos anaeróbios apresentam algumas desvantagens. Uma delas é a necessidade de pós-tratamento para enquadrar o efluente dentro dos padrões de descarte exigidos pelos órgãos ambientais competentes. Adicionalmente, a remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) é pouco significativa e patógenos podem estar presentes no efluente proveniente de sistemas anaeróbios. Outras desvantagens se referem ao período de partida dos processos anaeróbios, que é muito mais lento do que aquele dos processos aeróbios, e à temperatura do reator, que deve ser relativamente elevada (>20°C).

2.3.2.2. Filtros biológicos aerados (BAF)

Os BAF combinam a degradação dos poluentes (essencialmente matéria orgânica e amônio) por meio de agentes microbianos com filtração da matéria orgânica suspensa por meio do uso de diversos materiais suportes (ROGALLA e BOURBIGOT, 1990). A remoção completa de nitrogênio e fósforo pode ser obtida em determinadas situações. Uma característica importante desses sistemas é o reduzido requerimento de espaço físico comparado com os processos convencionais. Para se ter uma ideia, esses reatores ocupam apenas um quinto da área do processo convencional de lodos ativados (EPA, 1983).

Os BAF são compostos de fase sólida, líquida e gasosa. A fase sólida consiste de material suporte para o crescimento microbiano; a fase líquida é onde o material sólido

está submerso; e a fase gasosa é proveniente da aeração do reator (MENDOZA-ESPINOSA e STEPHENSON, 1999). A hidrodinâmica dos sistemas BAF é influenciada pelas fases líquida e gasosa, como também pela disposição do material suporte (LE CLOIREC e MARTIN, 1984). Por sua vez, a hidrodinâmica afeta diretamente o desenvolvimento e a estrutura do biofilme (WILDERER *et al.*, 1995). A ausência de um estágio destinado à separação de sólidos, tal como um sedimentador, evita problemas relacionados à sedimentação e recirculação do lodo.

Os BAF são usualmente operados com velocidade de líquido de 1 a 10 m³/(m²·h) (STENSEL *et al.*, 1988, VEDRY *et al.*, 1994). Entretanto, estudos reportam o uso de velocidades ainda maiores, tais como 30 m³/(m²·h) (PELADAN *et al.*, 1997). Esses sistemas podem ser operados tanto em regime de fluxo ascendente quanto descendente, dependendo do modo como a água residuária é alimentada ao reator (a partir da base ou topo). Sistemas de fluxo ascendente com fluxo concorrente de ar/líquido são conhecidos por suportar maiores vazões quando comparados com os de fluxo descendente. Além disso, a duração do filtro nos primeiros sistemas pode ser maior, uma vez que a formação de bolsas de ar é evitada e a oxigenação é mais efetiva (bolhas não coalescem e retém sua razão superfície-volume ideal) (MENDOZA-ESPINOSA e STEPHENSON, 1999). Outra vantagem dos BAF de fluxo ascendente se refere à diminuição dos problemas de odor ocasionados pelo *stripping* de compostos voláteis, uma vez que o ar atmosférico está somente em contato com o efluente tratado (IIDA e TERANISHI, 1984).

A profundidade do leito de material suporte de filtros biológicos aerados de escala industrial é de 2 - 4 m (STENSEL *et al.*, 1988, PUJOL *et al.*, 1994). O material suporte utilizado nesses reatores pode apresentar maior ou menor densidade do que a água. No caso de ser mais denso que a água, o meio é submerso, sendo o material suporte fabricado, por exemplo, a partir de produtos naturais como filossilicatos. Em contrapartida, meios flutuantes podem ser produzidos de materiais sintéticos, como poliestireno (ROS e MEJAC, 1991, VEDRY *et al.*, 1994).

Retrolavagens periódicas são necessárias para evitar o entupimento do leito devido ao crescimento do biofilme, aumentando os custos de operação. Sistemas recheados de material denso requerem maior fluxo quando da realização de retrolavagens, contribuindo para o encarecimento do processo.

2.3.2.3. Contactores biológicos rotativos (RBC)

Os sistemas RBC consistem em uma série de discos circulares montados em um eixo que gira lentamente a uma velocidade de 1 a 2 rpm. Os discos se encontram parcialmente submersos (em torno de 40% de sua área superficial) em um tanque no qual a água residuária a ser tratada é alimentada continuamente. Os discos são geralmente feitos de plástico (PVC, polieteno, poliestireno expandido). A biomassa cresce aderida aos discos plásticos enquanto os mesmos giram, formando filmes microbianos. Os biofilmes geralmente apresentam uma população bacteriana ativa, responsável pela degradação dos diversos poluentes presentes na água residuária. A espessura do biofilme depende da composição da água residuária, podendo atingir de 1 a 2 mm (SØRENSEN e JØRGENSEN, 1993).

Quando o biofilme aderido ao disco é exposto ao ar, oxigênio é fornecido para os micro-organismos. Em contrapartida, quando o biofilme está submerso no meio líquido, substratos presentes na água residuária se tornam disponíveis ao conjunto microbiano e são metabolizados. O excesso de lodo pode ser removido por meio da tensão de cisalhamento criada pela rotação dos discos. Para remover os sólidos desprendidos dos discos, um sedimentador pode ser colocado após o RBC (SØRENSEN e JØRGENSEN, 1993).

O desempenho do RBC pode ser melhorado por meio do aumento do número de discos em série. Em geral, os discos podem ser arranjados em diferentes compartimentos separados por defletores. Se múltiplos estágios estiverem disponíveis, os primeiros estágios recebem a maior concentração de matéria orgânica, o que favorece o crescimento de uma vasta diversidade de organismos heterotróficos. Quando a concentração de material orgânico diminui nos estágios subsequentes do reator, o biofilme pode ser colonizado por bactérias nitrificantes. Dessa forma, além de remoção de orgânicos, nitrificação também pode ser obtida nos sistemas RBC (HUANG, 1986).

Entre algumas vantagens dos contactores biológicos rotativos estão o baixo requerimento de energia, baixos custos operacionais e a não necessidade de reciclo de lodo (biomassa aderida cresce constantemente). No entanto, problemas mecânicos são comuns de ocorrer no sistema de rotação, fazendo com que manutenções frequentes sejam necessárias.

2.3.2.4. Reatores *airlift* com biofilme em suspensão (BAS)

Reatores *airlift*, em geral, consistem em sistemas gás-líquido ou gás-líquido-sólido, caracterizados pela movimentação de um fluido em padrões pré-definidos através de canais apropriadamente projetados para esse propósito. A mistura do reator é promovida por uma corrente de ar, que, além de contribuir para agitar o conteúdo do reator, facilita a troca de material entre a fase gasosa e as fases líquida/sólida.

Os reatores *airlift* e as colunas de bolha são sistemas bastante similares. A diferença entre eles está relacionada ao padrão do fluxo líquido, o qual depende primariamente da geometria do sistema. O sistema de coluna de bolhas é um recipiente simples no qual ar é introduzido na base e uma mistura casual é gerada pelas bolhas em trajetória ascendente. Já os reatores *airlift* são divididos em duas diferentes zonas: o *riser* e o *downcomer*. O *riser* é geralmente aerado, consistindo em um canal para a corrente ascendente de gás e líquido. O *downcomer*, por sua vez, consiste em um canal paralelo ao *riser* no qual ocorre o fluxo descendente de líquido. As diferentes densidades de fluido em diversas regiões do reator (com gás e sem gás) geram uma diferença de pressão que é a força motriz para a circulação do fluido.

O *riser* e o *downcomer* são ligados no topo e na base do reator, formando um *loop*. Gás é injetado próximo à base do *riser*. A configuração do reator e especialmente o separador de gás influenciam diretamente a fração de gás liberada no topo do reator e a fração incorporada ao líquido de trajetória descendente. Por sua vez, a fração de gás afeta a dinâmica de fluido e o desempenho do sistema. Os sistemas BAS são aplicados em diversos processos biotecnológicos, como no tratamento biológico de águas residuárias (HEIJNEN *et al.*, 1990, ZHOU *et al.*, 2003, WALTERS *et al.*, 2009). Nesses sistemas, a fase sólida é geralmente composta por um material suporte (basalto, areia, carvão ativado e materiais cerâmicos) que suporta o crescimento dos micro-organismos. Oxigênio é transferido a partir das bolhas de ar para filme microbiano. Um separador trifásico é colocado no topo do reator. O material suporte fornece alta área superficial para o desenvolvimento do biofilme, aumentando a concentração de biomassa e por conseguinte a capacidade de tratamento do sistema.

Como importantes características dos reatores *airlift* com biofilme em suspensão pode-se mencionar: simples projeto e construção, padrões de escoamento bem definidos e boa mistura. Entretanto, uma vez que esses reatores são alimentados de forma contínua, um separador trifásico relativamente complexo é necessário para separação das fases sólida, líquida e gasosa. Além disso, para se obter a desnitrificação, o nitrato formado durante o processo de nitrificação precisa ser circulado em uma zona anóxica

separada (reator *airlift* desnitrificante CIRCOX), aumentando a complexidade do sistema. A remoção de fósforo não é realizada em sistemas BAS.

2.3.2.5. Biorreatores com membranas (MBR)

Os biorreatores com membranas consistem em uma combinação entre o processo convencional de lodos ativados, responsável pela biodegradação dos compostos presentes no resíduo líquido e a tecnologia de separação por membranas, utilizada para separar o efluente tratado da biomassa. A combinação entre a degradação biológica e a filtração por membranas oferece diversas vantagens. O uso de membranas para a separação biosólido-líquido ao invés de um sedimentador convencional permite a remoção completa de sólidos em suspensão do efluente, o qual é desprovido de bactérias e agentes patogênicos. Dessa forma, o efluente gerado no processo pode atingir mais facilmente os requerimentos de descarte. Em adição, problemas relacionados à sedimentabilidade do lodo são eliminados (CHIEMCHAI SRI *et al.*, 1992).

Uma vez que a biomassa é integralmente retida no reator, a concentração de lodo é geralmente muito superior àquela presente nos sistemas tradicionais de lodos ativados. Como consequência, os sistemas MBR podem ser construídos de maneira muito mais compacta, diminuindo consideravelmente o espaço físico da planta de tratamento. A completa retenção de biomassa no interior do reator ainda permite a separação entre o tempo de retenção hidráulica e o tempo de retenção de sólidos sem a necessidade de recirculação do lodo, similarmente ao que ocorre nos sistemas com biofilme, favorecendo o controle da atividade biológica e a flexibilidade de operação. Bactérias de crescimento lento, como as nitrificantes, podem ser mantidas no sistema mesmo quando o tempo de retenção de sólidos é baixo (CICEK *et al.*, 2001), sendo esse parâmetro passível de controle por meio da remoção do lodo em excesso.

Existem basicamente dois tipos principais de MBR. Em um deles, a unidade de membrana está localizada no interior do reator e, portanto, essa configuração é chamada de submersa. A força motriz através da membrana é obtida pela pressurização do reator ou pela criação de uma pressão negativa no lado do permeado (BUISSON *et al.*, 1998). Na outra configuração de MBR, denominada de externa, ocorre a recirculação do líquido através da membrana, sendo a mesma localizada fora do biorreator. Nesse caso, a força motriz é fornecida pela alta velocidade de fluxo cruzado ao longo da superfície

da membrana (URBAIN *et al.*, 1998). São diversos os tipos de membranas utilizadas em instalações de MBR, a saber: tubular, disco rotatório, fibra oca, membranas orgânicas e inorgânicas. O diâmetro de poro varia de 0,01 a 0,4 μm (VISVANATHAN *et al.*, 2000).

Algumas das principais desvantagens encontradas nos biorreatores com membrana são a polarização de concentração e outros problemas relacionados ao entupimento da membrana, os quais interrompem a operação e requerem procedimento de limpeza (química ou mecânica). Agentes químicos de limpeza estão relacionados à reação físico-química entre o composto químico e as incrustações. Por sua vez, a limpeza mecânica baseia-se na remoção física dos sólidos em suspensão da membrana e geralmente depende da turbulência causada pela aeração, retrolavagem e circulação de líquido. O lodo em excesso, removido periodicamente, pode apresentar problemas de sedimentação e filtração (CICEK *et al.*, 1999).

Os altos custos envolvidos na implementação da tecnologia MBR limita a sua aplicação. O desenvolvimento de módulos de membrana que apresentem custo mais baixo e menor consumo de energia e que sejam mais eficientes certamente vai contribuir para propagar ainda mais a tecnologia MBR em todo o mundo.

2.2.2.6. Reator em batelada sequencial (SBR)

Embora o uso de sistemas de lodos ativados com operação intermitente, mais conhecidos por reatores em batelada sequencial (*Sequencing batch reactor* - SBR), tenha se iniciado há décadas, foi a partir do início da década de 80 que essa tecnologia tornou-se mais difundida e aplicada no tratamento de águas residuárias. O melhor conhecimento desse processo, o desenvolvimento de uma instrumentação mais robusta e a utilização de sistemas de controle automático impulsionaram o uso dos SBR (VON SPERLING, 1996).

O processo de lodos ativados com operação intermitente incorpora todos os processos associados ao tratamento tradicional de lodos ativados (oxidação biológica e separação sólido/líquido) em um único tanque, os quais ocorrem em sequências no tempo e não em sequências de unidades separadas, como no ocorre no processo convencional de regime contínuo. Como consequência, a área requerida para a construção dos SBR é bem inferior em comparação com os sistemas tradicionais favorecendo a sua aplicação em regiões nas quais a disponibilidade de espaço físico é

um fator limitante. Além disso, os processos SBR permitem reduzir em até 60% os custos de operação em comparação com o processo de lodos ativados (NG *et al.*, 1993).

Em virtude das etapas do tratamento ocorrerem em apenas um sistema singular, ciclos de operação com tempos de duração definidos são estabelecidos. A biomassa permanece no reator de um ciclo para outro, fazendo com que o uso de decantadores externos não seja necessário. As etapas que compõem um ciclo de um SBR, ilustradas na Figura 2.4, são:

- ✓ **Enchimento:** Ocorre a entrada da água residuária a ser tratada, contendo os poluentes a serem degradados pelo consórcio microbiano. O enchimento pode incluir diversas fases de operação e está sujeito a vários modos de operação, a saber: enchimento estático, enchimento com mistura e enchimento com reação. O enchimento estático, como é o caso deste trabalho, envolve a introdução do afluente sem mistura ou reação, sendo esse modo de operação mais comum em estações destinadas à remoção de nutrientes (WILDERER *et al.*, 1997). Esse tipo de enchimento resulta no mínimo de energia despendida e alta concentração de substrato até o final do enchimento (VON SPERLING, 1996). A mistura e a reação são efetuadas na etapa de enchimento com reação. Vale lembrar que o mesmo sistema pode alternar as diversas formas de enchimento (enchimento estático, com mistura, e com reação).

- ✓ **Reação:** A etapa de reação tem a finalidade de completar as reações iniciadas durante o enchimento. Esta etapa compreende a mistura do líquido presente no reator, aeração, ou ambos. De forma semelhante ao ciclo de enchimento, os processos podem requerer ciclos alternados de aeração, propiciando condições anóxicas/anaeróbias e aeróbias (VON SPERLING, 1996, WILDERER *et al.*, 1997). A duração da fase de reação pode ser controlada por temporizadores, pelo nível de líquido ou pelo grau de tratamento desejado. Dependendo da quantidade e duração da aeração durante a fase de enchimento, pode ou não ocorrer uma fase de reação específica (VON SPERLING, 1996).

- ✓ **Sedimentação:** Como o próprio nome diz, nesta etapa ocorre a sedimentação e a separação entre os sólidos em suspensão e o efluente tratado (sobrenadante). Sua operação é análoga a de um decantador secundário em uma estação de tratamento convencional. A decantação em um sistema intermitente pode ter uma eficiência

superior em comparação com aquela obtida em regime contínuo devido ao maior tempo de repouso do líquido no sistema batelada, no qual não há interferência de entrada e saída de líquidos como ocorre no sistema convencional de lodos ativados (VON SPERLING, 1996).

- ✓ Descarte do efluente tratado: O descarte do efluente tratado clarificado é realizado na etapa de esvaziamento do reator, sendo essa etapa efetuada através de vários mecanismos, entre os quais os mais comuns consistem em vertedores flutuantes ou ajustáveis (VON SPERLING, 1996).
- ✓ Repouso: A fase terminal é denominada de repouso, que é utilizada apenas em aplicações com vários tanques. Neste estágio, ocorre o ajuste de ciclos e a remoção do lodo excedente. Similarmente aos processos convencionais de fluxo contínuo, a quantidade e a frequência de descarte do lodo são estabelecidas em função dos requisitos de desempenho (VON SPERLING, 1996).

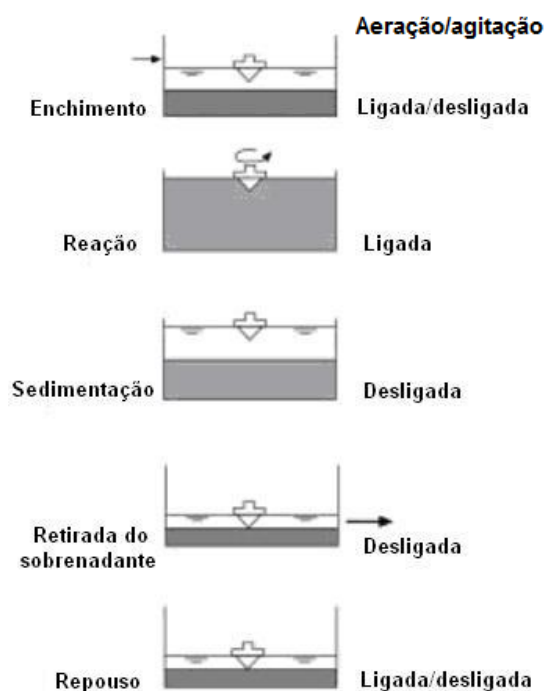


Figura 2.4: Representação esquemática de um ciclo de operação de um reator em batelada sequencial (SBR) (adaptado de VON SPERLING, 1996).

A duração de cada ciclo pode ser alterada em função das variações de carga alimentada ao sistema, dos objetivos operacionais de tratamento e das características do efluente desejadas (VON SPERLING, 1996). Em geral, a duração de um ciclo varia de algumas horas a um dia. É comum a operação, em paralelo, de dois ou mais reatores em batelada sequencial, especialmente quando a vazão de alimentação é contínua. Nesse conjunto de reatores, em geral, cada um deles se encontra em uma etapa do ciclo operacional. Em estações que recebem despejos de forma intermitente, um reator é geralmente suficiente.

Quando comparado aos sistemas de lodos ativados de fluxo contínuo, o fluxograma do processo é bastante simplificado, tendo em vista a eliminação de diversas unidades. Além disso, a construção simplificada, a facilidade de colocação de equipamentos com instalações relativamente simples e a boa sedimentabilidade do lodo tornam o sistema SBR mais atraente do ponto de vista operacional. A flexibilidade do processo é outra característica importante dos processos descontínuos, nos quais se consegue o ajuste do tempo dos ciclos através da mudança do tempo das fases, tudo podendo ser programado através de um controlador automático do sistema. Assim, os SBR são dotados de relativa simplicidade para o equacionamento de problemas provenientes de grandes variações de carga (WILDERER *et al.*, 1997). Além disso, por meio da manipulação do ciclo operacional, é possível que se obtenha a remoção de matéria orgânica e nutrientes (nitrogênio e fósforo), conforme evidenciado em diversos trabalhos reportados na literatura (HAMAMOTO *et al.*, 1997, KARGI e UYGUR, 2004, DEBSARKAR *et al.*, 2006). Outros trabalhos descrevem a aplicação de sistemas SBR para o tratamento de águas residuárias contendo alta salinidade e alta concentração de nitrogênio amoniacal (WOOLARD e IRVINE, 1994, CHANG *et al.*, 2000). A tecnologia SBR também é bastante apropriada para a formação e desenvolvimento de grânulos aeróbios, conforme será descrito no item 2.3.2.8.

Uma modificação dos SBR com biomassa suspensa é o reator com biofilme em bateladas sequenciais (*Sequencing batch biofilm reactor* – SBBR), nos quais a biomassa cresce aderida a suportes fixos ou móveis ao invés de crescer em suspensão (WILDERER e MCSWAIN, 2004). Esse sistema apresenta inúmeras vantagens, como alta área superficial para o crescimento microbiano e permite a operação do reator com maior tempo de retenção celular, favorecendo o crescimento de bactérias de crescimento lento (JAAR e WILDERER, 1992). Altas concentrações de biomassa

também podem ser obtidas independentemente das características de sedimentação do lodo e do tempo de retenção hidráulica.

2.3.2.7. Reatores de leito móvel com biofilme (MBBR)

O reator de leito móvel com biofilme (*Moving bed biofilm reactor* - MBBR) foi desenvolvido na Noruega no final dos anos 80 e início dos anos 90. Esse processo baseia-se no uso de suportes móveis nos quais os micro-organismos formam biofilmes. Em sistemas aeróbios, a própria aeração é responsável pela movimentação dos suportes (Figura 2.5a). Já em sistemas anaeróbios/anóxicos, um agitador mecânico é geralmente utilizado para esse propósito (Figura 2.5b).

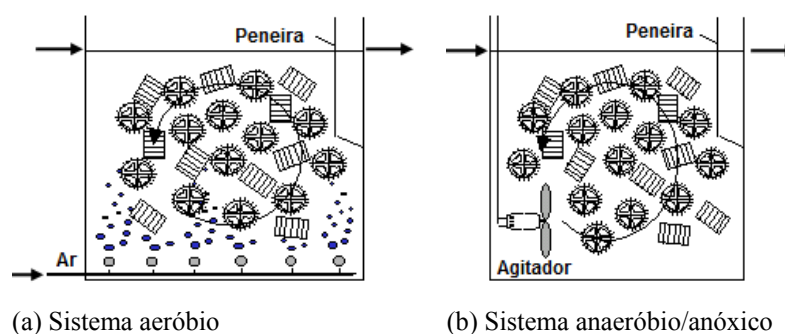


Figura 2.5: Reator de leito móvel com biofilme (adaptado de RUSTEN *et al.*, 2006).

O uso de suportes móveis minimiza ou ainda dispensa o retorno de lodo do sedimentador (ØDEGAARD, 2006). Conseqüentemente, a área requerida para a construção do sistema de tratamento é significativamente menor e os custos de construção são diminuídos consideravelmente. É bastante comum referir-se à quantidade de suporte adicionada ao reator como uma fração de enchimento com os suportes, muitas vezes é denominada simplesmente de razão de recheio, isto é, a razão entre o volume ocupado pelos suportes e o volume total do reator (V_S/V_R). O aumento da concentração de biomassa no reator é conseguido pelo aumento da fração de enchimento. Esse parâmetro pode ser alterado conforme desejado, embora sejam recomendadas frações de enchimento menores que 70%, a fim de permitir boas condições de mistura e propiciar boa movimentação dos suportes sem prejudicar a hidrodinâmica do processo (RUSTEN *et al.*, 2006, SALVETTI *et al.*, 2006). Para que

os suportes móveis sejam mantidos no interior do reator, uma peneira é instalada na saída do mesmo, conforme mostrado na Figura 2.5.

Os suportes mais comuns utilizados em MBBR têm sido desenvolvidos pela empresa AnoxKaldnes[®], sendo os mesmos projetados com diferentes diâmetros e formas. A densidade é de aproximadamente 0,95 g/cm³ para todos os tipos (SALVETTI *et al.*, 2006; RUSTEN *et al.*, 1998). A Tabela 2.2 mostra algumas características importantes de alguns suportes MBBR. Alguns suportes com o biofilme aderido são mostrados na Figura 2.6.

Tabela 2.2: Características de alguns suportes desenvolvidos pela AnoxKaldnes[®] (adaptado de Rusten *et al.*, 2006 e <http://www.anoxkaldnes.com>).

| | Tipo de suporte AnoxKaldnes [®] | | | | | | |
|--|--|-----|-----|-----------|-----------|---------------|---------------|
| | K1 | K2 | K3 | Natrix C2 | Natrix F3 | BiofilmChip M | BiofilmChip P |
| Diâmetro nominal (mm) | 9.1 | 15 | 25 | 36 | 64 | 48 | 45 |
| Comprimento nominal (mm) | 7,2 | 15 | 12 | 30 | 50 | 2,2 | 3,0 |
| Densidade aparente (kg/m ³) | 150 | 95 | 100 | - | - | - | - |
| Área específica superficial (m ² /m ³)* | 500 | 350 | 500 | 220 | 200 | 1200 | 900 |

* Área teórica total disponível para a adesão microbiana/volume de reator. Nesse caso, considera-se o sistema completamente cheio com os suportes.

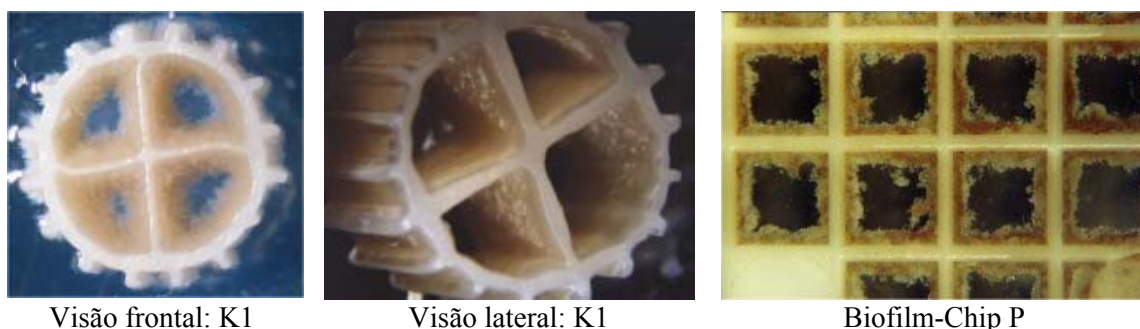


Figura 2.6: Diferentes tipos de materiais suporte da AnoxKaldnes[®] contendo o biofilme aderido (Fonte: Cortesia Veolia).

Quando comparados com outros sistemas com biofilme nos quais a biomassa está aderida a suportes fixos, os sistemas MBBR, além de apresentarem menor perda de carga, não apresentam problemas de entupimento (colmatação) do leito de partículas (RUSTEN *et al.*, 2006). Por conseguinte, retrolavagens não são necessárias. A tecnologia MBBR pode ser aplicada em plantas de tratamento já existentes para melhorar o

seu desempenho, sendo necessárias apenas pequenas modificações. A introdução de materiais suportes em sistemas de lodos ativados, por exemplo, pode melhorar a estabilidade do reator, especialmente quando o lodo não sedimenta de forma satisfatória. Nesse caso, particular, a biomassa estará presente tanto em suspensão quando na forma de biofilme aderido ao material suporte. Caso ocorram problemas no decantador secundário fazendo com que uma grande quantidade de lodo seja arrastada do sistema, pelo menos a biomassa aderida aos suportes é mantida no reator.

Em MBBR aeróbios, o sistema de aeração apresenta dupla função: fornecer oxigênio para os micro-organismos e movimentar os suportes por todo o volume do reator. Isso obviamente repercute no aumento do consumo de energia, sendo essa uma das desvantagens do processo. Levando em consideração a dupla função da aeração nesses reatores, o projeto dos aeradores deve ser realizado de tal maneira que as bolhas de ar geradas não sejam muito grandes, o que levaria à queda substancial do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}). As bolhas tampouco devem ser muito pequenas, uma vez que, embora favoreçam o transporte de oxigênio do meio difusor para o meio líquido, apresentam a desvantagem de não propiciarem boa movimentação dos suportes. Para atingir boa mistura dos suportes no interior do reator e evitar regiões estagnadas, tubos perfurados são usualmente utilizados em plantas MBBR de escala piloto e industrial. A intensidade de aeração também afeta diretamente o desprendimento de biomassa dos suportes. Fica evidente que o projeto apropriado do sistema de aeração é um importante critério a ser considerado quando da aplicação dessa tecnologia.

Devido às diversas vantagens oferecidas pela tecnologia MBBR, a mesma vem sendo extensivamente empregada tanto para o tratamento de águas residuárias municipais (RUSTEN *et al.*, 1995, ZHAO *et al.*, 2006, HU *et al.*, 2009, KERMANI *et al.*, 2008) quanto industriais (JI *et al.*, 2001; BORGHEI e HOSSEINI, 2004, SHIN *et al.*, 2006, RATCLIFFE *et al.*, 2006, BASSIN *et al.*, 2011a). Outros aspectos importantes da tecnologia MBBR podem ser encontrados na revisão realizada por BASSIN e DEZOTTI (2011).

2.3.2.8. Lodo granular aeróbio (AGS)

A tecnologia de lodo granular foi inicialmente concebida para sistemas anaeróbios em 1980, sendo a formação dos grânulos realizada em reatores anaeróbios

de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) (LETTINGA *et al.*, 1980). O longo tempo de partida do processo, requerimento de elevadas temperaturas, baixa remoção de nutrientes e inadequação desses sistemas para o tratamento de águas residuárias com baixa concentração de orgânicos impulsionou o desenvolvimento da tecnologia de lodo granular aeróbio. A primeira patente dessa tecnologia foi concedida a HEIJNEN e VAN LOOSDRECHT (1998).

Representando um dos grandes avanços em biotecnologia ambiental, a tecnologia de granulação aeróbia é promissora e inovadora para a área de tratamento de águas residuárias. Os grânulos aeróbios são agregados microbianos esféricos ou elípticos auto-imobilizados, isto é, consistem em um caso especial de biofilme que não requer o uso de material suporte. Esses sistemas biológicos apresentam uma grande diversidade de micro-organismos, incluindo bactérias aeróbias e facultativas, cada qual com sua função específica na degradação dos poluentes presentes em águas residuárias (LIU e TAY, 2004).

Primordialmente, a biogranulação envolve interações entre células, contemplando fenômenos biológicos, físicos e químicos, os quais estão relacionados com a formação de associações multicelulares bastante estáveis e contíguas. Para que as bactérias presentes em uma cultura se agreguem, diversas condições devem ser asseguradas (LIU e TAY, 2004). Em linhas gerais, a granulação aeróbia consiste em um processo gradual envolvendo a transformação de lodo ativado em agregados compactos, os quais posteriormente adquirem a forma de lodo granular e finalmente de grânulos maduros (TAY *et al.*, 2001).

O lodo granular aeróbio não coagula em tensões hidrodinâmicas reduzidas e sua velocidade de sedimentação é muito superior àquela apresentada pelo lodo ativado (DE KREUK *et al.*, 2005a). O lodo granular apresenta velocidade de sedimentação que varia de 18 a 90 m/h (ZHENG *et al.*, 2005, XIAO *et al.*, 2008). O índice volumétrico de lodo (IVL), outro parâmetro relacionado à sedimentação, é menor que 80 mL/L (ZHENG *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005). No caso dos grânulos aeróbios, o IVL₅ é o mesmo do IVL₃₀. O diâmetro dos grânulos é maior que 0,2 mm, podendo alcançar até 16 mm (BEUN *et al.*, 1999, TOH *et al.*, 2003, ZHENG *et al.*, 2006, LI *et al.*, 2008a).

Uma peneira pode ser utilizada para classificação dos grânulos e para observar a proporção de grânulos no total de biomassa. O processo de granulação é considerado completo quando a percentagem de grânulos for equivalente a 80% do total de sólidos

presentes no reator (de KREUK *et al.*, 2005a). A estrutura do lodo granular aeróbio está ilustrada na Figura 2.7.

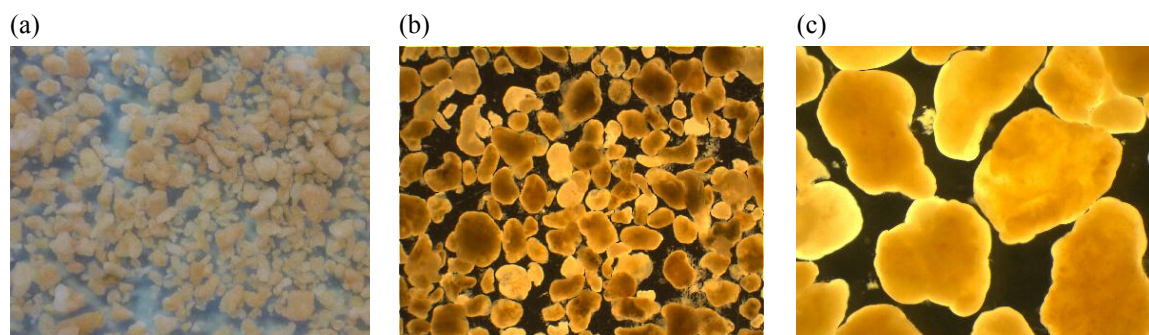


Figura 2.7: Estrutura do lodo granular. Tamanho real (a), aumento de 7,5x (b), aumento de 20x.

Algumas importantes características apresentadas pelo lodo granular aeróbio são (BEUN *et al.*, 1999; LIU e TAY, 2004, DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004, ADAV *et al.*, 2008, SHI *et al.*, 2009, GAO *et al.*, 2011):

- Excelente sedimentabilidade, favorecendo a separação entre os sólidos e o efluente;
- Forma regular, lisa e praticamente arredondada;
- São visíveis e formam uma fase separada no líquido durante as fases de aeração e sedimentação;
- Possibilitam a retenção de altas concentrações de biomassa no reator e permitem a operação com altos tempos de retenção celular;
- Estrutura microbiana densa e forte, capaz de suportar altas velocidades de fluxo;
- Presença de zonas anaeróbias e anóxicas no interior da estrutura granular, permitindo a ocorrência de diferentes processos biológicos na mesma unidade reacional, tais como nitrificação e desnitrificação simultâneas e nitrificação parcial do amônio a nitrito e reação Anammox;
- Menores custos de operação em comparação com o processo convencional de lodos ativados.

Uma das primeiras pesquisas que descreveu a formação e o desenvolvimento de lodo granular aeróbio foi realizada por MORGENROTH *et al.* (1997), em um reator em batelada sequencial (SBR). Subsequentemente, diversos estudos reportaram a formação de grânulos aeróbios no mesmo tipo de biorreator (BEUN *et al.*, 1999, PENG *et al.*, 1999, ETTER e WILDERER, 2001, TAY *et al.*, 2001, LIU e TAY, 2002).

O processo de granulação é influenciado por diversos fatores, tais como composição de substrato (TAY *et al.*, 2001), inóculo (LIU e TAY, 2004), carga orgânica (Li *et al.*, 2008b, ADAV *et al.*, 2010), estratégia de alimentação (MCSWAIN *et al.*, 2003, DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004), configuração do reator (LIU *et al.*, 2005a), tempo de sedimentação (QIN *et al.*, 2004), temperatura (DE KREUK *et al.*, 2005b), concentração de oxigênio dissolvido (MCSWAIN STURM e IRVINE, 2008) e forças hidrodinâmicas promovidas pela aeração (TAY *et al.*, 2001).

Os grânulos aeróbios são cultivados preferencialmente em sistemas SBR. O tempo de sedimentação nesses reatores é umas das mais importantes pressões de seleção utilizadas para se obter a granulação. Pequenos tempos de decantação devem ser aplicados para que somente partículas com alta velocidade de sedimentação (>15 m/h) sejam retiradas no reator. Em contrapartida, partículas com velocidades de sedimentação menores, tais como os flocos microbianos, são arrastadas do sistema. Consequentemente, altas cargas volumétricas podem ser aplicadas, resultando em uma configuração compacta. Caso elevados tempos de decantação sejam empregados, a biomassa pouco sedimentável não será removida efetivamente e pode competir com as partículas formadoras de grânulos. Consequentemente, o processo de granulação pode vir a falhar (LIU *et al.*, 2005b).

Um dos principais fatores responsáveis pela densidade dos grânulos é a taxa de crescimento dos micro-organismos. Organismos de crescimento lento, tais como os nitrificantes, formam grânulos mais densos e estáveis do que organismos que crescem rapidamente, tais como os heterotróficos (VILLASEÑOR *et al.*, 2000; DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004). Grânulos menos estáveis são indesejáveis uma vez que são susceptíveis às tensões de cisalhamento e podem facilmente se desintegrar. Um método para selecionar organismos de crescimento lento em sistemas alimentados com substratos altamente biodegradáveis é convertê-los em polímeros intracelulares como polihidroxialcanoatos (PHA). Essa conversão pode ser obtida por meio da aplicação de um regime *feast-famine* em um sistema descontínuo. Na fase *feast*, os substratos facilmente biodegradáveis são convertidos em PHA. Caso essa etapa seja realizada em condições anaeróbias, organismos acumuladores de polifosfato (PAO) e/ou organismos acumuladores de glicogênio (GAO) podem ser selecionados (DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004). Tais organismos possuem uma taxa de crescimento similar às bactérias nitrificantes (BRDJANOVIC *et al.*, 1998a, LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2009). O desenvolvimento de PAO no lodo granular aeróbio possibilita a remoção de fosfato

da água residuária. Entretanto, caso a fase *feast* seja mentida em condições aeróbias, o crescimento de outras bactérias heterotróficas será favorecido. Por conseguinte, grânulos de forma irregular irão aparecer nos sistemas, prejudicando as propriedades de sedimentação e levando ao arraste de biomassa do reator.

Os polímeros armazenados intracelularmente podem ser utilizados para o crescimento e manutenção durante o período *famine*, no qual o substrato externo é limitado. O crescimento baseado em PHA é geralmente mais lento que aquele baseado em substratos facilmente biodegradáveis (BEUN *et al.*, 2002a). Com isso, a formação de polímeros de reserva favorece o desenvolvimento de grânulos densos e estáveis (BEUN *et al.*, 2002b).

Em sistemas de lodo granular, é possível se obter a remoção simultânea de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo. Ao invés de diferentes compartimentos utilizados nos processos baseados em lodos ativados, os processos paralelos ocorrem no mesmo sistema, em diferentes zonas no interior dos grânulos. A Figura 2.8 ilustra as principais conversões que ocorrem no lodo granular aeróbio quando uma fase *feast* anaeróbia é aplicada, seguida de uma fase *famine* aeróbia. Nessas condições, a comunidade microbiana do reator é composta primordialmente de PAO, bactérias nitrificantes e bactérias desnitrificantes. É importante ressaltar que a composição microbiana é diretamente influenciada pela composição da água residuária, inóculo e condições de operação.

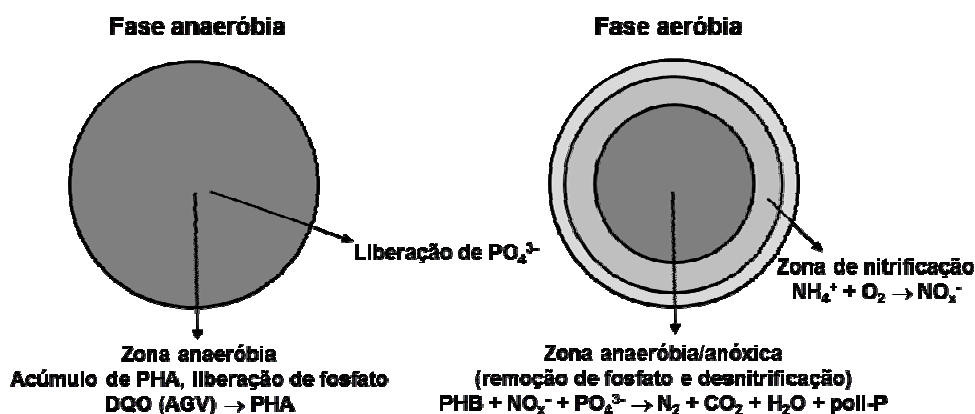


Figura 2.8: Esquema das principais conversões ocorrendo nas diferentes camadas do lodo granular aeróbio durante a fase *feast* (a) e fase *famine* (b). A composição das diferentes zonas durante a fase aeróbia depende da concentração de oxigênio dissolvido no *bulk*. NO_x^- : NO_2^- e/ou NO_3^- .

Durante a fase aeróbia de um SBR de lodo granular, os processos de nitrificação e desnitrificação ocorrem simultaneamente nas diferentes camadas dos grânulos aeróbios. A nitrificação ocorre na região externa dos grânulos, onde as bactérias autotróficas nitrificantes estão localizadas. O nitrito e nitrato formados durante a nitrificação podem se difundir para o interior do grânulo (região anóxica) e serem desnitrificados. Os PHA armazenados durante a fase anaeróbia podem funcionar como doador de elétrons para a desnitrificação, etapa que é geralmente acoplada à remoção anóxica de fosfato (desfosfatação desnitrificante). Esse último processo é realizado por organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes (DPAO). A eficiência de remoção de nitrogênio depende da distribuição das zonas aeróbias e anóxicas, fato relacionado à concentração de oxigênio no meio líquido (DE KREUK *et al.*, 2005c).

Em decorrência de suas características singulares, a tecnologia de granulação aeróbia vem sendo aplicada com sucesso para a remoção de matéria orgânica (ARROJO *et al.*, 2004), nutrientes (nitrogênio e fósforo) (DE KREUK *et al.*, 2005c), substâncias tóxicas (TAY *et al.*, 2004) e bio sorção de metais pesados (LIU *et al.*, 2002, LIU *et al.*, 2003). Maiores detalhes sobre o processo de granulação aeróbia podem ser encontrados na revisão escrita por Bassin (2011b).

2.4. Técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana

A identificação de populações específicas de micro-organismos em diversos ecossistemas concebidos pela engenharia (por exemplo, reatores biológicos aplicados no tratamento de águas residuárias) por meio de técnicas de ecologia microbiana molecular representa um grande marco no avanço da engenharia ambiental ao longo dos anos. Os métodos moleculares aumentaram enormemente a visão sobre a vasta diversidade de micro-organismos em sistemas biológicos complexos sem a necessidade de cultivá-los. As técnicas moleculares baseiam-se em pequenas subunidades ribossomais (16S rRNA para procariontes), as quais são usadas como marcadores moleculares. Genes do RNA ribossomal são evolutivamente conservados, sendo bastante úteis para descrever as relações filogenéticas entre os organismos (WOESE, 1987).

Diversas técnicas moleculares baseadas na amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) e comparação das sequências de rRNA têm sido usadas para identificar os micro-organismos presentes em sistemas de tratamento de águas residuárias. Como exemplo, pode-se mencionar eletroforese em gel com gradiente de

desnaturantes (DGGE), polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP), clonagem e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

A técnica de DGGE é baseada na diferente mobilidade dos fragmentos de DNA desnaturado, que possuem o mesmo tamanho (por exemplo, gene rRNA amplificado com fragmentos de aproximadamente 500 pb) mas com distinta sequência de ácidos nucleicos, gerando diferentes padrões de bandas que funcionam como verdadeiro código de barra, refletindo a diversidade microbiana da amostra estudada. Bandas de DGGE individuais pode ser excisadas do gel e sequenciadas para revelar a verdadeira identidade dos micro-organismos envolvidos (MUYZER *et al.*, 1993; MUYZER e SMALLA, 1998). A técnica DGGE tem sido extensivamente utilizada para observar variações das comunidades microbianas e as sucessões dos micro-organismos ao longo do tempo.

A técnica T-RFLP é um método alternativo ao DGGE no estudo dos perfis apresentados por comunidades microbianas. Na T-RFLP, por exemplo, o gene 16S rRNA é amplificado com *primers* universais, sendo um deles marcado por fluorescência com um fluorocromo, e o produto é digerido com enzimas de restrição cortantes. As enzimas de restrição têm a capacidade de reconhecer sequências específicas de bases na dupla fita de DNA e clivar ambos os fragmentos duplex em pontos específicos (STRYER, 1996). Supondo que cada espécie presente na amostra apresente diferenças na sequência do gene amplificada, o fragmento de restrição terminal vai possuir tamanho diferente, podendo então ser separado por meio de eletroforese em gel. Além disso, é possível sequenciar e identificar os fragmentos terminais de restrição gerados comparando-os com uma base de dados de sequencias. A determinação do tamanho e quantidade desses fragmentos é igualmente possível. O padrão de T-RFLP obtido funciona como uma verdadeira impressão digital das comunidades microbianas (LIU *et al.*, 1997b).

A clonagem de produtos PCR também é bastante útil em estudos de ecologia. Nessa técnica, certa sequência de genoma presente nos produtos de PCR é inserida em outro DNA denominado de vetor, que é normalmente um plasmídeo. Subsequentemente, o vetor é inserido em células competentes (por exemplo, de *Escherichia coli*), onde pode se multiplicar e produzir novos plasmídeos contendo o fragmento clonado. O DNA plasmídico pode ser extraído, sequenciado e uma biblioteca de clones pode ser criada. A afiliação filogenética das sequências que foram clonadas

pode ser determinada por meio de programas de computador específicos, tais como o ARB.

Outra técnica aplicada para detectar bactérias específicas em culturas mistas é a técnica de FISH, a qual é baseada na existência de sequências conhecidas e específicas do rRNA de um organismo, as quais permitem que se desenhe uma sequência complementar a elas. Essas sequências específicas são conhecidas como sondas oligonucleotídicas, as quais consistem em pequenas sequências de DNA (15 – 25 pb) marcadas com fluorescência. As sondas reconhecem e hibridizam com sequências específicas de rRNA nas células fixas (combinação DNA – RNA), podendo ser visualizadas por meio de um microscópio de epifluorescência. Desse modo, micro-organismos podem ser rapidamente identificados em determinado sistema biológico (AMANN *et al.*, 1990a). A especificidade das sondas possibilita a detecção/identificação em qualquer nível taxonômico desejado, desde o Domínio até uma resolução que permita a diferenciação de espécies. Ademais, análises quantitativas podem ser realizadas por meio de FISH, podendo-se dessa forma obter a abundância de certas bactérias em relação ao total da população microbiana (WAGNER *et al.*, 1993).

Recentemente, métodos moleculares mais sofisticados começaram a ser aplicados em estudos de tratamento de águas residuárias, tais como microarranjos de DNA (KELLY *et al.*, 2005). Essas tecnologias possuem máximo rendimento uma vez que permitem examinar rapidamente a composição microbiana de um determinado ambiente (WILSON *et al.*, 2002, DENNIS *et al.*, 2003). Uma descrição completa dos métodos moleculares empregados para o estudo de comunidades microbianas em sistemas de tratamento de águas residuárias pode ser encontrada na revisão realizada por Bassin *et al.* (2011b).

A combinação entre os métodos moleculares e engenharia de processo fornece uma visão mais ampla do sistema de tratamento, permitindo aumentar seu desempenho e confiabilidade do reator. Por meio da aplicação da “engenharia microbiana”, a competição entre micro-organismos presentes nos sistemas de tratamento de águas residuárias pode ser controlada no intuito de melhorar seu desempenho e estabilidade.

**Influência de diferentes condições de
operação no desenvolvimento do
biofilme, na nitrificação e na população
de organismos nitrificantes em reatores
de leito móvel com biofilme**

3. Influência de diferentes condições de operação no desenvolvimento do biofilme, na nitrificação e na população de organismos nitrificantes em reatores de leito móvel com biofilme

3.1. Introdução

A nitrificação é considerada a etapa limitante em sistemas de remoção de nutrientes (TSUNEDA *et al.*, 2003). A estabilidade do processo nitrificante depende de diversas condições ambientais, tais como temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido. Além disso, as bactérias nitrificantes são bastante susceptíveis à inibição pela presença de compostos orgânicos tóxicos (PAGGA *et al.*, 2006), metais pesados (HU *et al.*, 2002), altas concentrações salinas (MOUSSA *et al.*, 2006), e até mesmo altas concentrações de substrato e as espécies não aniônicas relacionadas (ANTHONISEN *et al.*, 1976, SEVIOUR e BLACKALL, 1999).

Um dos parâmetros mais críticos para o processo de nitrificação é a concentração de material orgânico na água residuária a ser tratada, a qual influencia diretamente a competição entre as populações de bactérias heterotróficas e autotróficas nitrificantes (HANAKI *et al.*, 1990, CHENG e CHEN, 1994). A razão entre a demanda química de oxigênio e nitrogênio (DQO/N) afeta o desempenho da nitrificação, especialmente em sistemas com biofilme, nos quais a competição entre os micro-organismos heterotróficos e nitrificantes por oxigênio e espaço é ainda mais acirrada (TIJHUIS *et al.*, 1994a, VAN BENTHUM *et al.*, 1997). Altas concentrações de matéria orgânica favorecem o desenvolvimento de bactérias heterotróficas, que competem com as bactérias autotróficas por oxigênio (FIGUEROA e SILVERSTEIN, 1992, HARREMOËS, 1982). Como o primeiro conjunto de micro-organismos cresce muito mais rapidamente que os últimos, os mesmos levam vantagens nessa competição, e, por conseguinte, a eficiência de nitrificação tende a diminuir (LEE *et al.*, 2004).

Entretanto, a presença de bactérias heterotróficas pode ser vantajosa para as bactérias nitrificantes em determinadas circunstâncias. A camada de biofilme formada pelo conjunto microbiano heterotrófico pode funcionar como uma espécie de proteção para as bactérias nitrificantes contra o desprendimento (FURUMAI e RITTMANN, 1994). Desse modo, um ambiente apropriado é criado pelos organismos heterotróficos para que os autotróficos possam se desenvolver. Ademais, estudos reportam que as

bactérias autotróficas nitrificantes dificilmente formam biofilmes por si próprias, devido a sua baixa taxa de crescimento e à falta de produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), conhecidas por aumentar a adesão de biomassa a superfícies (TSUNEDA *et al.*, 2001). Consequentemente, o desenvolvimento de biofilmes nitrificantes na superfície de materiais suporte em sistemas alimentados com água residuária apresentando limitação ou ausência de compostos orgânicos, pode vir a ser um processo bastante lento (TSUNEDA *et al.*, 2001). Nesse contexto, reter uma quantidade significativa de bactérias nitrificantes em reatores com biofilme mantidos em condições autotróficas pode ser uma tarefa difícil.

Nos últimos anos, observou-se um crescente interesse por processos com biofilmes para o tratamento de águas residuárias. Os sistemas baseados em biofilmes oferecem inúmeras vantagens quando comparados com os sistemas tradicionais de biomassa dispersa, tal como o consagrado processo de lodos ativados. Entre as vantagens dos sistemas com biomassa imobilizada estão o menor requerimento de espaço físico e fácil separação entre sólidos e líquidos. Uma das tecnologias em ascensão é o reator de leito móvel com biofilme (MBBR), desenvolvido em meados da década de 80 (ØDEGAARD *et al.*, 1994). Esse processo baseia-se no uso de materiais suporte plásticos nos quais os micro-organismos formam biofilmes. Desse modo, bactérias de crescimento lento, tais como as nitrificantes, podem ser mais facilmente retidas no reator sem serem arrastadas. Essa característica representa, de fato, uma grande vantagem em relação aos sistemas tradicionais, os quais frequentemente sofrem com perda de biomassa ativa como consequência de problemas operacionais. O uso de suportes móveis minimiza ou ainda dispensa o retorno de lodo do decantador, simplificando a operação do sistema (ØDEGAARD, 2006). Quando comparados com outros reatores com biofilme dotados de materiais suportes fixos, os sistemas MBBR apresentam menor perda de carga e não sofrem entupimento (RUSTEN *et al.*, 2006).

Devido a essas características especiais, a tecnologia MBBR vem sendo aplicada para o tratamento de uma ampla gama de águas residuárias em escala laboratorial (YU *et al.*, 2007, BASSIN *et al.*, 2011a), escala piloto (SHIN *et al.*, 2006), e escala industrial (JOHNSON *et al.*, 2000). Apesar das diversas pesquisas envolvendo essa tecnologia de reatores, são escassos os estudos a respeito do efeito de diferentes condições operacionais no desenvolvimento de biofilmes enriquecidos com bactérias nitrificantes, cruciais para o tratamento de águas residuárias contendo alta concentração de amônio. Além disso, nenhuma pesquisa utiliza polissacarídeos e proteínas como parâmetros para

monitorar tendências da quantidade de biomassa aderida aos suportes móveis de sistemas MBBR. Nesse trabalho, investigou-se o efeito de alguns parâmetros, tais como composição do afluente e regime de alimentação (contínuo e em batelada sequencial), no desenvolvimento de biofilmes nitrificantes e no processo de nitrificação. São igualmente descritos alguns métodos úteis que podem ser utilizados no intuito de reduzir o tempo requerido para a obtenção de biofilmes nitrificantes em materiais suporte de sistemas MBBR. A estrutura física do biofilme e a evolução da comunidade microbiana foram monitoradas e esses parâmetros foram relacionados com o desempenho do reator em termos de nitrificação. A possibilidade de se aplicar um reator operado em bateladas sequenciais para o tratamento de água residuária com alta concentração de amônio também se insere entre os objetivos dessa pesquisa.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. reatores de leito móvel com biofilme: configuração e condições operacionais

Os experimentos foram conduzidos em três reatores de leito móvel com biofilme de escala laboratorial, fabricados em acrílico. Todos os sistemas foram operados em paralelo. Dois reatores retangulares (MBBR₁ e MBBR₂) com 42 cm de altura, 24 cm de largura e 11,8 cm de comprimento, apresentando volume útil de 5 L, foram operados em regime contínuo. A Figura 3.1 apresenta um esquema dos sistemas MBBR₁ e MBBR₂.

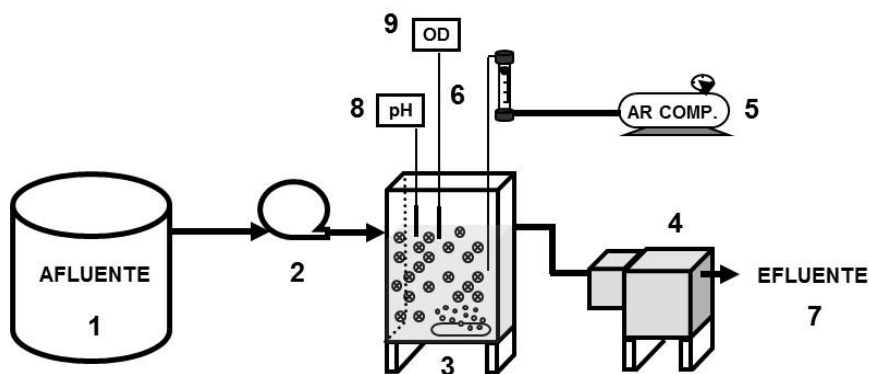


Figura 3.1: Representação esquemática dos sistemas MBBR₁ e MBBR₂: 1) afluente acondicionado em bombonas; 2) bomba peristáltica; 3) reator; 4) decantador; 5) ar comprimido; 6) rotâmetro para ajuste da vazão de ar; 7) efluente tratado; 8) eletrodo de pH (não fixo); 9) eletrodo de oxigênio dissolvido (não fixo).

O outro sistema (50 cm de altura, 18 cm de largura e 10 cm de comprimento), com 7 L de volume útil, consistiu em um reator com biofilme em bateladas sequenciais (SBBR). Esse sistema é mostrado na Figura 3.2.

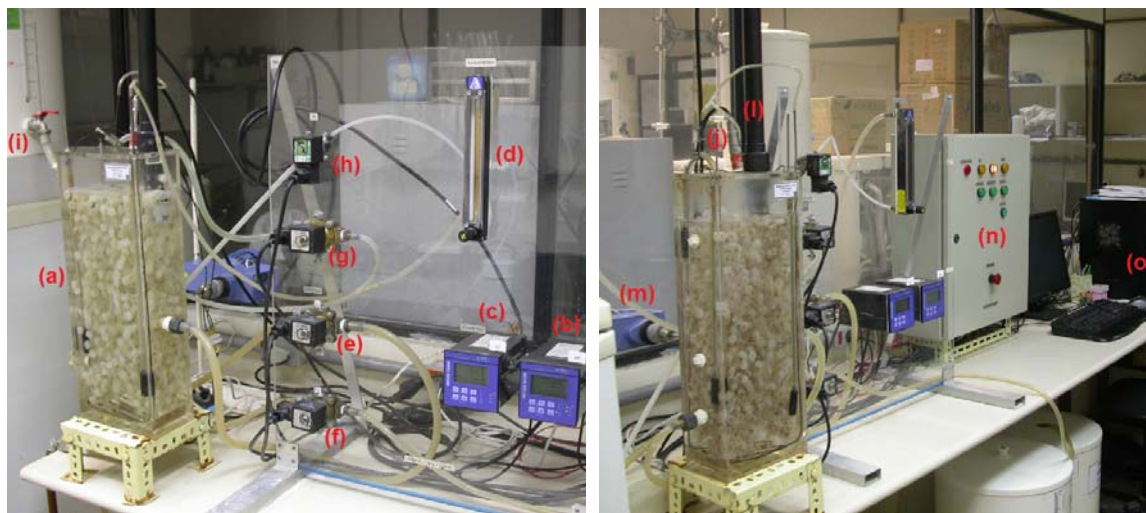


Figura 3.2: Fotos ilustrativas do sistema SBBR; a) Reator (volume útil de 7L); b) Controlador de pH; c) Medidor de oxigênio dissolvido; d) rotâmetro; e) válvula solenóide de entrada; f) válvula solenóide de saída; g) válvula solenóide para adição de barrilha; h) válvula solenóide para controle da aeração; i) reservatório de barrilha; j) eletrodo de pH; l) eletrodo de oxigênio dissolvido; m) agitador; n) painel de controle do PLC; o) computador com programa conectado ao PLC.

A atuação das bombas e válvulas no SBBR foi controlada por meio de um controlador lógico programável (CLP) conectado a um computador para aquisição de dados. O tempo do ciclo foi de 48 ou 24 h, sendo o mesmo composto pelas seguintes fases: 3 min de alimentação, 47 h 54 min de aeração (para o ciclo de 48 h) ou 23 h 54 min (para o ciclo de 24 h), e 3 min de drenagem. A fase de decantação não foi necessária uma vez que a biomassa estava aderida ao suporte plástico. A percentagem de volume trocado a cada ciclo era de 85%, o que resulta em um tempo de residência hidráulica de 56 h (para o ciclo de 48 h) e 28 h (para o ciclo de 24 h). Os reatores foram preenchidos com suportes AMB[®], de formato cilíndrico com 9 mm de altura e 15 mm de diâmetro, e que apresentavam área superficial para o crescimento microbiano de 500 m²/m³ de reator. A fração de material suporte em relação ao volume do reator correspondeu a 40% ($V_{\text{suporte}}/V_{\text{reator}}$).

Um decantador foi colocado após o MBBR₁ e o MBBR₂ para a coleta de amostras líquidas e também para se ter uma ideia do teor de sólidos oriundos do

desprendimento do biofilme dos suportes. A aeração foi promovida por meio de difusores de ar porosos fabricados de polipropileno, colocados na base de cada reator. Além de promover boa transferência de oxigênio para a fase líquida, a distribuição das bolhas de ar geradas por esse tipo de difusor também permitiu circulação apropriada dos suportes no interior do reator, evitando, dessa maneira, áreas estagnadas indesejáveis. A concentração de oxigênio dissolvido nos reatores alimentados continuamente foi mantida na faixa entre 6,5 – 7,0 mg/L. No SBBR, a concentração de oxigênio dissolvido variou ao longo do ciclo operacional. Em todos os reatores, a temperatura foi mantida em $24 \pm 3^\circ\text{C}$ e o pH situou-se na faixa entre 6,5 a 7,5 por meio da adição de solução NaOH 1M ou HCl 1M. Os reatores foram alimentados com meio sintético (Tabela 3.1), preparado com componentes inorgânicos (CAMPOS *et al.*, 1999) e orgânicos (HOLLER e TROSCH, 2001). Uma solução de elementos traço (VISHNIAC e SANTER, 1957), cuja composição está mostrada na Tabela 3.2, foi adicionada na proporção de 0,5 ml/L de meio para todos os reatores. O meio sintético, quando provido de componentes orgânicos, foi armazenado sob refrigeração (4°C).

Tabela 3.1: Componentes inorgânicos e orgânicos do meio sintético.

| Componentes inorgânicos ^a | Concentração (mg/L) ^c | Componentes orgânicos ^b | Concentração (mg/L) ^c |
|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| NH ₄ Cl | 382 | Peptona de caseína | 192 |
| KH ₂ PO ₄ | 222 | Extrato de carne | 132 |
| MgSO ₄ | 53 | Uréia | 36 |
| NaCl | 889 | | |
| NaHCO ₃ | 900 | | |

^a Adaptado do meio descrito por CAMPOS *et al.* (1999)

^b Adaptado do meio descrito por HOLLER e TROSCH (2001)

^c Concentrações foram variadas de acordo com a DQO e concentrações de amônio desejadas nos diferentes regimes operacionais.

Tabela 3.2: Composição da solução de micronutrientes.

| Componente | Concentração (mg/L) |
|---|---------------------|
| EDTA | 50000 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 1036 |
| MnCl ₂ | 3220 |
| ZnSO ₄ | 12354 |
| CaCl ₂ | 5540 |
| CoCl ₂ | 880 |
| CuSO ₄ | 1004 |
| FeSO ₄ | 2728 |

As condições operacionais do MBBR₁, MBBR₂ e SBBR estão descritas na Tabela 3.3. Dependendo do reator e do regime experimental, a composição do meio sintético foi modificada em virtude da DQO e das concentrações de amônio afluente desejadas.

Tabela 3.3: Condições experimentais do MBBR₁, MBBR₂ e SBBR.

| Sistema | Regime experimental | DQO afluente (mg/L) | NH ₄ ⁺ -N afluente (mg/L) | TRH ^a ou tempo de ciclo ^b (h) | Tempo de operação (dias) |
|---|---------------------|---------------------|---|---|--------------------------|
| MBBR ₁ (reator contínuo) | 1 | 0 | 90 - 100 | 48 ^a | 103 (60) ^c |
| | 2 | 0 | 140 - 170 | 48 ^a | 32 |
| | 3 | 0 | 180 - 200 | 48 ^a | 31 |
| | 4 | 0 | 180 - 200 | 36 ^a | 32 |
| | 5 | 0 | 180 - 200 | 24 ^a | 28 |
| MBBR ₂ (reator contínuo) | 6 | 400 | 100 - 200 | 24 ^a | 73 (30) ^c |
| | 7 | 200 | 100 - 200 | 24 ^a | 26 |
| | 8 | 100 | 100 - 200 | 24 ^a | 21 |
| | 9 | 0 | 100 - 200 | 24 ^a | 23 |
| SBBR (reator em batelada sequencial) | 10 | 400 | 150 - 200 | 56 ^a /48 ^b | 39 (20) ^c |
| | 11 | 400 | 150 - 200 | 28 ^a /24 ^b | 24 |
| | 12 | 200 | 150 - 200 | 28 ^a /24 ^b | 16 |
| | 13 | 0 | 290 - 300 | 28 ^a /24 ^b | 33 |
| | 14 | 0 | 550 - 650 | 28 ^a /24 ^b | 53 |
| | 15 | 0 | 1200 - 1300 | 28 ^a /24 ^b | 26 |

^a Tempo de retenção hidráulica: reatores contínuos (MBBR₁ e MBBR₂)

^b Tempo de ciclo: reator em batelada sequencial (SBBR)

^c Período de partida para o desenvolvimento do biofilme durante o regime 1 (MBBR₁), regime 6 (MBBR₂) e regime 10 (SBBR).

Uma fase de partida (*start-up*) destinada ao início da formação do biofilme foi introduzida no começo de cada regime experimental em todos os reatores. O MBBR₁ foi alimentado somente com substratos inorgânicos durante todo o seu período de operação (Tabela 3.1). Esse reator foi inoculado com biomassa em suspensão proveniente de um reator em batelada sequencial de escala laboratorial, o qual foi alimentado com o mesmo meio sintético inorgânico do MBBR₁ por um período de dois meses para a obtenção de uma população nitrificante substancial. Essa estratégia de operação foi realizada para observar como ocorreria o desenvolvimento do biofilme no MBBR₁ quando uma cultura rica em nitrificantes fosse inoculada ao reator.

O MBBR₂ foi inicialmente alimentado com meio sintético contendo componentes inorgânicos e orgânicos (Tabela 3.1), sendo inoculado com lodo ativado proveniente de uma planta de tratamento de águas residuárias municipais (ETIG, Rio de

Janeiro), sem prévia aclimação. O objetivo nesse reator era primeiramente colonizar o biofilme com biomassa heterotrófica contendo pequena quantidade de microorganismos nitrificantes e gradualmente enriquecer a biomassa em nitrificantes por meio da redução da carga orgânica, conforme indicado na Tabela 3.3.

O SBBR foi inoculado com a mistura da biomassa desprendida dos materiais suportes do MBBR₁ (durante o regime 2) e do MBBR₂ (durante o regime 6). Esse procedimento foi realizado no SBBR para observar se a inoculação de biomassa adaptada a sistemas MBBR iria favorecer o desenvolvimento do biofilme.

3.2.2. *Análise microscópica do biofilme*

A caracterização do biofilme de todos os reatores foi realizada pelo meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica (MO).

A MEV foi utilizada para observação da estrutura do biofilme. Amostras representativas de cada um dos sistemas foram coletadas no final de alguns dos regimes de operação. Inicialmente, um pedaço de material plástico foi cortado com uma navalha cortante de forma cuidadosa para que a estrutura original do biofilme fosse mantida. Em seguida, a preparação da amostra foi realizada conforme descrito a seguir: fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M por 1 h; três etapas de lavagem de 10 min cada com tampão cacodilato 0,1 M; pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 1 h; três etapas de lavagem de 10 min cada com tampão cacodilato 0,1 M; desidratação gradual com sucessivas imersões de 10 min cada em soluções de etanol de concentração gradualmente aumentada (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e secagem em equipamento de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030, Balzers, Liechtenstein). Após o procedimento de secagem, os pedaços de suporte contendo o biofilme foram montados em *stubs* de alumínio e levadas ao metalizador (Balzers FL-9496), onde receberam um banho de vapor de ouro por dois minutos, finalizando com isso o processo de preparação da amostra para visualização em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5310).

A observação da microfauna presente na biomassa foi realizada por meio do microscópio óptico, marca Zeiss, modelo Axioplan 2, e as imagens foram obtidas por meio da câmera ColorView XS acoplada ao microscópio. A biomassa foi removida dos suportes móveis por meio de agitação dos mesmos em tubos falcon, seguida de

centrifugação para sua deposição. As amostras foram colocadas em lâminas e recobertas com lamínulas. O volume de amostra foi de aproximadamente 0,2 mL.

3.2.3. *Hibridização in situ por fluorescência (FISH)*

Amostras de biomassa foram removidas dos suportes com auxílio de uma espátula foram coletadas no final de cada regime operacional de todos os sistemas. As amostras de biomassa foram lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) 1× (4,3 mM Na₂HPO₄ + 1,47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl, pH 7,0) e foram fixadas em uma solução de paraformaldeído (concentração final de 3%) por 3 h a 4°C. Subsequentemente, a amostra foi centrifugada a 13000 g por 1 min, levada duas vezes em PBS 1×, e ressuspensa em uma solução de etanol/PBS (1:1) para ser armazenada a -20°C. Durante a etapa de hibridização, as amostras previamente fixadas foram espalhadas em lâminas de microscópio e foram colocadas em um forno a 46°C para secagem. As células dispersas em pequenos pocinhos de lâminas de microscópio foram subsequentemente desidratadas gradualmente em três etapas de 3 min cada com soluções de etanol de 50%, 80% e 96% (v/v). Após a desidratação, 10 µL de solução tampão de hibridização contendo 0,9 M NaCl, 0,02 M Tris-HCl, 35% (v/v) de formamida para todas as sondas e 0,02% (m/v) de dodecil sulfato de sódio, incluindo as sondas oligonucleotídicas marcadas com diferentes fluorocromos, foram adicionados às células. A hibridização foi realizada em recipiente úmido por um período de 1 h 30 min a 46°C. Uma etapa de lavagem adicional para remover o excesso de sonda foi realizada por meio da imersão das lâminas em uma solução contendo tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8), 0,01% (m/v) de dodecil sulfato de sódio, 0,08 mM de NaCl e 0,005 mM de EDTA durante 10 min a 48°C. Cada poço das lâminas foi lavado com água milli-Q, seco com ar comprimido e embebido em 2 µL em óleo de montagem Vectashield H-1000 para fluorescência (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Axioplan 2, Zeiss) e a aquisição de imagens foi realizada com uma câmera Leica D350F. A hibridização foi realizada com diferentes fluorocromos para cada sonda no intuito de validar os resultados. As imagens foram exportadas com o formato jpg a partir do programa de imagens do microscópio Zeiss (AxioVision versão 4.7). Diversas sondas oligonucleotídicas específicas para bactérias nitrificantes (bactérias oxidadoras de amônio e oxidadoras de nitrito) e bactérias anammox utilizadas nessa pesquisa são listadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Sondas oligonucleotídicas específicas a determinados grupos microbianos.

| Sonda | Sequência (5'-3') | Grupo-alvo | Mistura ^a | Referência |
|-------------|-----------------------|---|----------------------|---------------------------------|
| Neu 653 | CCCCTCTGCTGCACTCTA | Halotolerantes e halofílicas obrigatórias <i>Nitrosomonas</i> | | Wagner <i>et al.</i> (1995) |
| Nse 1472 | ACCCAGTCATGACCCCC | <i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>N. eutropha</i> , <i>N. halophila</i> | | Juretschko <i>et al.</i> (1998) |
| Nso 1225 | CGCCATTGTATTACGTGTGA | Oxidadoras de amônio β - <i>Proteobacteria</i> | AOBmix | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Nso 190 | CGATCCCCTGCTTTTCTCC | Oxidadoras de amônio β - <i>Proteobacteria</i> | | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Nmv | TCCTCAGAGACTACGCGG | <i>Nitrosococcus mobilis</i> | | Juretschko <i>et al.</i> (1998) |
| Nit 1035 | CCTGT CTCCATGCTCCG | <i>Nitrobacter</i> spp. | | Wagner <i>et al.</i> (1996) |
| Ntspa 662 | GGAATTCCGCGCTCCTCT | <i>Nitrospira</i> | NOBmix | Daims <i>et al.</i> (2001) |
| AMX 368 | CCTTTTCGGCATTGCGAA | Todas <i>Anammox</i> | | Schmid <i>et al.</i> (2003) |
| AMX 820 | AAAACCCCTCTACTTAGTGCC | <i>Brocadia</i> e <i>Kueneia</i> | Anammox | Schmid <i>et al.</i> (2000) |
| EUB 338 I | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | Maioria das bactérias | | Amann <i>et al.</i> (1990b) |
| EUB 338 II | GCAGCCACCCGTAGGTGT | <i>Planctomycetes</i> | EUBmix | Daims <i>et al.</i> (1999) |
| EUB 338 III | GCTGCCACCCGTAGGTGT | Verrucomicrobiales | | Daims <i>et al.</i> (1999) |

^a Combinação de sondas para detectar certo grupo de bactérias

3.2.4. Medidas analíticas e procedimentos de cálculo

Sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV), demanda química de oxigênio (DQO) e amônio foram quantificados de acordo com métodos padrão (APHA, 1995). Cinco materiais suporte representativos foram coletados de cada reator, e a biomassa foi desprendida dos mesmos para determinação dos SST e SSV. Vale mencionar que esses sólidos, mantidos em suspensão após o seu desprendimento do suporte, se referem aos sólidos originalmente aderidos ao suporte. No entanto, manteve-se a denominação padrão frequentemente utilizada na literatura, isto é, SST e SSV. A quantidade total de SST e SSV foi calculada com base no número total de suportes no reator. A concentração de biomassa no efluente, ligada diretamente à

quantidade de biomassa desprendida dos suportes, também foi determinada. Nitrato e nitrito foram analisados, respectivamente, por meio de cromatografia iônica (Dionex ICS 90) e kit analítico fornecido pela Hack Co. Nos sistemas alimentados continuamente, oxigênio dissolvido (OD) foi monitorado com um medidor de OD WTW (Oxi 538). Temperatura e pH foram medidos com o auxílio de um eletrodo específico (Oakton pH 110 meter). No SBBR, OD, temperatura e pH foram medidos em tempo real.

Para a obtenção de outro indicativo da concentração da biomassa nos reatores, foram determinadas as concentrações de polissacarídeos e proteínas do biofilme aderido aos materiais suportes. Dois materiais suportes representativos de cada reator foram colocados em um tubo falcon. Uma solução de NaOH 1N foi adicionada aos tubos, os quais foram aquecidos a 90°C por 5 min para promover a lise completa das células. A determinação de polissacarídeos foi realizada de acordo com o método proposto por DUBOIS *et al.* (1956). A concentração de proteína total foi determinada conforme o ensaio de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu.

Balanços de massa para o nitrogênio foram realizados levando-se em consideração a concentração de nitrogênio afluente (na forma de amônio) e de nitrogênio efluente (na forma de amônio remanescente, nitrito e nitrato). A quantidade de amônio nitrificado e obtido na forma final de nitrato foi designada como recuperação de nitrogênio no meio líquido (*bulk*). Taxas específicas de consumo de amônio ao longo do ciclo operacional do SBBR foram obtidas por meio de regressão linear da concentração de amônio ao longo do tempo dividida pela concentração de SSV no reator. Amônia livre (FA, sigla do nome em inglês, *free ammonia*) e ácido nitroso (FNA, sigla do nome em inglês, *free nitrous acid*) foram calculados de acordo com as equações propostas por ANTHONISEN *et al.* (1976).

Para o cálculo da amônia livre, foi utilizada a seguinte equação (3.1).

$$[NH_3] = \frac{[(NAT) \cdot 10^{pH}]}{K_a + 10^{pH}} \quad (3.1)$$

Onde *NAT* representa a concentração de nitrogênio amoniacal total e K_a representa a constante de dissociação da amônia, sendo esta última ser calculada pela Equação (3.2).

$$K_a = e^{\left(\frac{6344}{273+T(^{\circ}C)}\right)} \quad (3.2)$$

Para o cálculo do ácido nitroso, foi utilizada a Equação (3.3).

$$[HNO_2] = \frac{[N - NO_2]}{K_b \cdot 10^{pH}} \quad (3.3)$$

Onde K_b representa a constante de dissociação do ácido nitroso, podendo ser calculada pela Equação (3.4).

$$K_b = e^{\left(\frac{-2300}{273+T(^{\circ}C)}\right)} \quad (3.4)$$

Uma vez que a formação de biofilme consiste em um processo dinâmico influenciado pela adesão de micro-organismos a superfícies e posterior desprendimento dos mesmos, a taxa específica superficial de desprendimento do biofilme (k_d) foi calculada. Para tanto, utilizou-se a Equação 3.5.

$$k_d = \frac{r_x}{A_{total_biofilme}} \quad (3.5)$$

Onde $r_x \left[\frac{gSSV}{d} \right]$ é a taxa de produção de biomassa (SSV), calculada de acordo com a Equação (3.6) .

$$r_x = \frac{(X_{t+\Delta t} - X_t) + \sum_{i=t}^{t+\Delta t} X_i}{ND} \quad (3.6)$$

Onde $X_{t+\Delta t} [gSSV]$ é a quantidade total de biomassa no reator no dia $t+\Delta t$, $X_{dayt} [gSSV]$ é a quantidade de biomassa no dia X, $X_i [gSSV]$ é a quantidade de biomassa arrastada do sistema junto com o efluente no dia i ($t \leq i \leq t+\Delta t$), ND é o número de dias entre o dia

t e o dia $t+\Delta t$; e $A_{biofilme} [m^2]$ é a área superficial específica de um único material suporte disponível para o crescimento microbiano, isto é, $500 m^2/m^3$ reator (valor fornecido pelo fabricante). Dessa forma, em 5 L (MBBR₁ e MBBR₂) e 7 L (SBBR) de reator, a $A_{biofilme}$ é de 2,5 e 3,5 m^2 , respectivamente. A área superficial total ($A_{total_biofilme}$) foi calculada multiplicando-se a área superficial do suporte disponível para crescimento microbiano (2,5 ou 3,5 m^2) pela razão de enchimento com os suportes ($V_{suporte}/V_{reator} = 0,40$). O valor obtido para $A_{total_biofilme}$ é, portanto, de 1,0 (para o MBBR₁ e MBBR₂) e 1,4 m^2 (para o SBBR).

3.3. Resultados

3.3.1. Fase de partida: desenvolvimento do biofilme

No início dos regimes experimentais, um período destinado à formação do biofilme (designado por período de partida) foi aplicado aos três reatores de leito móvel com biofilme. No MBBR₁, mantido em condições autotróficas, foi necessário um período de 2 meses para que um biofilme estável e substancialmente fino fosse estabelecido no material suporte. Com a estratégia de alimentação adotada no MBBR₂, no qual uma baixa carga orgânica (1,93 gDQO/($m^2 \cdot d$)) foi aplicada para favorecer o crescimento de micro-organismos heterotróficos, um biofilme precursor e fino (similar ao observado no MBBR₁) foi desenvolvido em poucos dias e um biofilme relativamente espesso (comparado ao do MBBR₁) e maduro foi obtido em um período de 1 mês. No SBBR, aplicou-se a mesma estratégia de alimentação utilizada no MBBR₂, sendo também observada a formação de um biofilme fino em poucos dias e de um biofilme relativamente espesso em apenas 20 dias.

Por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se a distribuição do biofilme nos materiais suporte no final de alguns regimes operacionais dos reatores. No reator mantido em condições autotróficas (MBBR₁), uma pequena mudança foi observada na morfologia do filme microbiano ao longo do tempo. A estrutura do biofilme no MBBR₁ durante o regime 3 (Figura 3.3a) é menos homogênea em comparação com aquela observada no regime 5 (Figura 3.3b), embora nesse último regime maiores agrupamentos de biomassa foram observados na matriz exopolimérica. A concentração de biomassa no reator autotrófico (mostrada no eixo-x da Figura 3.3) foi

muito menor em comparação com a dos outros sistemas (MBBR₂ e SBBR), variando de 0,4 gSSV/L (regime 1) a 0,7 gSSV/L (regime 5). A taxa específica de desprendimento do biofilme também foi bastante inferior àquelas observadas no MBBR₂ e SBBR, ficando em torno de 0,015 g/(m²·d) durante todo o período experimental.

A redução gradual da DQO afluente ao longo dos regimes de operação do MBBR₂ ocasionou uma redução significativa da espessura do biofilme. A taxa específica de desprendimento aumentou gradualmente ao longo dos regimes 6 – 8 de 0,042 a 0,110 g/(m²·d), respectivamente. Do regime 8 ao 9, o valor desse parâmetro diminuiu para 0,068 g/(m²·d). Nesse meio tempo, a concentração de biomassa gradualmente diminuiu de 2,0 g SSV/L (regime 6) a 1,0 g SSV/L (regime 9). Micrografias de MEV mostraram que a estrutura da biomassa no suporte variou significativamente quando a DQO afluente foi reduzida no MBBR₂ (Figura 3.3c,d). No regime 6 (Figura 3.3c), quando a maior carga orgânica foi aplicada, a biomassa estava distribuída uniformemente no meio suporte. Em contrapartida, quando a DQO afluente foi reduzida pela metade no regime 7 (Figura 3.3d), observou-se que algumas partes do material suporte plástico não estavam cobertas de biomassa. O filme microbiano estava mais concentrado em determinadas regiões do suporte, nas quais densos aglomerados microbianos foram observados.

Uma tendência similar àquela ocorrida no MBBR₂ foi observada no SBBR, sistema no qual a biomassa estava distribuída de forma mais homogênea no meio suporte durante o regime 11 (Figura 3.3e), período em que a maior carga orgânica foi aplicada ao reator (1,54 gDQO/(m²·d)). No regime 12, quando a DQO afluente foi reduzida pela metade, observou-se que a biomassa não estava aderida a algumas regiões do material suporte, embora densos agrupamentos microbianos estivessem presentes (Figura 3.3f). As menores concentrações de biomassa aderidas aos suportes plásticos foram observadas nos regimes 13 – 15, quando o material orgânico do meio sintético alimentado ao reator foi integralmente removido, prevalecendo somente condições autotróficas. A taxa específica de desprendimento do biofilme aumentou ao longo dos regimes 11 – 13 de 0,050 para 0,094 g/(m²·d). Esse aumento foi acompanhado pela redução da concentração de biomassa de 2,5 gSSV/L (regime 11) para 1,8 gSSV/L (regime 13), fato também evidenciado por meio de MEV. Para os regimes 13 – 15, durante os quais o reator foi mantido em condições autotróficas, a taxa de desprendimento foi bastante reduzida e permaneceu praticamente constante em 0,025 g/(m²·d). Esse resultado, em particular, sugeriu que a maior parte da camada

heterotrófica teria se desprendido do biofilme. A concentração de biomassa durante esse período levemente decresceu de 1,8 a 1,4 gSSV/L.

A Figura 3.4 apresenta imagens da biomassa retirada dos suportes de todos os sistemas ao longo do seu primeiro regime de operação. O procedimento de retirada da biomassa foi descrito no item Materiais e Métodos. Todas as imagens foram obtidas por meio de microscopia óptica de contraste interferencial. A microfauna foi bastante diversificada. Pode-se observar a presença de protozoários fixos ou pedunculados (Figura 3.4a e 3.4c), rotíferos e tecamebas (Figura 3.4b).

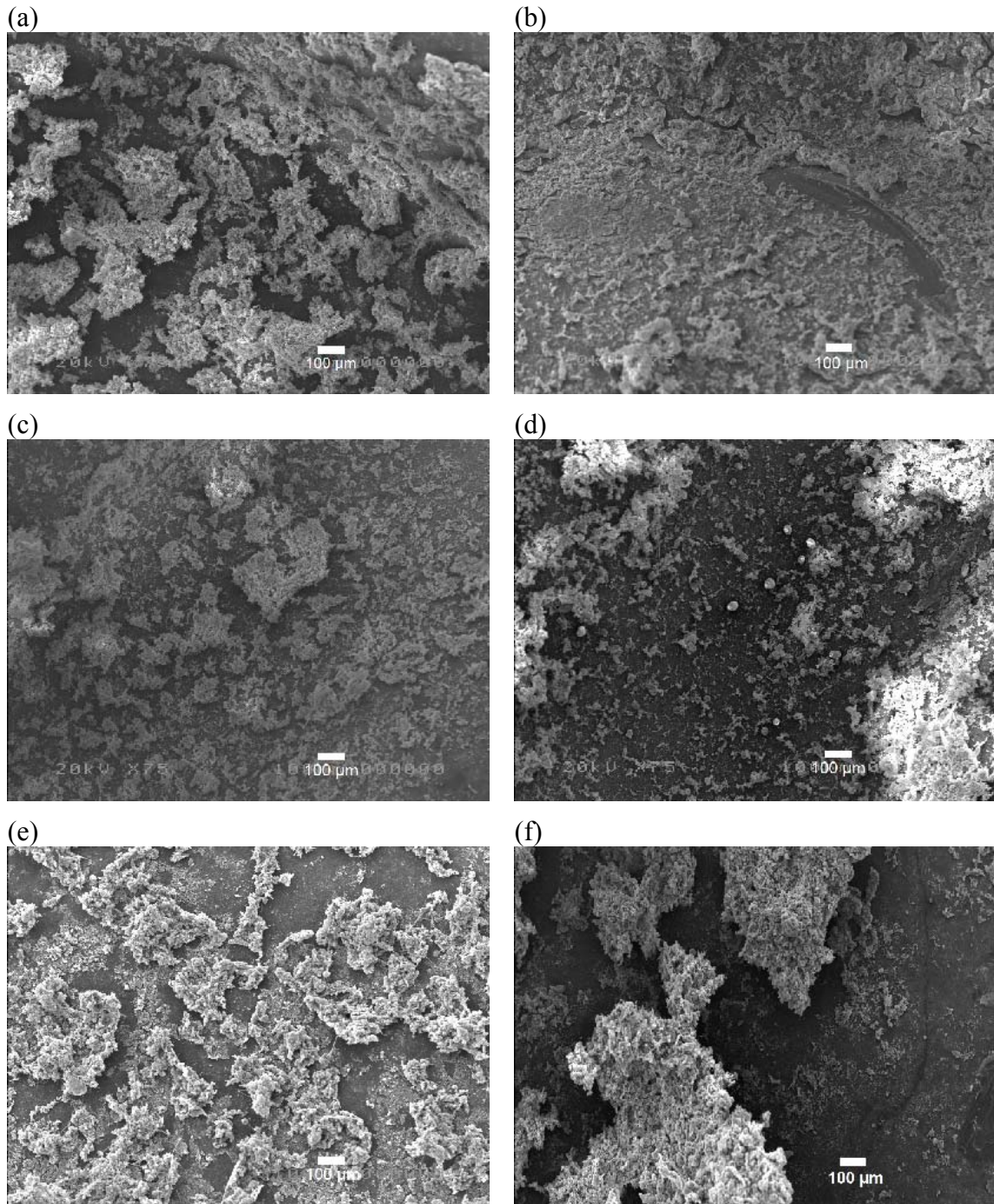


Figura 3.3: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme aderido ao material suporte no final de diferentes regimes operacionais dos reatores de leito móvel com biofilme: (a) regime 3 e (b) regime 5 do MBBR₁; (c) regime 6 e (d) regime 7 do MBBR₂; e (e) regime 11 e (f) regime 12 do SBBR.

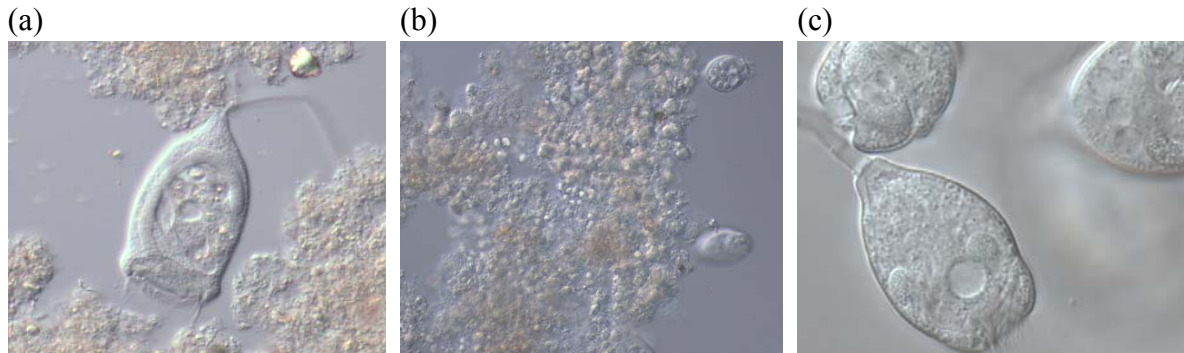


Figura 3.4: Microfotografias da biomassa desprendida dos suportes do (a) MBBR₁, aumento de 400×; (b) MBBR₂, aumento de 400×; (c) SBBR, aumento de 1000×.

3.3.2. Polissacarídeos e proteínas do biofilme

A determinação da concentração de biomassa em reatores de leito móvel com biofilme pode vir a ser relativamente complicada. A remoção integral do biofilme da parte interna dos materiais suporte é, em geral, uma tarefa difícil de ser realizada. Para superar as dificuldades encontradas durante a quantificação da biomassa por meio de métodos gravimétricos, as concentrações de polissacarídeos totais e proteína total foram determinadas no intuito de se obter informações adicionais a respeito da dinâmica da concentração de biomassa.

A relação entre concentração de biomassa (expressa como SSV) e concentrações de polissacarídeos e de proteínas para todos os reatores está mostrada na Figura 3.5. Em geral, as concentrações de polissacarídeos/proteína foram proporcionais à concentração de biomassa.

No MBBR₁ (Figura 3.6a), a concentração de polissacarídeos aumentou levemente quando a carga nitrogenada foi aumentada de 0,2 gN/(m²·d) (regime 1) para 1 gN/(m²·d) (regime 5). A concentração de proteínas permaneceu praticamente constante ao longo dos três primeiros regimes de operação, sendo observado um aumento da mesma durante a transição entre o regime 3 e 4.

A redução gradual da DQO afluente de 400 mg/L (regime 6) para 0 (regime 9) no MBBR₂ foi acompanhada por um decréscimo da concentração de proteína (Figura 3.6b). A mesma tendência é válida para a concentração de polissacarídeos, embora nenhuma variação tenha sido observada do regime 8 ao 9.

No SBBR, as concentrações de polissacarídeos e proteína aumentaram do regime 10 ao 11 quando as cargas orgânica e nitrogenada foram dobradas em virtude da

redução do tempo de ciclo de 48 para 24 h (Figura 3.6c). Subsequentemente, ambas as concentrações de polissacarídeos e proteínas decresceram significativamente quando a DQO afluente foi gradativamente diminuída do regime 11 ao 13. Uma leve redução também foi observada durante o longo período no qual o reator foi mantido em condições autotróficas (regimes 13 – 15). A razão polissacarídeos/proteína não apresentou modificações significativas entre os diferentes reatores, variando de 0,24 a 0,36.

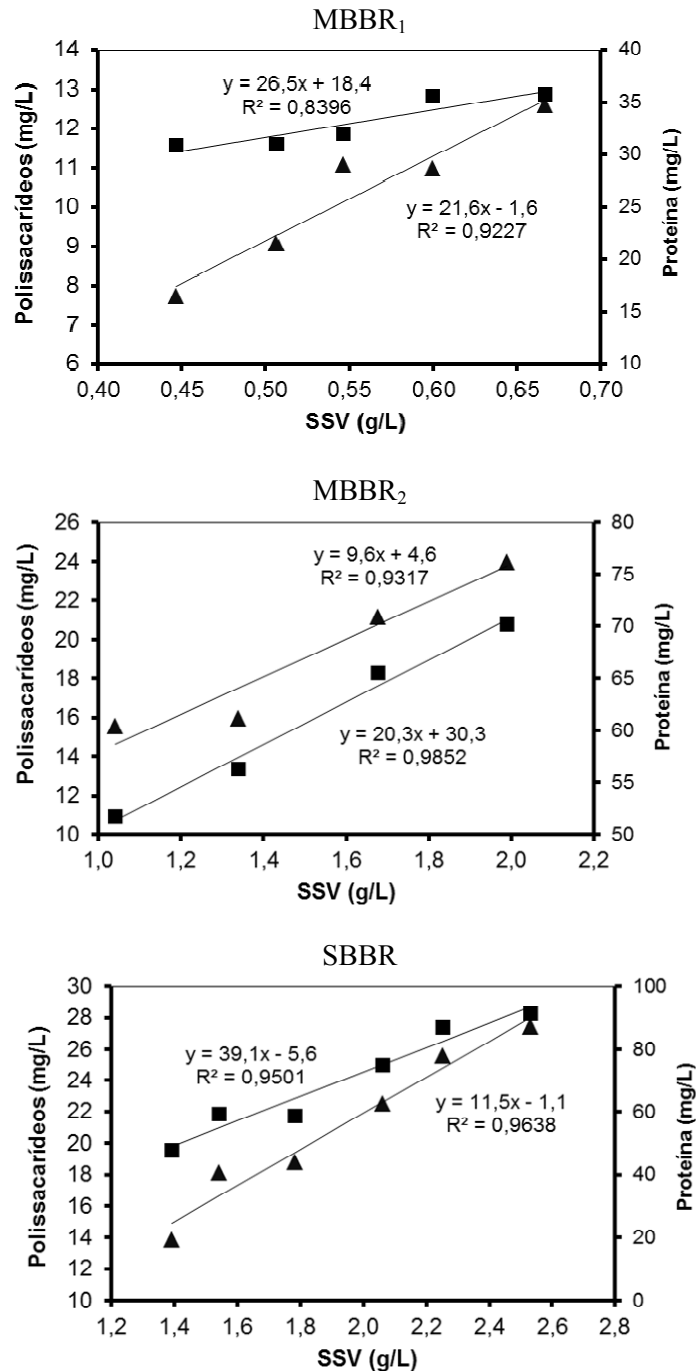


Figura 3.5: Relação entre concentração de biomassa (expressa em SSV) e concentrações de polissacarídeos (▲) e proteína (■) para os sistemas de leito móvel com biofilme.

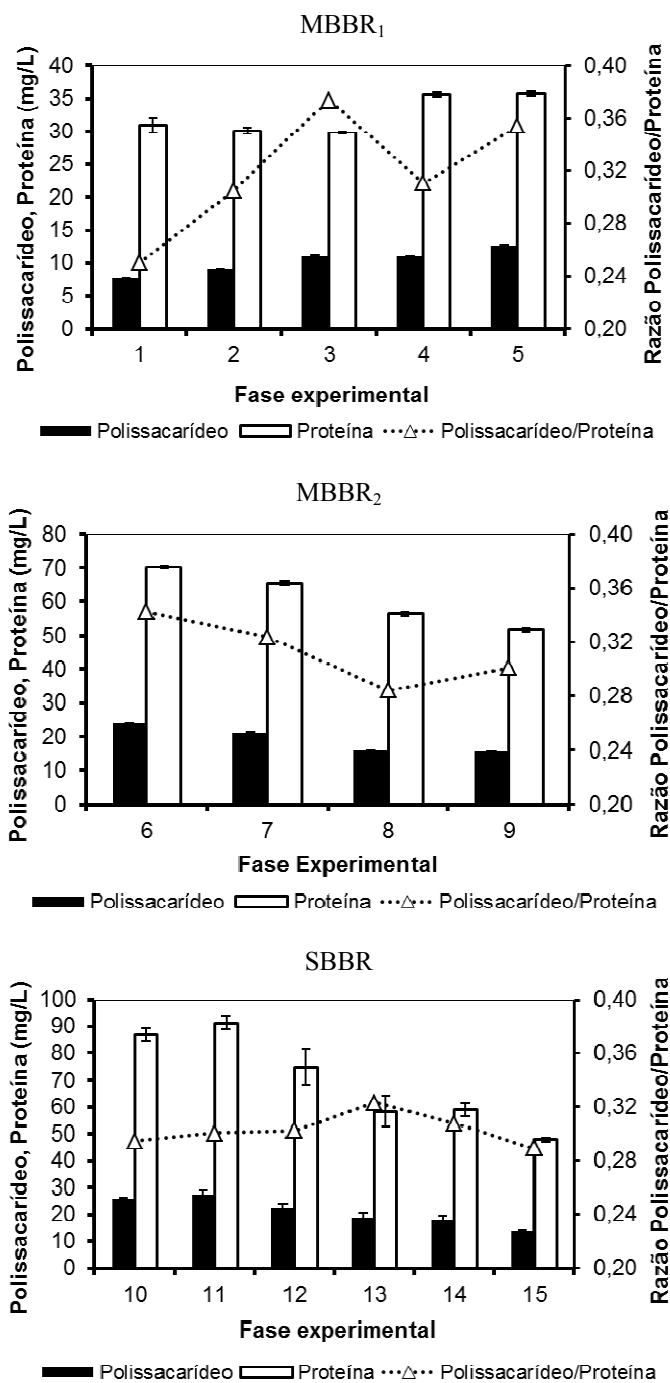


Figura 3.6: Concentrações de polissacarídeos e proteínas do biofilme de todos os sistemas de leito móvel com biofilme.

3.3.3. Desempenho da nitrificação nos reatores de leito móvel com biofilme

Além da investigação do desenvolvimento do biofilme em diferentes condições de operação, o desempenho do processo nitrificante foi avaliado em todos os sistemas. No reator autotrófico (MBBR₁), a eficiência de remoção de amônio aumentou gradualmente durante o seu período de partida, no qual o crescimento do biofilme

estava ocorrendo. Foram necessários 70 dias desde o início do regime 1 para que fosse atingida oxidação completa de amônio. Em geral, uma leve instabilidade na operação do reator, exemplificada pela presença de amônio residual no efluente, foi observada durante a transição dos regimes, durante os quais ocorreu o aumento gradual da carga superficial de amônio de 0,2 a 1,0 gN/(m²·d). No entanto, a instabilidade operacional foi suprimida com a subsequente adaptação da biomassa a cada nova condição de operação, fazendo com que a eficiência de remoção de amônio fosse mantida próxima de 100% na maior parte do tempo de operação (Figura 3.7a). Nitrato foi formado em proporções similares àquela indicada pela estequiometria da oxidação de amônio, e as concentrações de nitrito foram bastante reduzidas (< 1 mg NO₂⁻-N/L).

No MBBR₂, a eficiência de remoção de amônio durante o período de partida no regime 6 (Figura 3.7b) foi baixa. Entretanto, conversão completa de amônio foi obtida no final desse regime experimental, embora durante esse período a DQO do meio sintético tenha sido a maior (400 mg/L). Subsequentemente, com a gradual redução da DQO ocorrida do regime 7 ao 9, praticamente não foi detectado amônio no efluente. A recuperação de nitrogênio no *bulk*, indicando a quantidade de amônio nitrificado e encontrado na forma final de nitrato, foi menor no regime 6 (em torno de 77%), alcançando em torno de 85% em condições autotróficas (regime 9). A concentração máxima de nitrito obtida durante todo o período experimental foi de 2 mgNO₂⁻-N/L.

No SBBR, 25 dias foram necessários para que completa remoção de amônio fosse obtida a partir do início do período de partida destinado ao desenvolvimento do biofilme. Subsequentemente, a eficiência de remoção de amônio foi mantida acima de 95% até o fim do regime 13 (Figura 3.7c). Quando a concentração de amônio afluente foi aumentada de 300 mgNH₄⁺-N/L para em torno de 600 mgNH₄⁺-N/L no regime 14, a eficiência de remoção de amônio diminuiu para 60%. No entanto, a adaptação da biomassa a essas novas condições operacionais permitiu que completa remoção de amônio fosse restabelecida. Do início do regime 10 até o fim do regime 13, a concentração de nitrito no efluente foi geralmente menor que 1 mgNO₂⁻-N/L. No início do regime 14, a concentração de nitrito atingiu 5 mgNO₂⁻-N/L, resultado que refletiu uma instabilidade do sistema nitrificante. Entretanto, em poucos dias, a concentração desse intermediário da nitrificação foi reduzida para valores menores que 1 mgNO₂⁻-N/L. Quando a concentração de amônio afluente foi aumentada de 550 para 1200 mgNH₄⁺-N/L no regime 15, repercutindo no aumento da carga nitrogenada de 2 a 4 gN/(m²·d), o sistema foi severamente afetado. Nesse período, a máxima eficiência de

remoção de amônio variou entre 30% e 40% e o principal produto da nitrificação passou a ser o nitrito, sendo registrado um acúmulo de até 140 mgNO₂⁻-N/L. A concentração de nitrato efluente foi de apenas 40 mgNO₃⁻-N/L. A duração do regime 15 foi de apenas 1 mês. Devido à alta instabilidade de operação durante esse período, a operação do reator foi interrompida. Durante toda a operação do SBBR, a recuperação de nitrogênio no *bulk* foi de aproximadamente 70% para os regimes 10, 11, 12, 14 e 15 e 80% para o regime 13.

Realizou-se a quantificação dos compostos nitrogenados ao longo do ciclo operacional no final dos regimes 11 – 15 no SBBR durante a operação em estado pseudo-estacionário, atingido quando as principais conversões biológicas estavam estáveis e não variavam ao longo do tempo. A taxa específica de consumo de amônio (q_{NH_4}) variou de 9 mgNH₄⁺-N/(gSSV·h) (regime 15) a 17 mgNH₄⁺-N/(gSSV·h) (regime 13). Nos regimes 12 e 14, q_{NH_4} foi de 14 e 13 mgNH₄⁺-N/(gSSV·h), respectivamente. No regime 11, no qual a maior carga orgânica foi aplicada, a q_{NH_4} foi de 10 mgNH₄⁺-N/(gSSV·h).

Como já mencionado durante a descrição dos resultados obtidos ao longo da operação do SBBR, nitrito praticamente não foi detectado no final do ciclo nos regimes 10 – 14. Apesar disso, observou-se um acúmulo do mesmo ao longo dos ciclos operacionais em todos os regimes de operação. Nos regimes 11 e 12, a taxa de consumo de amônio não foi influenciada pelo acúmulo de nitrito, o qual atingiu a concentração máxima de 50 mgNO₂⁻-N/L. Entretanto, durante a operação dos regimes 13 e 14, a taxa de oxidação de amônio diminuiu consideravelmente durante o ciclo (Figura 3.8c,d), quando as concentrações de nitrito excederam 50 mgNO₂⁻-N/L. A oxidação de nitrito também pareceu ser influenciada pelas altas concentrações desse intermediário, especialmente nos regimes 14 e 15, quando foi observado o seu maior acúmulo ao longo do ciclo. Durante o regime 15, em particular, a concentração de nitrito atingiu a marca de 150 mgNO₂⁻-N/L no final do ciclo, e somente uma parcela do mesmo foi posteriormente oxidado a nitrato. Nesse regime, a concentração de nitrito no início do ciclo, resultante da concentração remanescente do ciclo anterior e diluída com a alimentação, chegou a 30 mgNO₂⁻-N/L.

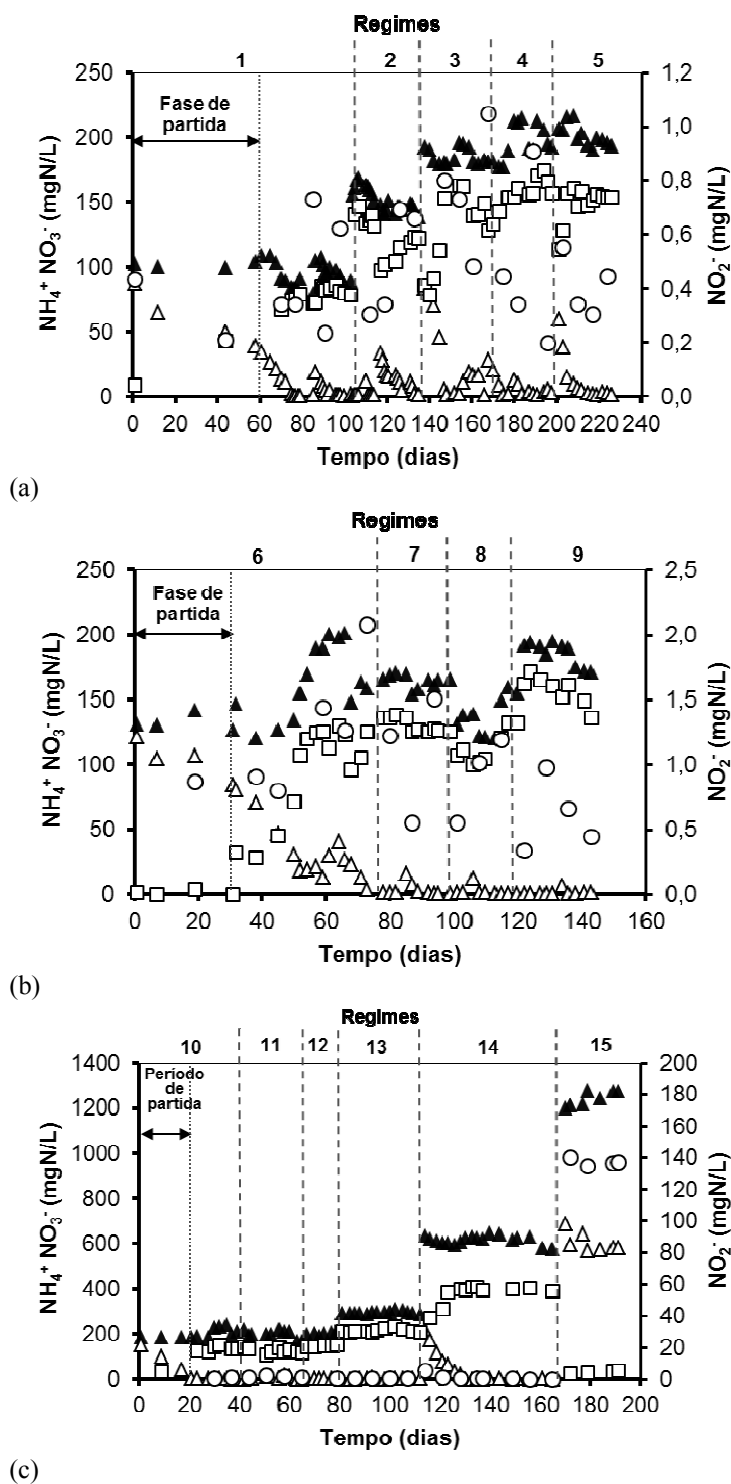


Figura 3.7: Concentração de amônio afluente (\blacktriangle) e concentração de amônio (\triangle), nitrato (\square) e nitrito (\circ) efluente do MBBR₁ (a), MBBR₂ (b) and SBBR (c). A fase de partida (*start-up*) se refere ao período destinado à formação do biofilme.

A concentração de oxigênio dissolvido sofreu uma queda significativa imediatamente após o período de alimentação em todos os regimes operacionais (Figuras 3.8a-e). De forma interessante, no regime 15, durante o qual o reator foi

alimentado com a maior concentração de amônio ($1200 \text{ mg NH}_4^+\text{-N/L}$), a redução da concentração de oxigênio dissolvido foi menor em comparação com as outras fases. Esse fato sugeriu um possível efeito inibitório de altas concentrações de nitrito (remanescentes do ciclo anterior) ou de amônia livre sobre os micro-organismos nitrificantes. Em geral, as concentrações de oxigênio dissolvido gradualmente aumentaram ao longo do ciclo, enquanto o amônio estava sendo nitrificado.

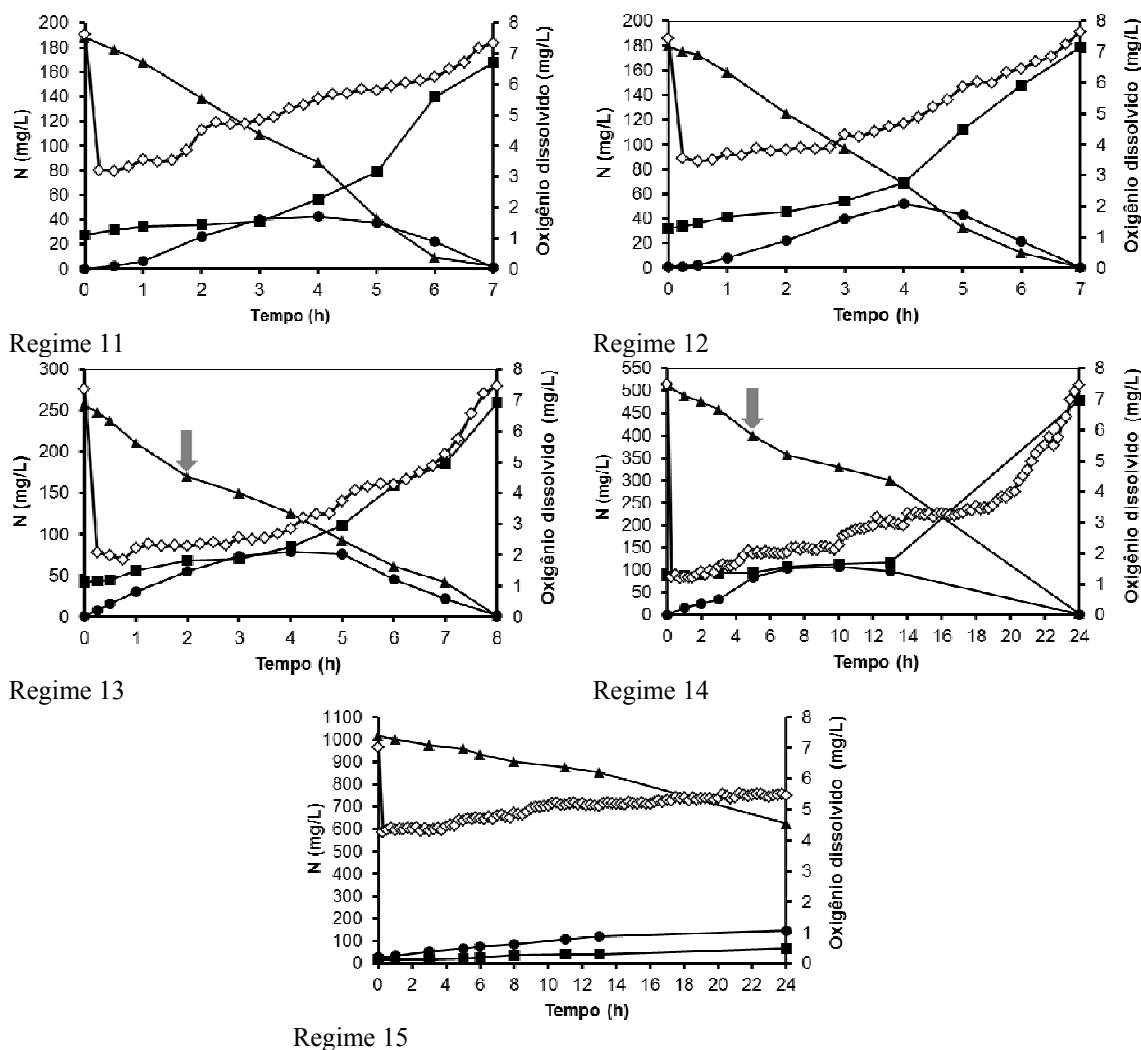


Figura 3.8: Perfis de concentração de amônio (▲), nitrato (■), nitrito (●) e oxigênio dissolvido (◇) obtidos ao longo dos ciclos de operação durante operação em estado estacionário nos regimes 11-15. As concentrações de amônio, nitrato e nitrito no início do ciclo (tempo 0) foram medidas após a alimentação, no qual o afluente foi diluído com o líquido remanescente do ciclo anterior (percentual de troca de volume de 85%). Uma seta indica o momento a partir do qual a taxa de oxidação de amônio diminuiu ao longo do ciclo, quando as concentrações de nitrito excederam $50 \text{ mgNO}_2^-\text{-N/L}$.

3.3.4. Populações de bactérias oxidadoras de amônio (AOB) e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) avaliadas por meio de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Para observar o desenvolvimento das bactérias nitrificantes ao longo das fases experimentais em todos os reatores, foi utilizada uma combinação de sondas oligonucleotídicas específicas para AOB e NOB, mostradas na Tabela 3.4. Imagens obtidas por meio da técnica de FISH das amostras coletadas nos três reatores estão ilustradas na Figura 3.9.

Um aumento na proporção de AOB e NOB entre o total de bactérias foi observado ao longo da operação do MBBR₁, o qual foi submetido ao aumento gradual da carga nitrogenada. Uma vez que a operação desse reator já tinha sido iniciada em condições autotróficas, as populações de AOB e NOB já representavam uma fração considerável de toda a população microbiana após o período de partida no regime 1, embora outras bactérias não nitrificantes estivessem presentes no biofilme (Figura 3.9a). Apesar disso, a operação sem adição de carbono orgânico externo por um longo período e o aumento da carga nitrogenada contribuíram para o enriquecimento do biofilme em nitrificantes, os quais dominaram a população microbiana no regime 5 (Figura 3.9b).

No MBBR₂, a quantidade de bactérias nitrificantes na fase partida ao longo do regime 6 foi bastante reduzida. Entretanto, o número desses organismos autotróficos gradualmente aumentou nesse sistema ao longo da operação do regime 6, correspondendo a uma fração significativa da comunidade bacteriana total no final do respectivo regime em comparação com o início do mesmo (Figura 3.9c). Concomitantemente, a eficiência de nitrificação aumentou de forma significativa, conforme mostra a Figura 3.7b. A diminuição gradual da DQO afluente de 400 m/L (regime 6) para 0 (regime 9) também contribuiu para o enriquecimento do biofilme em nitrificantes (Figura 3.9d). Entretanto, diversas outras bactérias além das nitrificantes ainda foram detectadas no final do regime experimental terminal desse reator, embora todo o carbono orgânico tivesse sido removido do meio sintético afluente.

Seguindo a mesma tendência observada no MBBR₂, os micro-organismos nitrificantes começaram a dominar a comunidade microbiana do biofilme do SBBR quando a carga orgânica afluente foi gradualmente reduzida. Como mostrado na Figura 3.9f, um biofilme altamente enriquecido com nitrificantes foi obtido no regime 14, período no qual a concentração de amônio afluente foi em torno de 500 mgNH₄⁺-N/L e o reator já havia sido operado em condições autotróficas por mais de 4 meses. O

biofilme rico em organismos nitrificantes continuou a prosperar no regime 15, embora nesse período, em particular, essas bactérias foram possivelmente inibidas, conforme será discutido posteriormente.

As bactérias não nitrificantes presentes na comunidade bacteriana dos sistemas de leito móvel com biofilme, mesmo quando o carbono orgânico foi removido integralmente do meio de alimentação, são provavelmente bactérias heterotróficas crescendo às custas de produtos microbianos solúveis, liberados por organismos autotróficos. Mesmo quando a DQO afluyente é bastante reduzida (5 – 10 mg/L), a biomassa heterotrófica pode se desenvolver em um reator cujo afluyente não contenha material orgânico (MOUSSA *et al.*, 2005). Impurezas orgânicas presentes no meio de alimentação e o próprio ar usado para aeração podem fornecer tal DQO (MOUSSA *et al.*, 2005).

Em adição à investigação das populações de AOB e NOB no biofilme dos reatores, a presença de bactérias anammox também foi avaliada. De forma interessante, algumas células Anammox foram detectadas nas amostras do biofilme do SBBR, coletadas nos regimes 13 – 15 (Figura 3.10), período no qual altas concentrações de amônio e nitrito estiveram simultaneamente presentes durante o ciclo operacional. A quantidade de bactérias Anammox aumentou nos últimos regimes de operação do SBBR (regime 14 e 15).

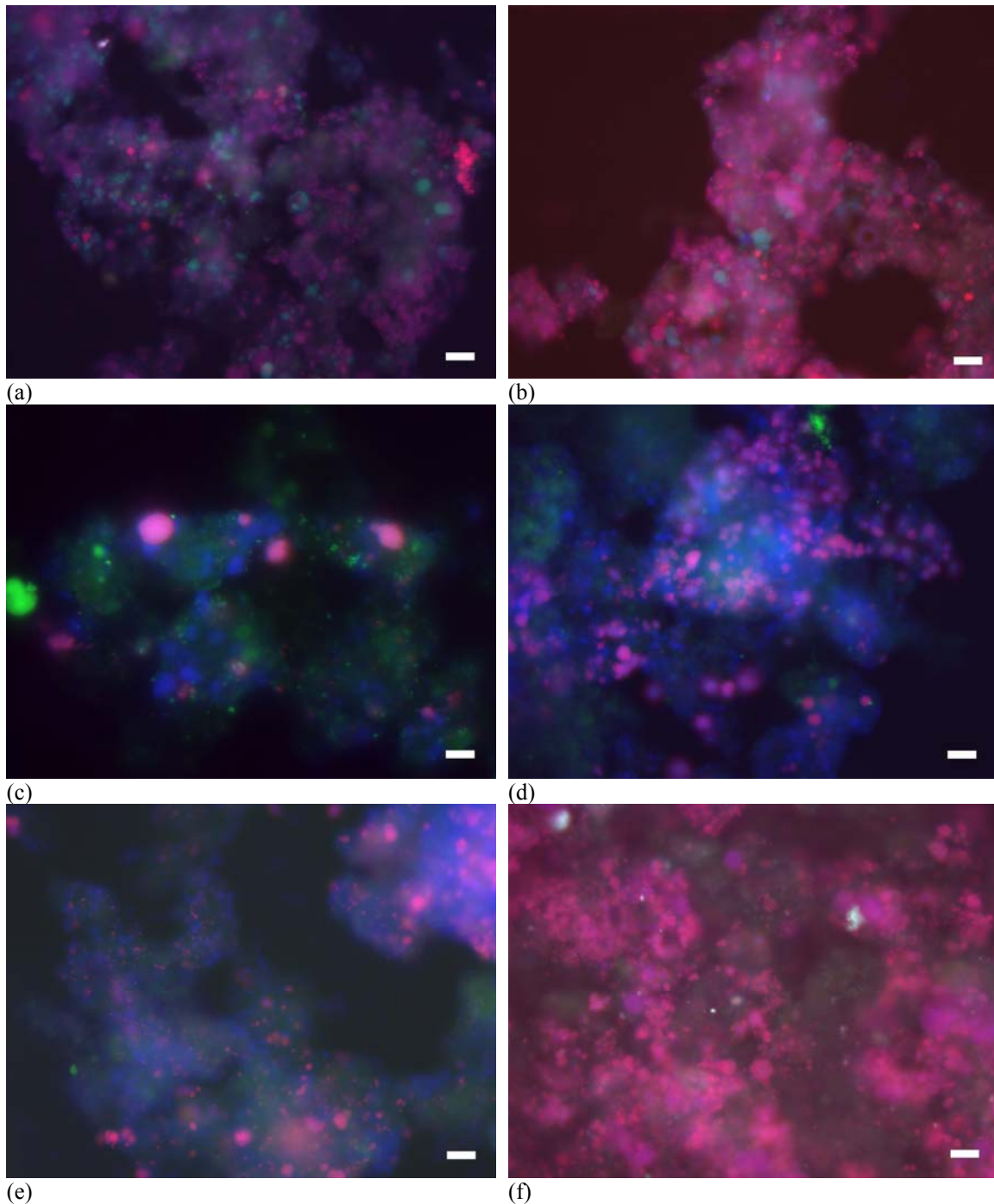


Figura 3.9: Populações de AOB (em vermelho) e NOB (em verde) na comunidade bacteriana total (em azul): a) MBBR₁, regime 1; b) MBBR₁, regime 5; c) MBBR₂, regime 6; d) MBBR₂, regime 9; e) SBBR, regime 11; f) SBBR, regime 14. As AOB aparecem na cor violeta devido à superposição das sondas AOBmix e EUBmix, enquanto as NOB aparecem na cor verde claro devido à superposição das sondas NOBmix e EUBmix. A barra de escala representa 20 μm .

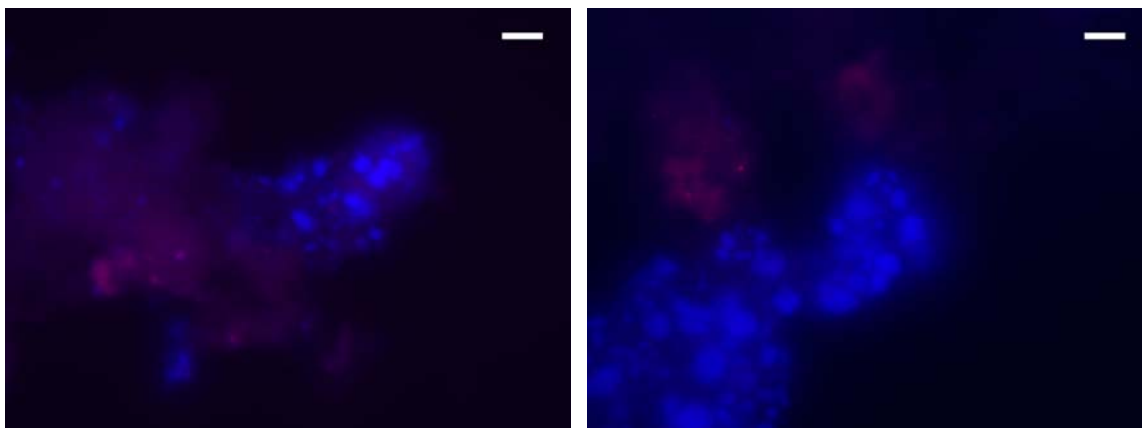


Figura 3.10: Bactérias Anammox (em vermelho) detectadas entre toda a comunidade microbiana (em azul): (a) regime 14 e (b) regime 15. Testes preliminares mostraram que as duas sondas utilizadas para detectar bactérias anammox (AMX 368 e AMX 820) hibridizaram com as mesmas células. Sendo assim, somente uma (AMX 368) foi utilizada para detectar esses organismos específicos. As bactérias anammox aparecem na cor violeta devido à superposição das sondas AMX 368 e EUBmix. A barra de escala indica 10 μm .

3.4. Discussão

3.4.1. Influência da estratégia de alimentação na formação do biofilme

Observou-se que o tempo requerido para a formação de biofilmes nitrificantes estáveis é reduzido quando um período de partida heterotrófico é aplicado, no qual alguns compostos orgânicos são alimentados aos reatores de modo a favorecer o desenvolvimento de organismos heterotróficos. Uma camada fina de biomassa aderida é formada em poucos dias nos sistemas alimentados com matéria orgânica (MBBR₂ e SBBR), a qual consiste em um precursor do biofilme maduro.

A razão para a formação mais rápida do biofilme nos reatores alimentados com material orgânico está relacionada com o rápido crescimento das bactérias heterotróficas. Como consequência da maior produção de biomassa, ocorre o aumento da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). As EPS formam uma complexa matriz de polímeros, incluindo polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, fosfolípidios, ácidos nucleicos e ácidos húmicos (MCSWAIN *et al.*, 2005). Nessa matriz, estão presentes bactérias e outros materiais particulados (GROTHENHUIS *et al.*, 1991). Em processos com biofilme, as EPS, especialmente os polissacarídeos, agem como uma matriz fixadora, favorecendo a adesão de biomassa a superfícies e a materiais suportes (CAMMAROTA e SANT'ANNA, 1998). Essa função específica das EPS favorece o processo de adesão inicial das bactérias por adsorção na superfície do

suporte e, subsequentemente, facilita o crescimento de micro-colônias que cobrirão a região do suporte disponível para deposição do biofilme (TIJHUIS *et al.*, 1994b). Embora não tenha sido realizada especificamente a quantificação dos exopolímeros produzidos pelos micro-organismos, foram determinadas as concentrações de polissacarídeos totais e proteína total no biofilme para se obter uma ideia do comportamento da biomassa e produção de exopolímeros pela biomassa em diferentes regimes de operação do mesmo reator e em diferentes sistemas.

Observou-se que as concentrações de proteína total no biofilme do MBBR₂ e SBBR foram muito maiores do que aquelas obtidas no biofilme do reator autotrófico MBBR₁. Esse resultado vem ao encontro das medições de biomassa por métodos convencionais, as quais mostraram que maiores concentrações de SSV foram obtidas nos sistemas alimentados com matéria orgânica. Quanto maior a carga orgânica aplicada, maior a espessura do biofilme nas partículas, fato também reportado por TIJHUIS *et al.* (1994b).

Maior quantidade de biomassa esteve aderida aos suportes do SBBR em comparação com o MBBR₂, mesmo quando esses dois sistemas foram submetidos a cargas orgânicas comparáveis. Esse resultado pode estar relacionado aos diferentes modos de operação dos dois reatores. O regime em bateladas sequenciais com alimentação na forma de pulso parece favorecer o acúmulo de biomassa no material suporte. O fato de que razão polissacarídeos/proteína tenha sido praticamente a mesma e invariável em todos os reatores significa que a quantidade de EPS (expressa como polissacarídeos) produzidas por certa quantidade de células (expressa como proteína) foi, grosso modo, a mesma para todos os reatores, a despeito das diferentes populações microbianas dominantes em cada sistema.

Embora não tenha sido perfeita, observou-se que existe uma relação razoável entre a concentração de biomassa (expressa como SSV) e as concentrações de polissacarídeos e proteína (Figura 3.5). As concentrações desses dois parâmetros fornecem uma indicação qualitativa preliminar do comportamento da biomassa em diferentes condições experimentais. Por meio de medições da biomassa e monitoramento simultâneo das concentrações de polissacarídeos e proteínas, uma curva de calibração foi obtida, a qual pode auxiliar a estimar rapidamente a concentração de biomassa em sistemas de leito móvel com biofilme. Essa última análise, conforme já mencionado, pode vir a ser complicada devido às dificuldades encontradas durante a remoção da biomassa dos materiais suportes para determinação dos SSV.

O aumento da taxa específica de desprendimento do biofilme e a redução da concentração de biomassa com o decréscimo da DQO afluente do regime 6 ao 8 no MBBR₂ e do regime 11 ao 13 no SBBR estão provavelmente relacionados com a limitação dos organismos heterotróficos. Por conseguinte, é factível a ocorrência de decaimento celular e desprendimento de organismos heterotróficos, os quais foram arrastados do sistema. Dessa forma, a camada heterotrófica do biofilme foi gradualmente reduzida, levando a uma considerável diminuição da concentração total de biomassa e conseqüentemente a uma menor concentração de polissacarídeos e proteínas no biofilme aderido aos suportes.

Esses resultados confirmam as observações feitas por MEV, as quais também mostraram um decréscimo da biomassa aderida ao material suporte quando a DQO afluente foi reduzida nos reatores heterotróficos (MBBR₂ e SBBR). Após o desprendimento da camada heterotrófica, o biofilme fino restante apresentava alta proporção de organismos nitrificantes, conforme evidenciado pela análise FISH. A estratégia operacional na qual a DQO afluente foi gradualmente reduzida até a obtenção de condições autotróficas mostrou ser um bom método para a obtenção de biofilmes dominados por bactérias nitrificantes em menor tempo de operação.

3.4.2. Efeito da composição do meio de alimentação no processo de nitrificação

A estratégia de alimentação na qual alguns compostos orgânicos foram alimentados ao MBBR₂ e SBBR, diminuindo o tempo necessário para formação do biofilme nesses sistemas, não prejudicou o desempenho da nitrificação. Na verdade, a aplicação de um período de partida heterotrófico favoreceu o acúmulo de bactérias nitrificantes no biofilme, fato evidenciado pelo menor tempo necessário para a obtenção de completa remoção de amônio quando comparado com o MBBR₁ (operado em condições autotróficas e inoculado com lodo enriquecido com nitrificantes), mesmo quando as concentrações de amônio afluentes foram similares.

A menor eficiência de remoção de amônio observada no MBBR₂ no início do regime 6 está relacionado fato de que a fração de organismos nitrificantes era ainda pequena naquele período. À medida que o biofilme foi gradualmente colonizado por bactérias nitrificantes, obteve-se remoção completa de amônio, inclusive no próprio regime 6, quando o reator foi submetido à maior carga orgânica.

No caso do SBBR, inoculando-se o reator com biomassa desprendida do MBBR₁ e MBBR₂, a qual já apresentava quantidade significativa de nitrificantes, foi possível se atingir remoção completa de amônio em apenas 20 dias. Ademais, a redução gradual da DQO afluente do regime 11 ao 13 foi acompanhada pelo aumento da taxa específica de consumo de amônio, resultado primariamente ligado ao enriquecimento do biofilme em nitrificantes.

Além de investigar o efeito das diferentes razões DQO/N afluente no desempenho da nitrificação no SBBR, primou-se pelo estudo da influência da carga de amônio sobre esse processo. Observou-se que a taxa de oxidação de amônio foi menor no regime 15, período no qual o biofilme esteve completamente dominado por nitrificantes, em comparação com o regime 11, quando o reator foi submetido à maior carga orgânica e as bactérias nitrificantes ainda estavam colonizando o biofilme. Esse resultado trouxe à tona a hipótese de que estava ocorrendo inibição por substrato no SBBR no regime terminal desse reator. Amônia livre e ácido nitroso, cujas concentrações estão diretamente relacionadas, respectivamente, à concentração de amônio e nitrito, são conhecidos por causarem inibição da atividade das bactérias nitrificantes (ANTHONISEN *et al.*, 1976).

A concentração de ácido nitroso calculada para a maior concentração de nitrito observada nos regimes 13 – 15 foi de 0,02 (regime 13), 0,025 (regime 14) e 0,034 mg N/L (regime 15). De acordo com ANTHONISEN *et al.* (1976), a concentração limite de ácido nitroso a partir da qual ambas as AOB e NOB são inibidas situa-se na faixa entre 0,22 e 2,8 mgN/L. Sendo assim, as concentrações de ácido nitroso calculadas nesse estudo são menores que aquelas capazes de provocar inibição, reportadas por ANTHONISEN *et al.* (1976). Apesar disso, outros estudos tais como o realizado por VADIVELU *et al.* (2006), mencionam que as AOB e NOB podem ser inibidas por concentrações ainda menores de FNA. Nesse contexto, o efeito inibitório de ácido nitroso sobre as bactérias nitrificantes não pode ser descartado, uma vez que a taxa de consumo de amônio claramente diminuiu de forma considerável quando ocorreu acúmulo de nitrito ao longo do ciclo de operação do SBBR.

Quanto maior a concentração de amônio no início do ciclo do SBBR, maior o acúmulo de nitrito observado. Esse resultado pode estar associado a uma possível inibição das NOB por amônia livre. A concentração de amônia livre capaz de ocasionar inibição da atividade das NOB se encontra na faixa de 0,1 a 1,0 mgNH₃/L (ANTHONISEN *et al.*, 1976). As concentrações de amônia livre calculadas nesse

estudo foram de aproximadamente 5 mgNH₃-N/L (regime 13), 10 mgNH₃-N/L (regime 14) e 18 mgNH₃-N/L (regime 15), valores consideravelmente maiores do que aqueles capazes causar inibição, conforme reportado por ANTHONISEN *et al.* (1976). BAE *et al.* (2001) também reportaram que alto acúmulo de nitrito (NO₂⁻/NO_x⁻ de até 77%) ocorreu quando a concentração de amônia livre era de 4,7 mg/L.

A provável inibição das NOB por amônia livre e o conseqüente colapso da segunda etapa do processo de nitrificação (nitratação) são suportados pelos resultados obtidos durante a operação dos regimes 14 e 15. No regime 14, a maior parcela de amônio (em torno de 80%) nas primeiras 10 h de ciclo foi somente nitrificada até nitrito, enquanto nitrato foi formado somente em pequenas proporções. Mais de 80% do nitrato foi formado somente após 10 h de ciclo. No regime 15, no qual a carga de amônio foi equivalente a 4 gNH₄⁺-N/(m²·d), acúmulo de nitrito foi observado ao longo de todo o ciclo e nitrito foi, de fato, o principal produto da nitrificação. Conforme observado por PARK e BAE (2009), as NOB são mais suscetíveis à inibição por amônia livre ou ácido nitroso. SLAWOMIR *et al.* (2010), operando um sistema MBBR de duplo estágio, também observaram que o nitrito foi o principal produto da nitrificação quando foram aplicadas cargas de amônio similares àquelas aplicada nesse estudo (3,76 gNH₄⁺-N/m²·d).

Embora o biofilme tenha sido completamente dominado por bactérias nitrificantes no regime 15, a taxa de consumo de amônio nesse período foi menor em comparação com os regimes prévios de operação. No regime 15, em particular, a concentração de amônia livre alcançou 18 mgNH₃-N/L, valor que se encontra dentro da faixa reportada por ANTHONISEN *et al.* (1976) capaz de ocasionar inibição das AOB (10 – 150 mgNH₃/L). Ademais, a quantidade considerável de nitrito presente no início do ciclo (remanescente do ciclo imediatamente anterior) e seu gradual acúmulo ao longo do ciclo provavelmente causou um efeito adverso na capacidade de oxidação de amônio. Como apontado por PARK e BAE (2009), amônia livre é um inibidor primário no início de cada reação em batelada, enquanto que, posteriormente, o ácido nitroso é o agente inibidor predominante.

É importante realçar que o menor decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido observado imediatamente após a alimentação do reator no regime 15, quando comparado com aqueles observados nos regimes 13 e 14, sugere que um efeito inibitório ocorreu sobre as AOB e NOB nesse regime terminal, no qual as maiores concentrações de amônia livre e ácido nitroso foram observadas.

A detecção de bactérias Anammox no biofilme do SBBR nos regimes 13 – 15 foi realmente um resultado inesperado, tendo em vista que esse sistema foi operado com concentrações de oxigênio dissolvido relativamente elevadas (maiores que 1,5 mgO₂/L ou 20% em relação à saturação do ar a 24°C). O crescimento desses micro-organismos pode ter sido suportado pela presença simultânea de altas concentrações de amônio e nitrito, os quais correspondem a seus substratos (STROUS *et al.*, 1999b). Além disso, é provável que as bactérias Anammox estivessem situadas em regiões mais profundas do biofilme, onde a concentração de oxigênio dissolvido era muito menor do que aquela presente no *bulk*.

A recuperação de nitrogênio no *bulk* (obtida por meio do balanço de massa para o nitrogênio) nos regimes operacionais nos quais o meio de alimentação continha carbono orgânico (regimes 10 – 12) foi menor do que aquela observada no regime 13, mantido em condições autotróficas. Esse fato pode ser explicado por dois motivos: (1) os organismos heterotróficos de crescimento rápido assimilaram mais nitrogênio para o crescimento que os organismos autotróficos, resultando em menos amônio disponível para a nitrificação; ou (2) o carbono orgânico afluyente poderia ser usado como doador de elétrons por bactérias desnitrificantes, as quais reduziram o nitrito/nitrato a gás nitrogênio. Entretanto, a recuperação de nitrogênio no *bulk* nos regimes 14 e 15 (quando o meio de alimentação era desprovido de material orgânico) foi similar àquela observada quando compostos orgânicos foram fornecidos ao reator. Na verdade, esse resultado pode ser parcialmente relacionado com a presença de bactérias Anammox no SBBR, as quais também poderiam ter contribuído para a maior perda de nitrogênio do meio líquido. Além disso, o fato de que a recuperação de nitrogênio no *bulk* foi menor no SBBR em comparação com aquela observada nos sistemas alimentados continuamente pode ser atribuído à desnitrificação realizada à custa de polímeros armazenados intracelularmente, tal como polihidroxibutirato (PHB). Esses polímeros de reserva são formados por bactérias quando o sistema é operado em regime *feast-famine*, isto é, com e sem disponibilidade de substrato externo (Jiang *et al.*, 2011), tal como observado no SBBR.

3.5. Conclusões

Os resultados desse trabalho mostraram que a aplicação de um período de partida heterotrófico diminuiu o tempo necessário para o desenvolvimento de biofilmes

nitrificantes. As informações fornecidas por essa pesquisa são passíveis de utilização no segmento industrial, especialmente quando a nitrificação deve ser realizada em águas residuárias desprovidas ou com teores reduzidos de material orgânico.

Por meio da inoculação de um reator operado em bateladas sequenciais com biomassa desprendida de outros sistemas MBBR e alimentado na forma de pulso, é possível acelerar o processo de desenvolvimento do biofilme em relação a sistemas alimentados de forma contínua. Observou-se que as concentrações de polissacarídeos e proteínas são parâmetros úteis para se estimar a concentração de biomassa em sistemas MBBR. O processo de nitrificação foi severamente afetado no SBBR quando uma alimentação na forma de pulso de $4 \text{ gN}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ foi aplicada a esse sistema. Ácido nitroso e amônia livre são provavelmente os agentes inibidores das AOB e NOB.

**Remoção simultânea de nitrogênio e
fósforo em reatores de lodo granular
operados em diferentes temperaturas**

4. Remoção simultânea de nitrogênio e fósforo em reatores de lodo granular operados em diferentes temperaturas

4.1. Introdução

A remoção biológica de nitrogênio de águas residuárias é geralmente realizada por meio dos processos convencionais de nitrificação (conduzido em condições aeróbias) e desnitrificação (conduzido em condições anóxicas). A remoção biológica de fósforo, por sua vez, pode ser alcançada por meio do processo EBPR (sigla, em inglês, de *Enhanced biological phosphate removal*). Nesse processo, o lodo é submetido a condições anaeróbias-aeróbias alternadas, justamente para propiciar a seleção dos agentes microbianos responsáveis por esse processo, conhecidos por organismos acumuladores de polifosfato (PAO, sigla em inglês de *Polyphosphate-accumulating organisms*). Essas condições de operação, no entanto, também favorecem o desenvolvimento de outro grupo de micro-organismos, denominados de organismos acumuladores de glicogênio (GAO, sigla em inglês de *Glycogen-accumulating organisms*), os quais competem com os PAO pela matéria orgânica disponível em ambiente anaeróbio (ZENG *et al.*, 2002). A diminuição do desempenho de sistemas EBPR é geralmente atribuída à presença de GAO (OEHMEN *et al.*, 2006a).

Na maioria dos sistemas de tratamento de águas residuárias, os processos de remoção biológica de nitrogênio e fósforo são geralmente integrados em um único sistema. Entretanto, o sistema EBPR combinado com remoção biológica de nitrogênio (nitrificação e desnitrificação) pode encontrar alguns problemas, uma vez que a quantidade de matéria orgânica (expressa usualmente na forma de DQO) constitui em um fator limitante para a remoção de fósforo e para a desnitrificação.

O problema da limitação de material orgânico pode ser superado quando alguns organismos, responsáveis tanto pela desnitrificação quanto pelo consumo de fósforo em condições anóxicas, estiverem presentes no sistema biológico de tratamento (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1998). Essas bactérias, designadas por organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes (DPAO), possuem características metabólicas similares àquelas apresentadas pelos PAO. A diferença se refere à capacidade dos DPAO de utilizar nitrato e/ou nitrito (produzidos pela nitrificação em condições aeróbias) ao invés de oxigênio como acceptor de elétrons para remover de forma simultânea nitrogênio e

fósforo da água residuária. Esses organismos não requerem a adição externa de carbono, uma vez que utilizam os polímeros armazenados intracelularmente em condições anaeróbicas como doador de elétrons para a desnitrificação (KUBA *et al.*, 1993, KERRN-JESPERSEN e HENZE, 1993, FLOWERS *et al.*, 2009). Além do uso eficiente da matéria orgânica afluyente, a utilização de nitrito ou nitrato ao invés de oxigênio como acceptor de elétrons diminui o requerimento de aeração, o que repercute na redução dos custos de operação.

Na maioria dos estudos envolvendo a operação de sistemas EBPR, *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (a partir de agora denominado apenas *Accumulibacter*, por simplicidade) têm sido considerados os mais importantes organismos acumuladores de polifosfato. Pesquisas recentes explorando as características de PAO têm mostrado novidades a respeito dessas bactérias. HE *et al.* (2006), estudando a distribuição de diferentes tipos de *Accumulibacter* em sistemas EBPR de escala laboratorial e industrial, observaram a existência de diversos subtipos entre os membros do grupo *Accumulibacter*. A diversidade desses organismos foi posteriormente organizada em dois grupos principais (I e II), utilizando-se para tanto o gene que codifica para a enzima polifosfato quinase (ppk1) como marcador molecular (HE *et al.*, 2007, PETERSON *et al.*, 2008).

Embora tenha sido reportado que *Accumulibacter* seja capaz de usar nitrato como acceptor de elétrons para consumir fosfato em condições anóxicas (ZENG *et al.*, 2003b), a análise metagenômica de uma cultura enriquecida com *Accumulibacter* do subtipo II mostrou a falta da enzima nitrato redutase nesses micro-organismos específicos (GARCIA MARTIN *et al.*, 2006). CARVALHO *et al.* (2007) reportaram a ocorrência de dois tipos morfológicos de *Accumulibacter* (em forma de cocos e de bastonete) com diferentes características em relação à redução de nitrato, em dois reatores de escala laboratorial alimentados com acetato e propionato, respectivamente. Investigações posteriores mostraram que os organismos *Accumulibacter* estabelecidos em um reator no qual apenas nitrito foi fornecido com acceptor de elétrons, não foram capazes de reduzir nitrato (GUISASOLA *et al.*, 2009). Todos esses resultados vinculados à capacidade de redução de nitrato sugeriram diferenças no metabolismo dos membros da linhagem *Accumulibacter*.

Baseados em evidências experimentais, FLOWERS *et al.* (2009) mostraram que os PAO pertencendo ao subtipo I (a partir de agora designados apenas por PAOI) foram capazes de reduzir nitrato enquanto que os PAO do subtipo II (a partir de agora

designados apenas por PAOII) foram capazes de utilizar somente nitrito como acceptor de elétrons para o consumo anóxico de fosfato. Vale ressaltar que os ambos os subtipos I e II são organismos facultativos, capazes de utilizar oxigênio como acceptor de elétrons quando o mesmo estiver disponível.

Uma das tecnologias emergentes apropriadas para a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo em um único sistema reacional é o processo de lodo granular aeróbio. Essa tecnologia não é baseada em diversos tanques nos quais zonas aeróbias, anóxicas e anaeróbias são dispostas separadamente. As diferentes condições redox são obtidas por meio da limitação à transferência de massa no biofilme e operação do reator em regime de bateladas sequenciais (SBR), permitindo a introdução de períodos com e sem aeração. Um regime de alimentação anaeróbio no SBR é indispensável para a liberação de fósforo. No período subsequente, a aeração é fornecida ao sistema, e os processos de nitrificação e remoção aeróbia de fósforo ocorrem na zona aeróbia dos grânulos. Em contrapartida, na região anóxica dos mesmos, ocorre o processo de desnitrificação, o qual está vinculado à remoção anóxica de fosfato (DE KREUK *et al.*, 2005b).

Um esquema simplificado mostrando as principais conversões ocorrendo em paralelo na estrutura do lodo granular aeróbio está ilustrado na Figura 4.1. O acúmulo de polihidroxicanoatos por PAOs, DPAOs, GAOs e DGAOs durante a fase anaeróbia não está mostrado no esquema. Durante o regime de alimentação anaeróbio, não há estratificação do biofilme e todo o grânulo é mantido em condições anaeróbias. A ocorrência simultânea dos processos de nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo durante a fase aeróbia dificulta a identificação de rotas específicas de conversão.

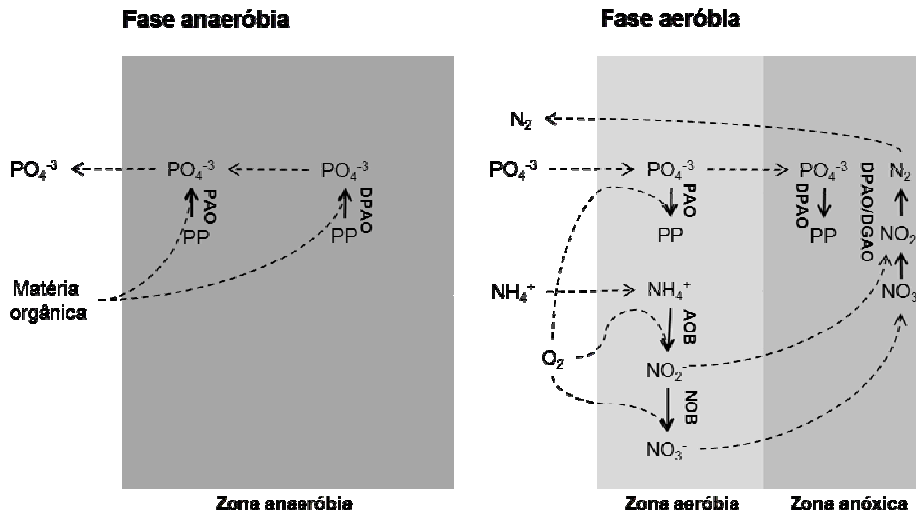


Figura 4.1: Esquema das principais conversões ocorrendo em paralelo na estrutura dos grânulos aeróbios. AOB: bactérias oxidadoras de amônio; NOB: bactérias oxidadoras de nitrito; PAO: organismos acumuladores de polifosfato; DPAO: organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes; GAO: organismos acumuladores de glicôgeno; DGO: demanda química de oxigênio; PP: polifosfato. Os organismos desnitrificantes são exemplificados pelos DPAOs e organismos acumuladores de glicôgeno desnitrificantes (DGAOs).

São diversas as pesquisas reportadas na literatura que investigaram a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo em sistemas de lodo granular aeróbio (DE KREUK *et al.*, 2005c, ZENG *et al.*, 2003a, YILMAZ *et al.*, 2008, KISHIDA *et al.*, 2009). Esses estudos descrevem o desempenho geral de sistemas de grânulos aeróbios em termos de remoção de nitrogênio e fósforo sem especificar a importância de subpopulações específicas de PAOs nas conversões envolvendo esses dois nutrientes. Ademais, somente alguns trabalhos reportam a remoção simultânea de N e P em condições de clima tropical, tal como temperaturas de 30°C (WINKLER *et al.*, 2011a; EBRAHIMI *et al.*, 2010).

Nesse estudo, foi realizada uma caracterização completa dos principais processos de conversão ocorrendo em dois reatores de lodo granular aeróbio, operados em diferentes temperaturas (20 e 30°C), destinados à remoção simultânea de N e P. Também foi investigado o efeito da concentração de oxigênio dissolvido e da temperatura nas conversões envolvendo nitrogênio e fósforo, a contribuição da remoção anóxica de fósforo para a remoção total (aeróbia e anóxica) desse nutriente e a importância de algumas populações microbianas envolvidas nesse sistema. Variações nas condições de operação do reator durante curtos períodos e testes em batelada em

condições anóxicas foram realizados no intuito de se elucidar algumas rotas metabólicas envolvidas nos principais processos biológicos ocorrendo nos grânulos aeróbios.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Aparato experimental e condições operacionais

Os experimentos foram realizados em dois reatores em batelada sequencial de lodo granular aeróbio (SBR₂₀ e SBR₃₀), do tipo coluna de bolhas. Uma representação esquemática do sistema está ilustrada na Figura 4.2. O volume de ambos os sistemas era de 2,6 L, com diâmetro interno de 5,6 cm e altura total de 90 cm. O SBR₂₀ e o SBR₃₀ foram operados, respectivamente, à temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e 30°C . Para manter a temperatura constante em 30°C no SBR₃₀, água com a temperatura desejada foi circulada por meio de tubos, posicionados ao redor do reator. Um isolamento térmico foi utilizado para evitar o esfriamento do reator.

Aeração e agitação foram fornecidas por meio de um difusor de ar colocado na base nos reatores, sendo o fluxo de ar equivalente a 4 L/min. O pH foi mantido em $7,0 \pm 0,2$ por meio da dosagem de soluções de NaOH 1 M ou HCl 1 M. O SBR₂₀ foi inoculado com grânulos provenientes de um reator de lodo granular de escala piloto, o qual tratava água residuária municipal (EPE, Holanda). No estágio inicial de operação do SBR₂₀ (fase de partida), a concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi mantida próxima à saturação do ar ($9,1 \text{ mgO}_2/\text{L}$ a 20°C). Após 48 dias de operação, a concentração de OD foi reduzida a 20% em relação à saturação do ar ($1,8 \text{ mgO}_2/\text{L}$) para aumentar a eficiência de desnitrificação. Após 104 dias de operação, metade do leito de lodo foi removida do SBR₂₀ para inocular o SBR₃₀, o qual foi inicialmente submetido à mesma concentração de OD do SBR₂₀ naquele período, isto é, $1,8 \text{ mgO}_2/\text{L}$. A partir de então, a operação dos reatores de lodo granular aeróbio foi dividida em diferentes fases experimentais, como mostrado na Tabela 4.1.

A duração do ciclo dos SBR foi de 3 h, período durante o qual o reator foi submetido a condições anaeróbias e aeróbias alternadas para propiciar a remoção de nitrogênio e fósforo. O ciclo foi composto pelas seguintes fases: alimentação anaeróbia de 60 min, a partir da base do reator, em regime de fluxo pistonado (*plug-flow*), através do leito de lodo sedimentado; 112 min de aeração; 3 min de sedimentação; e 5 min de drenagem do efluente. O efluente foi removido a partir de uma saída situada 51 cm

acima da base do reator. Nessas condições, a percentagem de troca de volume foi de 57%, resultando em um tempo de retenção hidráulica (TRH) de 5,2 h. Um controlador (Braun DCU4) acoplado a um sistema de controle de fluxo mássico MFCS e *software* de aquisição de dados foi utilizado para a operação automatizada dos reatores. A concentração de OD foi controlada de forma bastante precisa por meio do uso de dois controladores de fluxo de massa, um para o ar e outro para o gás nitrogênio. O meio sintético de alimentação consistiu de duas soluções: (A) $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 63 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,6 mM, KCl 4,7 mM e (B) NH_4Cl 35,4 mM, K_2HPO_4 4,2 mM, KH_2PO_4 2,1 mM e 10 mL/L de uma solução de elementos traço (VISHNIAC e SANTER, 1957). Em cada ciclo, 150 mL de cada meio foi misturado com 1200 mL de água para que o meio de alimentação apresentasse DQO de 400 mg/L, concentração de amônio de 60 mgN/L e concentração de fosfato de 20 mgP/L. O tempo de retenção de sólidos (TRS) foi determinado de acordo com WINKLER *et al.* (2011a) e foi mantido em torno de 30 dias por meio da remoção periódica de lodo em excesso dos reatores a cada dois dias.

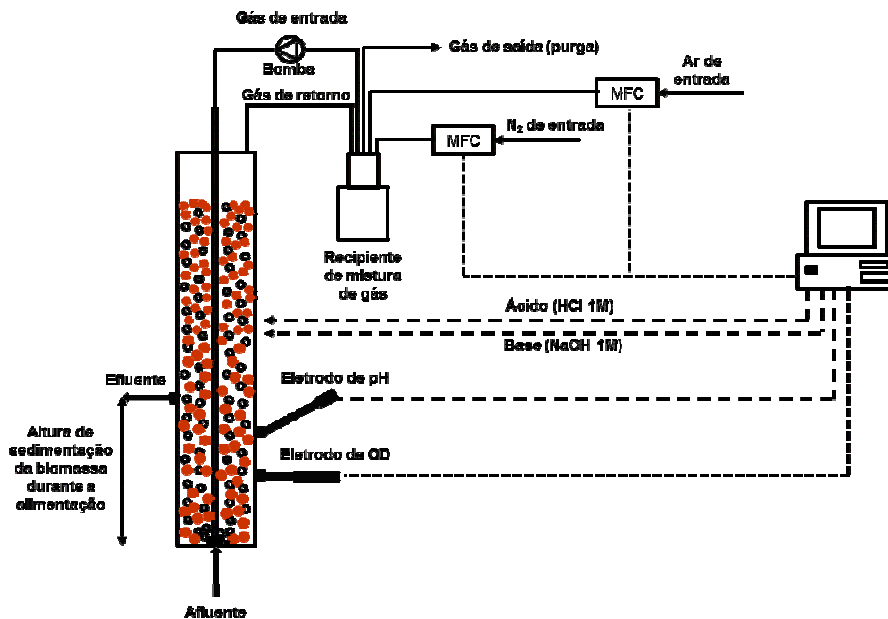


Figura 4.2: Representação esquemática da unidade experimental. OD: oxigênio dissolvido; CFM: controlador de fluxo mássico. Os círculos marrons representam o lodo granular aeróbio, enquanto círculos brancos com contorno preto indicam as bolhas de gás.

Como mostrado na Tabela 4.1, durante as fases A1 e A2 no SBR_{20} e SBR_{30} , respectivamente, o lodo em excesso foi removido durante a fase de aeração, isto é, quando o conteúdo do reator estava completamente misturado. Subsequentemente, na fase B1 (SBR_{20}) e fases B2a e B2b (SBR_{30}), 80% (em base de volume) do lodo em

excesso foi removido do topo do leito de lodo e 20% foi removido da base do mesmo, procedimento realizado para favorecer os PAO em detrimento aos GAO.

Nas fases C1 e C2, o lodo em excesso foi removido somente da base do leito de lodo e a concentração de fosfato afluente foi reduzida de 20 para 2 mgP/L para promover o arraste de PAO. Além disso, o sobrenadante, concentrado em fosfato liberado pelos PAO durante o período de alimentação anaeróbio, foi substituído, imediatamente após o início da fase de aeração, por uma solução mineral de composição similar ao meio de alimentação, embora desprovida de fosfato. Esse procedimento foi repetido por diversos dias no intuito de acelerar o arraste de PAO, os quais não conseguiriam recuperar as reservas de polifosfato de suas células. Nitrito, composto considerado inibidor aos PAO (SAITO *et al.*, 2004), também foi adicionado no início da fase de aeração em alguns ciclos, de modo que a concentração final atingida fosse de 20 mgNO₂⁻-N/L. O arraste de PAO foi realizado para simplificar a complexidade do sistema, mantendo no reator apenas um organismo principal responsável pela desnitrificação (GAO desnitrificantes ou DGAO). Desse modo, a compreensão da rota metabólica da desnitrificação seria facilitada. A remoção de PAO também foi realizada para o melhor entendimento da relação entre os principais fatores que potencialmente influenciam a segregação de biomassa no leito de lodo, isto é, precipitação química, teor de polifosfato e material inerte da biomassa.

Testes de ciclo foram conduzidos quando um estado pseudo-estacionário foi obtido em diferentes fases operacionais dos dois sistemas. Amostras foram coletadas a cada 10 – 20 min, somente durante a fase de aeração, durante a qual o conteúdo do reator estava homogeneizado. A primeira amostra foi coletada depois de 2 min a partir do início do período de aeração para permitir mistura completa. As taxas de consumo de amônio e fosfato foram determinadas por regressão linear de suas respectivas concentrações ao longo do tempo, divididas pela concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no reator. A taxa de desnitrificação em condições normais de operação foi estimada com base na diferença entre a taxa de oxidação de amônio e a taxas de produção de nitrito e nitrato durante a nitrificação.

Tabela 4.1: Fases experimentais dos reatores de lodo granular aeróbio.

| Reator | Fase experimental ^a | Oxigênio dissolvido (mg/L) | Lodo em excesso para controle de TRS ^b | Tempo de operação (dias) |
|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------|---|--------------------------|
| SBR ₂₀ (20°C) | Fase A1 | 1,8 | Amostra misturada | 39 |
| | Fase B1 | 1,8 | 80% do topo 20% da base | 131 |
| | Fase C1 | 1,8 | 100% da base | 77 |
| SBR ₃₀ (30°C) | Fase A2 | 1,8 | Amostra misturada | 39 |
| | Fase B2a | 1,8 | 80% do topo 20% da base | 119 |
| | Fase B2b | 1,3 | 80% do topo 20% da base | 12 |
| | Fase C2 | 1,3 | 100% da base | 77 |

^a A, B e C indicam as fases experimentais, 1 ou 2 se referem ao SBR₂₀ ou SBR₃₀, respectivamente. O tempo de operação do SBR₂₀ antes do SBR₃₀ ser inoculado não foi levado em consideração, sendo esse período considerado uma fase de partida anterior ao início da fase A1.

4.2.2. Experimentos adicionais

4.2.2.1 Experimentos em batelada em condições anóxicas

Diversos testes em batelada foram realizados para a determinação das taxas específicas de consumo anóxico de fosfato com nitrito ou nitrato funcionando como aceptores de elétrons. Esses experimentos foram conduzidos durante as fases B1 e C1 (SBR₂₀) e durante as fases B2a e C2 (SBR₃₀). A biomassa utilizada nesses testes foi coletada dos reatores imediatamente após o período de alimentação, isto é, após o acúmulo de PHA (pelos PAO e GAO) e liberação de fosfato pelos PAO para o meio líquido. Os grânulos provenientes de ambos os sistemas foram colocados em uma peneira e lavados com água. Quantidades iguais de biomassa (baseadas em peso úmido) foram introduzidas em diferentes frascos de 250 mL preenchidos com tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) contendo os mesmos minerais do meio sintético alimentado ao reator, com exceção de acetato e fosfato. Os frascos contendo biomassa do SBR₂₀ e SBR₃₀ foram mantidos na mesma temperatura de operação dos respectivos reatores, ou seja, 20°C e 30°C. Gás nitrogênio foi fornecido a cada frasco por meio de difusores porosos para manter condições anaeróbias. No início do experimento (primeiros 13 min), nada

foi adicionado aos frascos para verificar se ocorreria a liberação de fosfato secundária sem a presença de acceptor de elétrons (para manutenção celular). Depois de 15 min a partir do início do experimento, uma solução concentrada em fosfato ($6,25 \text{ gPO}_4^{3-}\text{-P/L}$) foi adicionada a cada frasco para que uma concentração final de aproximadamente 25 mgP/L fosse obtida. Após 30 min a partir do início do teste, uma solução concentrada em nitrito ou nitrato (soluções estoque de $7,5 \text{ gN/L}$) foi dosada para que uma concentração de 30 mgN/L fosse obtida. A partir desse momento, amostras foram coletadas regularmente a cada 10 a 20 min para a determinação das concentrações de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, $\text{NO}_2^{-}\text{-N}$ e $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$. Uma vez que eram retiradas apenas amostras líquidas de cada frasco nos intervalos definidos de tempo, a quantidade de biomassa por volume de líquido aumentou ao longo do experimento. As concentrações medidas e as taxas específicas de conversão foram corrigidas levando-se em consideração o volume de líquido retirado do sistema por amostragem. A taxa de desnitrificação foi expressa como taxa de redução de nitrito ou nitrato, sendo obtida por meio de regressão linear da concentração de nitrito ou nitrato ao longo do tempo, dividida pela concentração de SSV.

4.2.2.2 Testes de ciclo adicionais

Além dos testes de ciclo convencionais realizados em condições normais de operação dos reatores, outros testes também foram realizados em condições totalmente anóxicas ou aeróbias. Essas condições foram obtidas, respectivamente, por meio do borbulhamento de gás nitrogênio ou ar, utilizando-se difusores porosos. Nos testes mantidos em condições anóxicas, a adição gradual de nitrito ou nitrato foi baseada na taxa de desnitrificação observada durante condições normais de operação. Dois tipos de testes foram realizados: um no qual nitrito ou nitrato foi adicionado de acordo com a taxa de desnitrificação e outro no qual esses compostos foram adicionados a uma taxa duas vezes maior que a taxa de desnitrificação. As taxas de redução de nitrito ou nitrato foram obtidas subtraindo-se a taxa de dosagem de nitrito ou nitrato da taxa de acúmulo de nitrito ou nitrato observado durante o experimento, dividida pela concentração de SSV.

4.2.3. Determinação das propriedades físicas dos grânulos

O diâmetro médio dos grânulos do topo e da base do leito de lodo foi determinado por meio de análise de imagens. A densidade da biomassa foi medida com o auxílio de um picnômetro (WINKLER *et al.*, 2011a). A profundidade de penetração de oxigênio e a fração de volume aeróbio disponível para a nitrificação foram calculadas de acordo com WINKLER *et al.* (2011b). A área superficial dos grânulos foi calculada com base no diâmetro médio dos grânulos do topo e da base do leito de lodo. A determinação desses parâmetros possibilitou realizar uma comparação entre as diferentes fases do mesmo reator e entre os dois sistemas. Para o cálculo das velocidades teóricas de sedimentação, levou-se em consideração a densidade e os diâmetros médios dos grânulos do topo e da base do leito de lodo. No caso em que o número de Reynolds da partícula fosse menor do que 1, foi utilizada a lei de Stokes para calcular a velocidade de sedimentação $v_s = \frac{g}{18} \cdot \frac{\rho_p - \rho_w}{\rho_w} \cdot \frac{d_p^2}{\nu_w}$. A velocidade de decantação para as partículas cujo número de Reynolds era superior a 1, foi determinada por meio do cálculo do número de Arquimedes ($Ar = \frac{\rho_p - \rho_w}{\rho_w} \cdot d_p^3 \cdot \frac{g}{\nu_w}$) e posteriormente foi definido o número ômega a partir do diagrama de Omega-Arquimedes. A velocidade de sedimentação foi então calculada por meio da Equação $\Omega = \frac{v_s^3 \cdot \rho_w}{\nu_w \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_w)}$. As definições para os termos usados nas Equações estão mostradas no Apêndice. Esses parâmetros foram utilizados com base no valor médio obtido a partir dos grânulos do topo e da base do leito de lodo para comparar as diferentes fases do mesmo reator e os dois reatores.

4.2.4. Medições analíticas

Amônio ($\text{NH}_4^+\text{-N}$), nitrato ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) e nitrito ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) foram quantificados por meio de testes de cubeta específicos (Hach Lange) ou por meio de análise de injeção de fluxo (QuikChem 8500, Lachat Instruments, Inc.). Fosfato ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) foi determinado apenas por testes de cubeta (Hach Lange). O procedimento analítico para a determinação de polihidroxialcanoatos (PHA) está descrito no trabalho de JOHNSON *et al.* (2009).

4.2.5. *Hibridização in situ por fluorescência (FISH)*

A análise FISH foi conduzida para investigar as mudanças das populações microbianas nos sistemas de lodo granular. Os grânulos foram coletados, separadamente, do topo e da base do leito de lodo dos dois reatores. Esse procedimento, realizado regularmente ao longo de todo o período experimental, foi conduzido durante a fase de alimentação, com frequência semanal. Imediatamente após serem coletados, os grânulos provenientes do topo e da base do leito de lodo foram esmagados, sendo subsequentemente submetidos a duas lavagens com tampão fosfato-salino (PBS) 1× e imediatamente fixados em solução de paraformaldeído 4% (m/v) por 3 h a 4°C. Após a etapa de fixação, as células foram centrifugadas a 13000 g por 1 min, lavadas duas vezes em PBS 1× e ressuspendidas em uma solução de etanol/PBS (1:1) para armazenamento a -20°C. A hibridização, observação das células hibridizadas em microscópio de epifluorescência e a aquisição das imagens foram realizadas conforme descrito nos capítulo anterior (item 3.2.3). As sondas oligonucleotídicas específicas para rRNA, marcadas com três diferentes fluorocromos (Cy3, Fluos e Cy5), estão listadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Sondas oligonucleotídicas e os grupos microbianos alvo.

| Sonda | Sequência (5'-3') | Grupo alvo | Mistura | Referência |
|-------------|----------------------------|---|---------------------------------|-------------------------------|
| PAO 462 | CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC | PAO ^a | | Crocetti <i>et al.</i> (2000) |
| PAO 651 | CCCTCTGCCAAACTCCAG | PAO ^a | PAOm ^{ix} ^c | Crocetti <i>et al.</i> (2000) |
| PAO 846 | GTTAGCTACGGCACTAAAAGG | PAO ^a | | Crocetti <i>et al.</i> (2000) |
| Acc-I-444 | CCCAAGCAATTTCTTCCCC | Subtipo IA ^b | PAOI/PAOII ^f | Flowers <i>et al.</i> (2009) |
| Acc-II-444 | CCCGTGCAATTTCTTCCCC | Subtipo IIA ^c | | Flowers <i>et al.</i> (2009) |
| GAO Q431 | TCCCCGCCTAAAGGGCTT | Competibacter phosphatis ^d | GAOm ^{ix} ^g | Crocetti <i>et al.</i> (2002) |
| GAO Q989 | TTCCCCGGATGTCAAGGC | Competibacter phosphatis ^d | | Crocetti <i>et al.</i> (2002) |
| Nso 1225 | CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA | <i>Nitrosomonas</i> | | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Nso 190 | CGATCCCCTGCTTTTCTCC | Oxidadores de amônia β-proteobacteria | AOBm ^{ix} ^h | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Neu 653 | CCC CTC TGC TGC ACT CTA | Maioria halofilicos e halotolerantes <i>Nitrosomonas spp.</i> | | Wagner <i>et al.</i> (1995) |
| Ntspa 662 | GGA ATT CCG CGC TCC TCT | Gênero <i>Nitrospira</i> | NOBm ^{ix} ⁱ | Daims <i>et al.</i> (2001) |
| Nit 1035 | CCT GTG CTC CAT GCT CCG | <i>Nitrobacter spp.</i> | | Wagner <i>et al.</i> (1996) |
| EUB 338 I | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | Maioria da bactérias | EUBm ^{ix} ^j | Amann <i>et al.</i> (1990b) |
| EUB 338 II | GCAGCCACCCGTAGGTGT | <i>Planctomycetes</i> | | Daims <i>et al.</i> (1999) |
| EUB 338 III | GCTGCCACCCGTAGGTGT | Verrucomicrobiales | | Daims <i>et al.</i> (1999) |

^a Relacionado com *Rhodocyclus (Candidatus Accumulibacter phosphatis)*

^b Probe Acc-I-444 também detecta alguns (mas não todos) membros de outros subtipos de PAOI

^c Probe Acc-II-444 também detecta alguns (mas não todos) membros dos subtipos IIC and IID. Os subtipos foram definidos previamente (PETERSON *et al.*, 2008).

^d *Candidatus Competibacter phosphatis*

^e A combinação PAOm^{ix} (PAO462, PAO651 and PAO846) foi usada para detectar *Candidatus Accumulibacter* (OEHMEN *et al.*, 2007).

^f Para a diferenciação entre os subtipos de PAOs (subtipo I e II, capazes e não capazes de reduzir nitrato, respectivamente), foram utilizadas sondas específicas desenvolvidas por FLOWERS *et al.* (2009).

^g GAO foram detectados com a combinação das sondas GAOQ431 e GAOQ989, designada por GAOm^{ix}.

^h Bactérias oxidadoras de amônio foram detectadas com a combinação das sondas Nso 1225, Nso 190 e Neu 653, designada por AOBm^{ix}.

ⁱ Bactérias oxidadoras de nitrito foram detectadas com a combinação das sondas Ntspa 662 e Nit 1035, designada por NOB mix.

^j A população total de bactérias foi detectado com a combinação das sondas EUB 338 I, EUB 338 II e EUB 338 III, designada por EUBm^{ix}.

4.3. Resultados

4.3.1. Fase de partida (start-up)

Durante os primeiros 48 dias da fase de partida do SBR₂₀ (dados não mostrados), a concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi mantida em 100% de saturação do ar (9,1 mgO₂/L a 20°C). Durante esse período, a liberação de fosfato aumentou gradualmente de 20 a 50 mgP/L e completa remoção de amônio foi obtida. Quando atingido um estado pseudo-estacionário, a remoção de fosfato e de nitrogênio foi de 90% e 60%, respectivamente.

Para aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio por meio do aumento da zona anóxica dos grânulos, a concentração de OD foi reduzida para 1,8 mgO₂/L. Após essa alteração, amônio começou a acumular no efluente em concentrações de aproximadamente 6 mgN/L durante um período de 15 dias. Apesar disso, a adaptação da biomassa aos baixos níveis de OD permitiu o restabelecimento de remoção integral de amônio. A eficiência de remoção de nitrogênio também aumentou nesse período, variando de 80 a 90% até o final da fase de partida do SBR₂₀, a qual durou 104 dias. O decréscimo significativo na concentração de OD afetou a liberação de fosfato durante o período de alimentação anaeróbio, a qual diminuiu de 50 para 30 mgP/L. A remoção de fosfato durante a fase de aeração também foi afetada, passando de 80 para 30%. Posteriormente, com a aclimatação da biomassa às reduzidas concentrações de OD, obteve-se uma operação estável com remoção de fosfato de 90% e liberação de fosfato de 65 mgP/L.

4.3.2. Operação dos reatores de lodo granular aeróbio

Após o período de partida, metade do leito de lodo foi removida do SBR₂₀ para inocular SBR₃₀, período que deu início às fases A1 (SBR₂₀) e A2 (SBR₃₀) (instante 0 para ambos os sistemas). Os perfis de concentração de fosfato e dos compostos nitrogenados obtidos durante a operação de ambos SBR, a partir do período em que os mesmos começaram a ser operados em paralelo, estão mostrados nas Figuras 4.3 e 4.4, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 4.3, a partir do início da fase A1, iniciada imediatamente após a remoção de metade da biomassa do SBR₂₀, a remoção de fosfato durante o período de aeração e a sua liberação durante a fase anaeróbia de alimentação não foram afetadas nesse sistema. Em contrapartida, embora o SBR₃₀ tenha sido inoculado com grânulos do SBR₂₀, o qual estava apresentando boa remoção de fosfato, o período de partida do reator operado a 30°C foi caracterizado por uma baixa remoção

desse nutriente (em torno de 50%). Ademais, a liberação de fosfato nesse reator, em particular, não chegou a 20 mgP/L no início da fase A2. Esses resultados sugeriram que o crescimento e a atividade dos PAO foram severamente afetados pelo aumento da temperatura de 20 a 30°C.

A remoção de metade do lodo granular do SBR₂₀ ocasionou uma queda significativa na capacidade de nitrificação, repercutindo na baixa remoção de nitrogênio observada nos primeiros dias de operação na fase A1 (Figura 4.4a). A conversão completa de amônio foi restabelecida em 25 dias de operação, e conseqüentemente, remoção completa de nitrogênio foi obtida no final da fase A1. Resultados similares foram obtidos no SBR₃₀, embora nesse sistema o tempo requerido para que nitrificação completa e remoção total de nitrogênio fossem obtidas foi um pouco maior (33 dias).

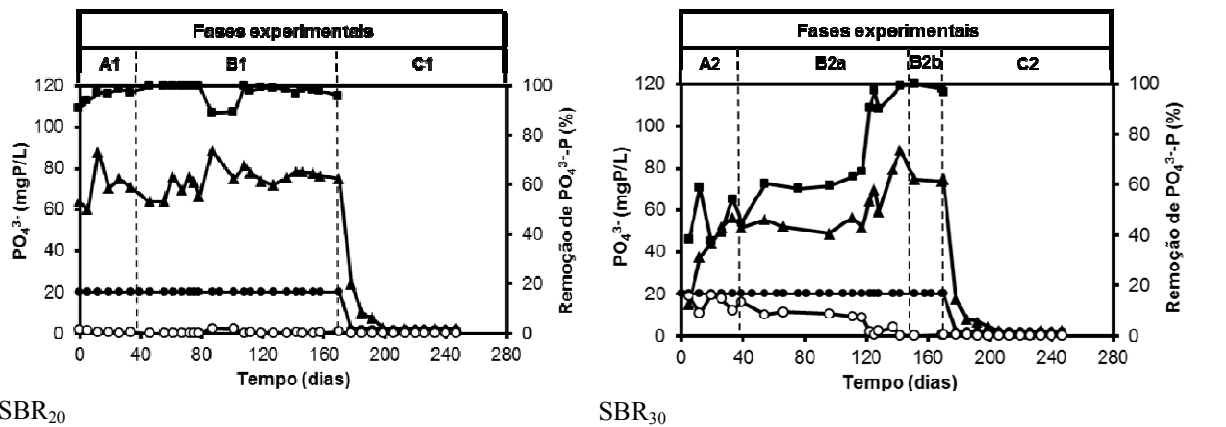


Figura 4.3: Concentrações de fosfato no afluente (●) e efluente (○), liberação de fosfato durante o período de alimentação anaeróbica (▲) e remoção de fosfato (■) durante a operação dos SBR. A remoção de fosfato não foi levada em consideração na fase C1 (SBR₂₀) e fase C2 (SBR₃₀) quando a concentração de fosfato afluente foi de apenas 2 mgPO₄³⁻-P/L.

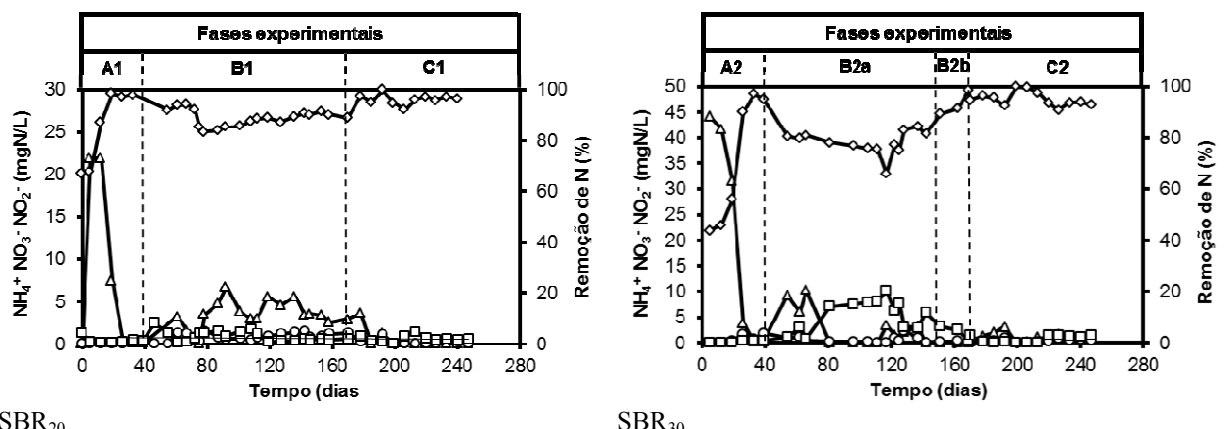


Figura 4.4: Concentrações de amônio (Δ), nitrito (○) e nitrato (□) no efluente e remoção de nitrogênio (◇) durante a operação dos SBR. A concentração de amônio afluente foi mantida em 60 mgN/L.

Os resultados obtidos a partir da análise FISH, mostrados nas Figuras 4.5 e 4.6, indicaram que os PAO e os GAO representaram a maior parte da população. Além disso, observou-se uma estratificação da estrutura da comunidade microbiana ao longo do leito de lodo durante as fases A1 (SBR₂₀) e A2 (SBR₃₀). O topo do leito de lodo em ambos os reatores foi dominado por GAO, enquanto que a base do mesmo foi dominada por PAO. A segregação da biomassa observada foi mais evidente no reator operado a 30°C, no qual a diferença entre a composição microbiana no topo e na base do leito de lodo foi ainda maior.

No intuito de favorecer os PAO em detrimento aos GAO e melhorar a eficiência de remoção de fosfato, particularmente no SBR₃₀, a maior parte do lodo em excesso retirado para o controle do tempo de retenção de sólidos (TRS) passou a ser removida do topo do leito de lodo (rico em GAO) durante a fase de alimentação na Fase B2a. Em contrapartida, o lodo presente na base do leito de lodo passou a ser removido apenas em pequenas proporções. Para que as condições de operação dos dois reatores fosse a mesma, a remoção seletiva de lodo principalmente do topo do leito de lodo também foi implementada no SBR₂₀ na fase B1, embora a remoção de fosfato nesse sistema já alcançava em torno de 100% no final da fase A1.

Com a remoção seletiva de lodo aplicada, a remoção de fosfato obtida no reator operado a 30°C após 80 dias de operação na fase B2a foi superior a 90%. Concomitantemente, apareceram grânulos de cor branca nesse sistema, os quais apresentaram tamanho relativamente superior aos demais. A população microbiana desses grânulos, em particular, foi dominada por PAO (Figura 4.7). O teor de inertes dessa biomassa específica foi em torno de 40%, valor maior do que aquele apresentado por outros tipos de grânulos presentes no reator (de aproximadamente 20%). Não somente a remoção de fosfato, mas também a liberação de fosfato aumentou durante a fase B2a, atingindo um valor estável de aproximadamente 80 mgP/L no final da respectiva fase de operação. No SBR₂₀, a remoção e a liberação de fosfato se mantiveram estáveis durante toda a fase B1, apresentando valores acima de 95% e 60 mgP/L, respectivamente.

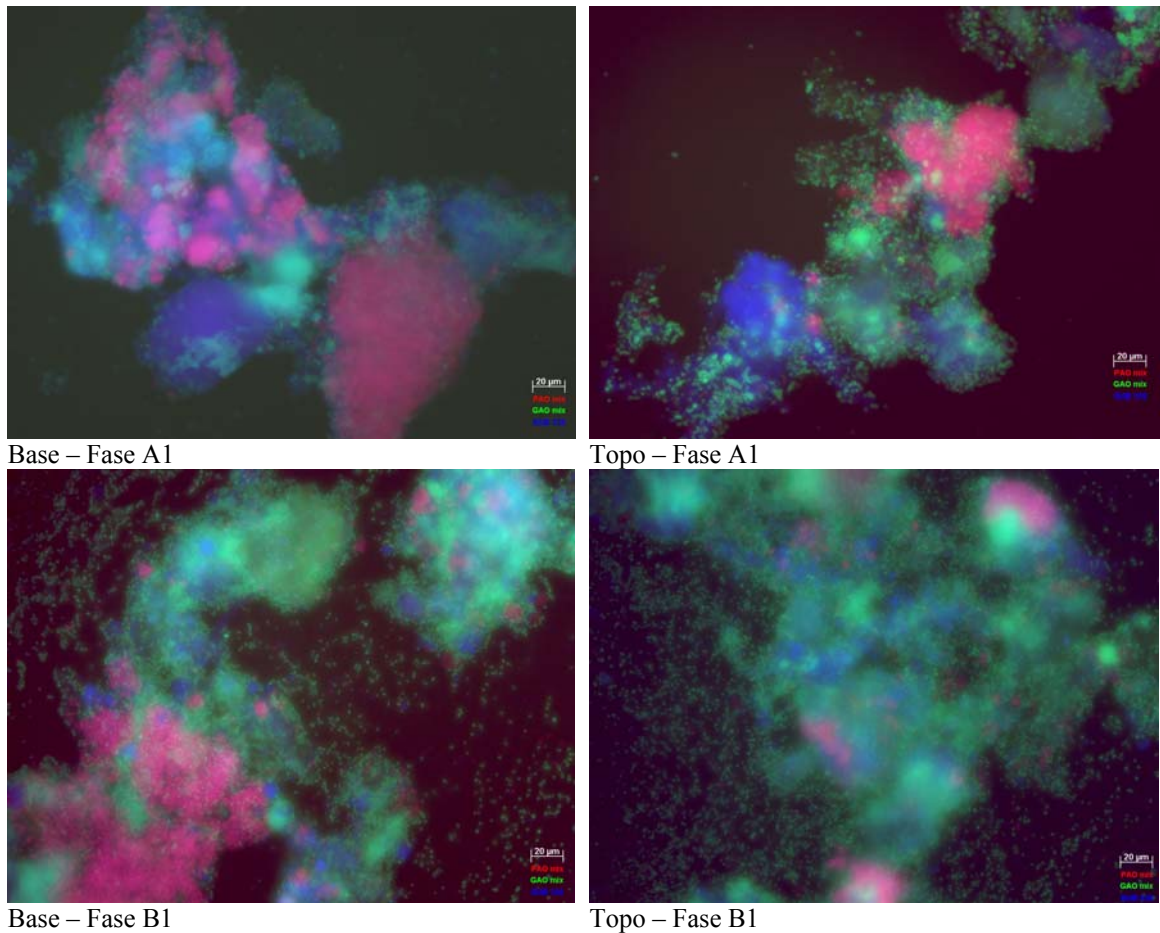


Figura 4.5: Análise das populações de PAO/GAO entre todas as bactérias presentes no SBR₂₀ durante as fases A1 e B1 por meio da técnica de FISH. Foram utilizadas combinações de sondas específicas para PAO (PAO462, PAO462 and PAO846, mostrada em vermelho), GAO (GAOQ431 e GAOQ989, mostrada em verde) e toda população bacteriana EUB338 (EUB338I, EUB338II e EUB338III; mostrada em azul). Os PAO aparecem na cor violeta devido à superposição da combinação PAOmix, em vermelho, com a combinação EUBmix, em azul. Os GAO aparecem na cor azul turquesa devido à superposição da combinação GAOmix, em verde, com a combinação EUBmix, e azul.

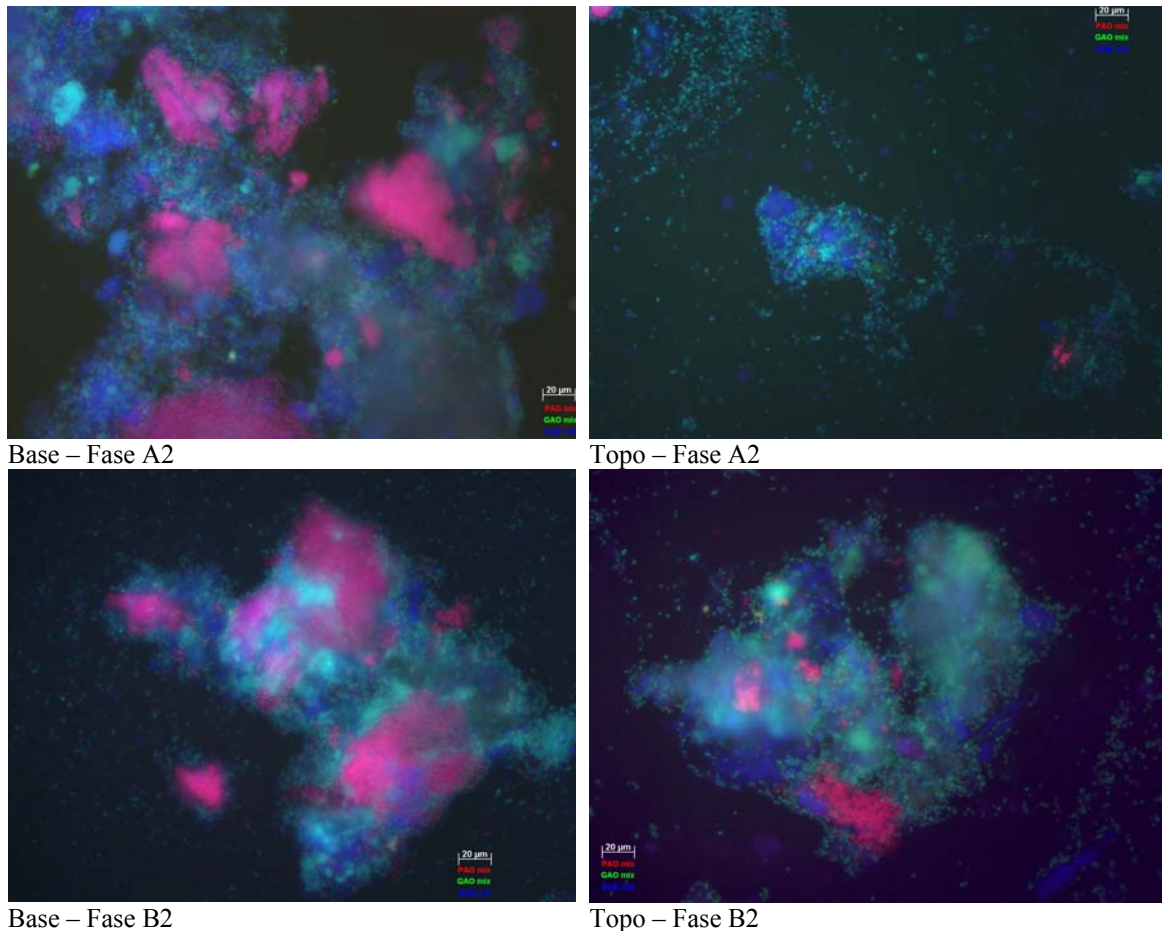


Figura 4.6: Análise das populações de PAO/GAO entre todas as bactérias presentes no SBR₃₀ durante as fases A2 and B2 por meio da técnica de FISH. Foram utilizadas combinações de sondas específicas para PAO (PAO462, PAO462 and PAO846, mostrada em vermelho), GAO (GAOQ431 e GAOQ989, mostrada em verde) e toda população bacteriana EUB338 (EUB338I, EUB338II e EUB338III; mostrada em azul). Os PAO aparecem na cor violeta devido à superposição da combinação PAOmix, em vermelho, com a combinação EUBmix, em azul. Os GAO aparecem na cor azul turquesa devido à superposição da combinação GAOmix, em verde, com a combinação EUBmix, e azul.

Conforme mostrado nas Figuras 4.5 e 4.6, a estratificação da população microbiana ao longo do leito de lodo (GAO dominantes no topo e PAO dominantes na base do leito de lodo) continuou na fase B1 (SBR₂₀) e fase B2a (SBR₃₀). A remoção de nitrogênio também foi mantida constante e em torno de 90% durante a fase B1. Entretanto, amônio passou a ser detectado no efluente ao longo dessa fase experimental, em concentrações de aproximadamente 3mgN/L. No SBR₃₀, nitrato não foi completamente desnitrificado e a remoção de nitrogênio foi de 80% durante a maior parte da fase B2a.

Para atingir melhor remoção de nitrogênio sem diminuir a eficiência de nitrificação no SBR₃₀, a concentração de OD foi levemente diminuída de 1,8 a 1,3

mgO₂/L a partir da fase B2b. Essa fase não foi aplicada ao SBR₂₀, que continuou sendo submetido a 1,8 mgO₂/L. Com a redução do nível de OD, nitrificação completa continuou a ser obtida e praticamente completa desnitrificação (mais de 95%) foi obtida nessa fase. A remoção de fosfato não foi influenciada pela redução do nível de OD no SBR₃₀.

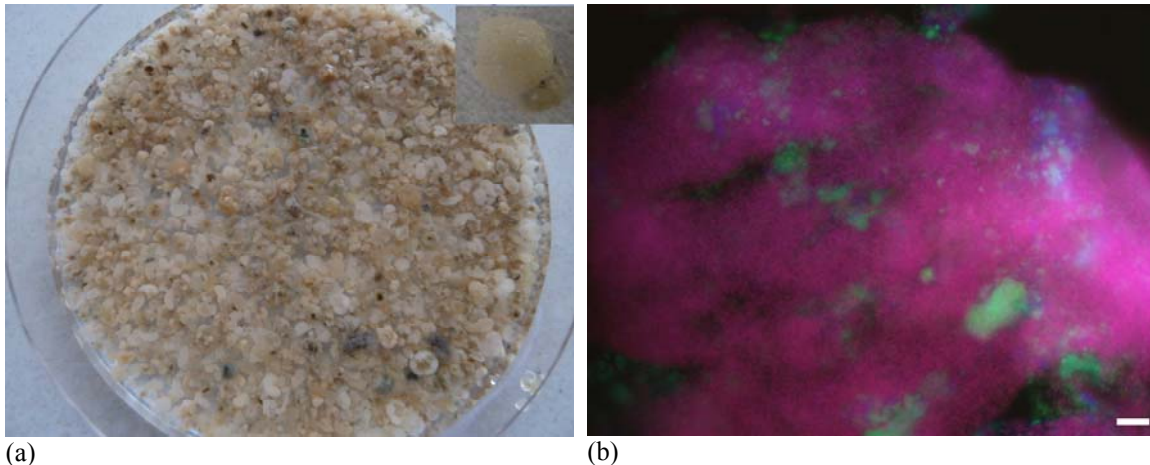


Figura 4.7: Grânulos de cor branca (a) e análise, por meio de FISH, das populações de PAO/GAO entre todas as bactérias presentes nesses grânulos (b) coletados no SBR₃₀ durante a fase B2a. Foram utilizadas combinações de sondas específicas para PAO (PAO462, PAO462 e PAO846, mostrada em vermelho), GAO (GAOQ431 e GAOQ989, mostrada em verde) e todo o conjunto bacteriano EUB338 (EUB338I, EUB338II e EUB338III; mostrada em azul). A barra de escala indica 20 μ m.

Nas fases C1 (SBR₂₀) e C2 (SBR₃₀), período em que o lodo em excesso passou a ser removido somente a partir da base do leito de lodo, a quantidade de fosfato liberado durante o período anaeróbio diminuiu gradualmente e após 20 dias de operação nessas condições, praticamente não foi mais observada a liberação de fosfato em ambos os reatores (Figura 4.3). Poucas células de PAO ainda foram detectadas no SBR₂₀ e SBR₃₀ após esse período (Figura 4.8), quando mais de 95% da população microbiana era representada por GAO. No SBR₃₀, em particular, os grânulos de cor branca passaram para a sua cor original (marrom escuro). O teor de inertes da biomassa em ambos os sistemas gradualmente diminuiu de 30 para 10%. Em ambos os sistemas dominados por GAOs, observou-se nitrificação completa e mais de 95% de remoção de nitrogênio.

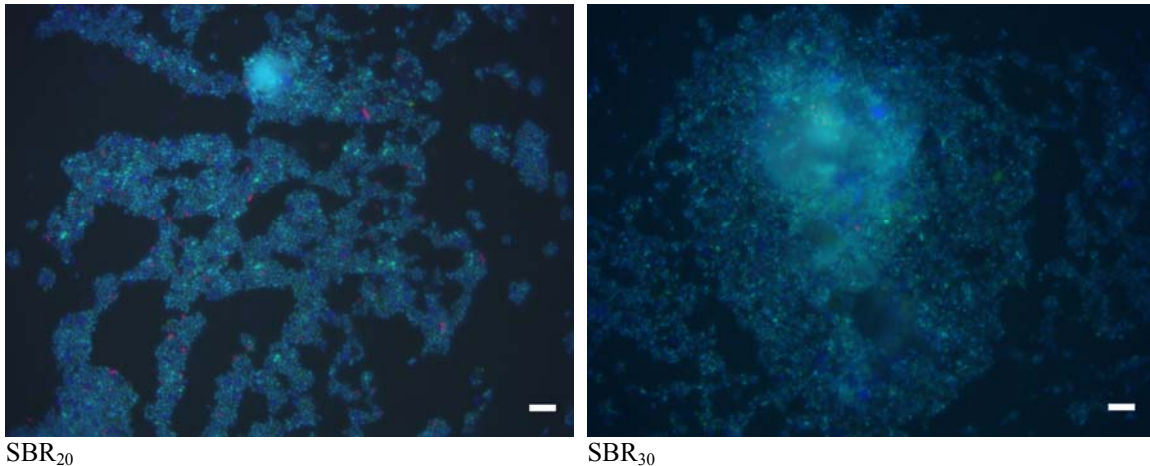


Figura 4.8: Análise das populações de PAO/GAO entre todas as bactérias presentes no SBR₂₀ (fase C1) e SBR₃₀ (fase C2). Foram utilizadas combinações de sondas específicas para PAO (PAO462, PAO462 e PAO846, mostrada em vermelho), GAO (GAOQ431 e GAOQ989, mostrada em verde) e todo o conjunto bacteriano EUB338 (EUB338I, EUB338II e EUB338III; mostrada em azul). A barra de escala indica 10 μm .

4.3.3. Testes de ciclo realizados em condições normais de operação

Os testes de ciclo típicos realizados quando um estado pseudo-estacionário foi atingido em diferentes fases experimentais do SBR₂₀ e SBR₃₀ estão mostrados na Figura 4.9a e 4.9b, respectivamente. Os resultados desses experimentos estão sumarizados na Tabela 4.3. Durante o período anaeróbio de alimentação a partir da base do reator, todo carbono orgânico, na forma de acetato, foi completamente consumido. Essa conversão foi acompanhada pelo consumo de glicogênio, produção de polihidroxialcanoatos (PHA) (dados não mostrados) e liberação de fosfato por PAO (Figuras 4.9a e 4.9b).

Como mostrado na Figura 4.9, a concentração de amônio após o período de alimentação anaeróbio foi menor do que a esperada (em torno de 34 mgN/L, conforme indicado no início do ciclo), levando-se em consideração a concentração afluenta (60 mgN/L) e a diluição do reator com o líquido remanescente no reator. Esse resultado foi atribuído à adsorção de amônio pelo lodo granular, fenômeno investigado em estudos adicionais, não mostrados nesse documento (BASSIN *et al.*, 2011c; LIN *et al.*, 2012). No estágio aeróbio subsequente, o amônio foi nitrificado e nitrito/nitrato foram simultaneamente desnitrificados na região anóxica dos grânulos. Ao mesmo tempo, as reservas de glicogênio foram restauradas e PHA foi oxidado (dados não mostrados). Ainda durante esse período, fosfato foi consumido tanto em condições aeróbias quanto anóxicas.

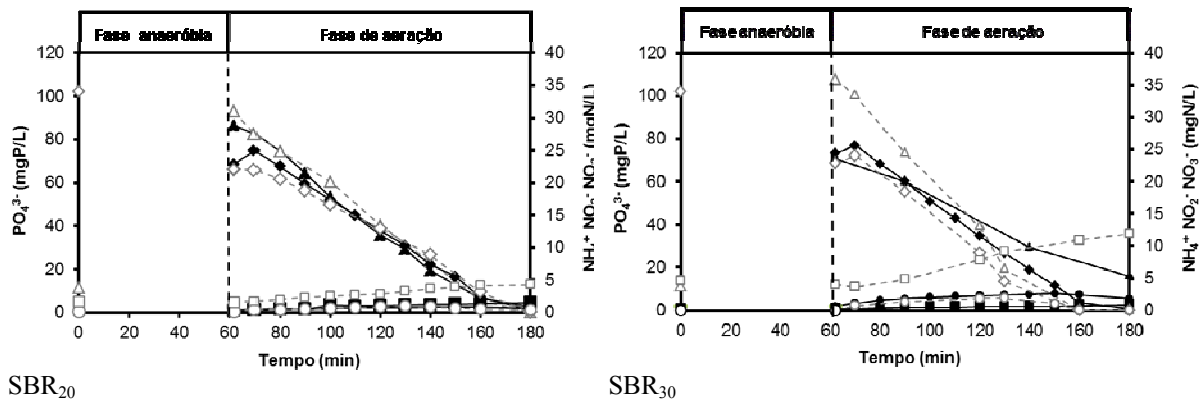


Figura 4.9: Testes de ciclo realizados nos SBR durante diferentes fases operacionais: fosfato (\blacktriangle), amônio (\blacklozenge), nitrito (\bullet) e nitrato (\blacksquare) nas fases A1 (SBR₂₀) e A2 (SBR₃₀); fosfato (Δ), amônio (\diamond), nitrito (\circ) e nitrato (\square) nas fases B1 (SBR₂₀) e B2a (SBR₃₀). As concentrações de amônio e fosfato mostradas no início do ciclo (tempo 0) foram calculadas com base na concentração afluyente (60 mgNH₄⁺-N/L e 20 mgPO₄³⁻-P/L) e na diluição no reator. As concentrações de nitrito e nitrato representadas no tempo 0 foram calculadas levando-se em consideração suas respectivas concentrações no final do ciclo e a diluição no reator após o mesmo ter sido alimentado. Medições ao longo da fase anaeróbia não foram possíveis devido à não homogeneização do conteúdo do reator.

Tabela 4.3: Resultados obtidos nos testes de ciclo conduzidos em condições normais de operação em ambos os sistemas de lodo granular aeróbio.

| Reator | Fase ^a | Taxa de consumo de fosfato (mgPO ₄ ³⁻ -P/(gSSV·h)) | Taxa de consumo de amônio (mgNH ₄ ⁺ -N/(gSSV·h)) | Taxa de desnitrificação (mgNO _x -N/(gSSV·h)) ^b |
|-------------------|-------------------|--|--|--|
| SBR ₂₀ | A1 | 3,5 | 1,0 | 1,0 |
| | B1 | 3,9 | 0,9 | 1,2 |
| SBR ₃₀ | A2 | 2,3 | 1,3 | 0,9 |
| | B2a | 5,9 | 1,5 | 1,3 |
| | B2b | 4,8 | 1,2 | 1,5 |

^a Indica a fase experimental durante a qual o teste de ciclo foi realizado

^b NO_x = NO₂⁻ or NO₃⁻

Os testes de ciclo mostraram que os perfis de concentração de fosfato, amônio, nitrito e nitrato foram bastante similares durante a operação do SBR₂₀, em estado estacionário, nas fases A1 e B1 (Figura 4.9a). No SBR₃₀, a estratégia adotada na fase B2a na qual o lodo em excesso passou a ser removido majoritariamente do topo do leito de lodo para favorecer os PAO em detrimentos aos GAO, ocasionou um aumento considerável na taxa específica de consumo de fosfato (Tabela 4.3). As taxas específicas de consumo de amônio foram maiores no SBR₃₀ em comparação com as obtidas no SBR₂₀. Conforme mostrado na Figura 4.9b, o amônio foi completamente oxidado em até 20 min antes do fim do ciclo do SBR₃₀ durante a operação em estado estacionário na

Fase B2a. Ademais, nesse período uma quantidade considerável de nitrato (em torno de 12 mgN/L) foi detectada no efluente. A redução da concentração de OD de 1,8 para 1,3 mgO₂/L, objetivando o aumento da zona anóxica e por conseguinte da capacidade de desnitrificação, ocasionou um leve decréscimo na taxa de nitrificação (Tabela 4.3). Por outro lado, a taxa de desnitrificação aumentou e, conseqüentemente, menor foi o acúmulo de nitrato observado no efluente.

A concentração de PHA também foi determinada ao longo dos testes de ciclo. Polihidroxibutirato (PHA) foi a principal forma de PHA (80%), embora polihidroxivalerato (PHV) também foi detectado em pequenas proporções (20%). Levando em consideração somente a principal fração de PHA, isto é, PHB, sua concentração diminuiu de aproximadamente 6,0 para 4,5% do total de sólidos durante o período de aeração em ambos os SBR.

O controle do TRS em ambos os reatores resultou em concentrações de biomassa de 10 a 14 gSSV/L. A densidade, diâmetro médio e velocidade de sedimentação dos grânulos do topo e base do leito de lodo estão mostrados na Tabela 4.4. Em geral, o diâmetro e a densidade dos grânulos do topo e da base do leito de lodo aumentaram da fase A1 para a fase B1 no SBR₂₀ e da fase A2 para a fase B2a no SBR₃₀. Observou-se que o aumento desses parâmetros foi mais pronunciado na biomassa da base do leito de lodo. Quando os PAO foram arrastados do SBR₂₀ e SBR₃₀ nas fases C1 e C2, respectivamente, a densidade dos grânulos do topo e da base do reator foi consideravelmente diminuída. A velocidade de sedimentação dos grânulos provenientes da base do leito de lodo foi bastante superior àquela apresentada pelos grânulos do topo do mesmo, uma vez que os primeiros apresentavam maior diâmetro e densidade.

Tabela 4.4: Densidade, diâmetro médio e velocidade de sedimentação dos grânulos do topo e da base do leito de lodo dos SBR.

| Parâmetro | SBR ₂₀ | | | | | | SBR ₃₀ | | | | | |
|--|-------------------|---------|---------|---------|----------|---------|-------------------|---------|---------|---------|----------|---------|
| | Fase I | | Fase II | | Fase III | | Fase I | | Fase II | | Fase III | |
| | Topo | Base | Topo | Base | Topo | Base | Topo | Base | Topo | Base | Topo | Base |
| Densidade (g/L) | 1003±2 | 1008±4 | 1004±3 | 1010±5 | 1001±2 | 1004±5 | 1004±2 | 1005±3 | 1004±1 | 1008±4 | 1001±2 | 1003±2 |
| Diâmetro médio (mm) | 0,6±0,1 | 0,7±0,1 | 0,7±0,2 | 1,0±0,3 | 0,6±0,3 | 0,9±0,2 | 0,7±0,1 | 0,7±0,2 | 0,6±0,2 | 0,9±0,3 | 0,5±0,1 | 0,8±0,1 |
| Reynolds ¹ | 0,6 | 1,8 | 1,1 | 6,3 | 0,3 | 2,3 | 2,4 | 2,7 | 1,5 | 7,6 | 0,6 | 3,2 |
| Número de Arquimedes | n.c. | 32,4 | 19,1 | 114,0 | n.c. | 41 | 40,5 | 49,0 | 17,4 | 137,4 | n.c. | 57,3 |
| Velocidade de sedimentação calculada (m/h) | 3,3 | 20,2 | 15,1 | 50,6 | 1,9 | 37,1 | 39,4 | 41,6 | 15,4 | 48,4 | 3,2 | 39,0 |

¹ Para $Re < 1$, utilizou-se a lei de Stokes para calcular a velocidade de sedimentação dos grânulos; para $Re > 1$, a velocidade de sedimentação foi calculada levando-se em consideração o número de Arquimedes, conforme descrito no item Materiais e Métodos.

n.c. Não calculado.

4.3.4. Experimentos em batelada em condições anóxicas e testes de ciclo em condições completamente anóxicas ou aeróbias

Durante a operação normal dos reatores, o consumo de fosfato em condições aeróbias e anóxicas ocorre de forma simultânea em diferentes regiões dos grânulos. Dessa forma, não é possível se obter diretamente qual a fração de fosfato consumida em cada região. Nesse contexto, foram conduzidos experimentos em batelada e testes de ciclo em condições anóxicas, justamente para a determinação da máxima capacidade de consumo anóxico de fosfato. Esses experimentos são importantes, por exemplo, para estimar o quão significativa é a remoção anóxica de fosfato ligada à remoção de nitrogênio (desfosfatação desnitrificante) realizada por PAO desnitrificantes (DPAO).

Os testes anóxicos em batelada foram também conduzidos com o objetivo de identificar a rota metabólica da desnitrificação, isto é, verificar se a desnitrificação estava ocorrendo pela rota do nitrito ou do nitrato em condições normais de operação. Além disso, a identificação dos principais organismos responsáveis pela redução de nitrito e/ou nitrato no reator (DPAO ou DGAO) estava entre os objetivos desses experimentos. A Tabela 4.5 resume os resultados obtidos nessa série de experimentos realizados com biomassa provenientes de ambos os reatores. Os perfis de concentração estão mostrados nas Figuras 4.10 e 4.11.

Tabela 4.5: Taxa de desnitrificação (taxa de redução de nitrito/nitrato), taxa de consumo anóxico de fosfato e razão entre consumo anóxico de fosfato e nitrogênio removido (P/N) nos experimentos em batelada mantidos em condição anóxica.

| | Fase ^a | Redução de nitrito/nitrato (taxa de desnitrificação) (mgNO _x -N/(gSSV·h)) ^b | | Taxa de remoção de fosfato (mgPO ₄ ³⁻ -P/(gSSV·h)) ^b | | Razão P/N | |
|----------------------|-------------------|---|------------------------------|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ |
| Acceptor de elétrons | | | | | | | |
| SBR ₂₀ | B1 | 2,0 | 6,3 | 1,2 | 2,7 | 0,6 | 0,4 |
| | C1 | 2,5 | 5,6 | 0,2 | 0,17 | 0,1 | 0,03 |
| SBR ₃₀ | B2a | 2,8 | 4,9 | 1,4 | 1,6 | 0,5 | 0,3 |
| | C2 | 2,5 | 5,9 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,04 |

^a Indica a fase durante a qual biomassa foi coletada

^b NO_x = NO₂⁻ ou NO₃⁻

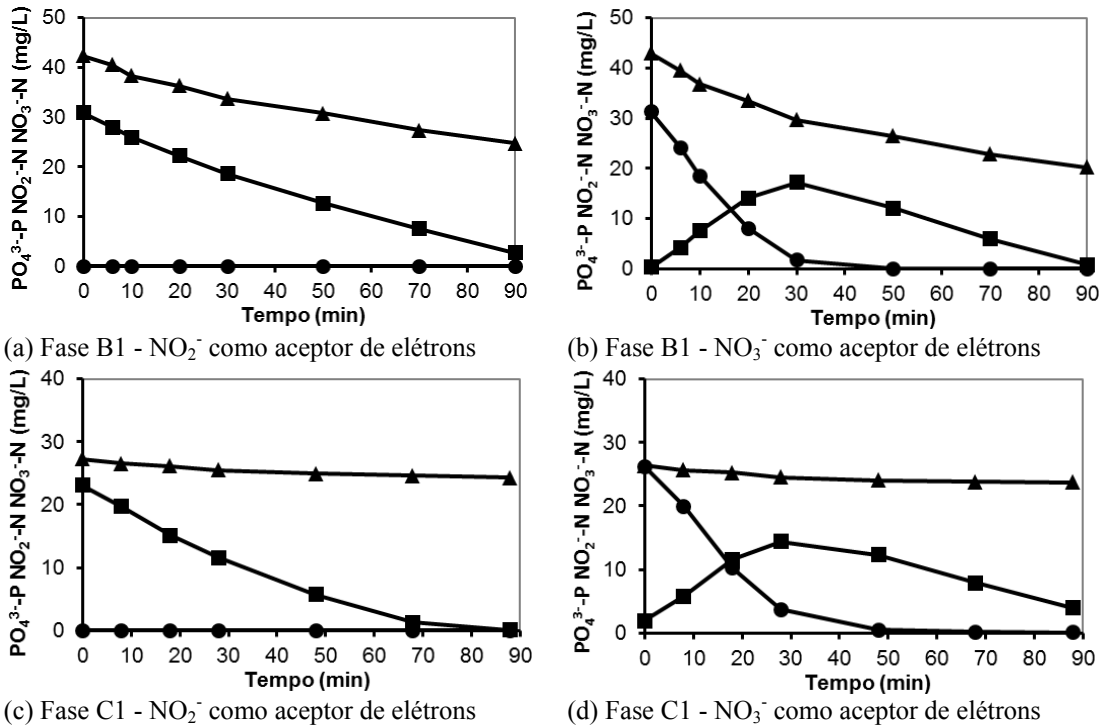


Figura 4.10: Perfis de concentração de fosfato (▲), nitrito (■) and nitrato (●) obtidos nos experimentos em batelada em condições anóxicas com biomassa proveniente do SBR₂₀. Os testes foram realizados com dosagem de nitrito ou nitrato.

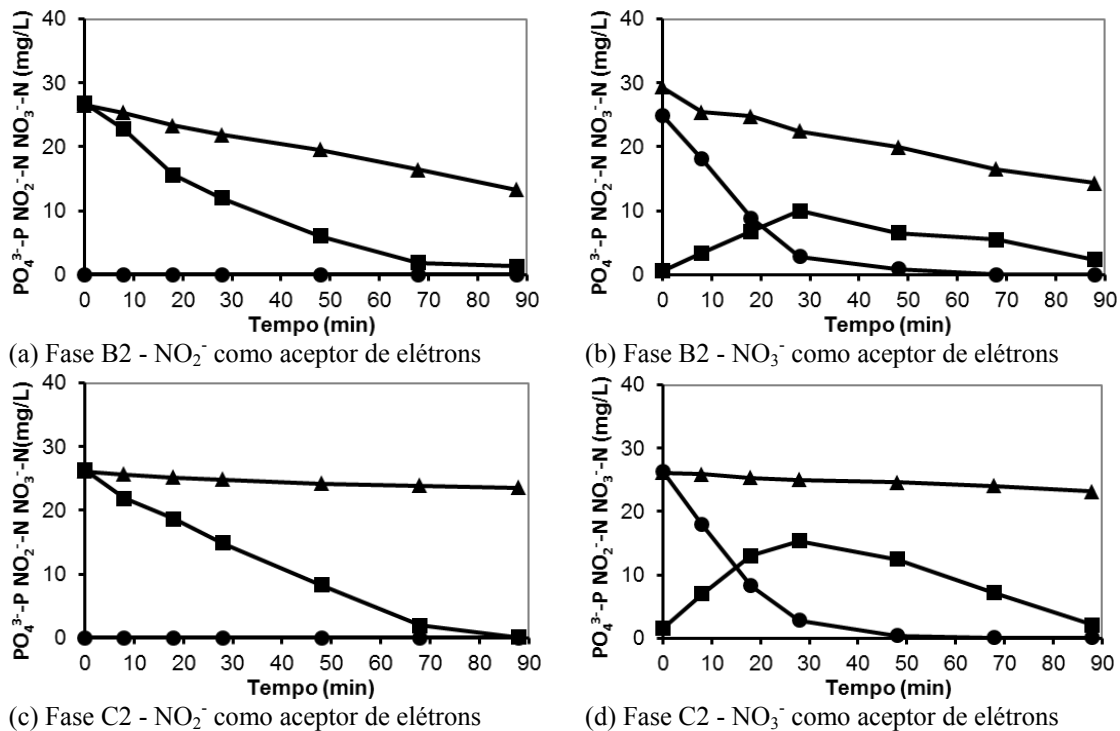


Figura 4.11: Perfis de concentração de fosfato (▲), nitrito (■) and nitrato (●) obtidos nos experimentos em batelada em condições anóxicas com a biomassa proveniente do SBR₃₀. Os testes foram realizados com dosagem de nitrito ou nitrato.

Nos experimentos com biomassa coletada do SBR₂₀ durante a fase B1, a taxa de consumo anóxico de fosfato com nitrato funcionando como aceptor de elétrons foi maior do que aquela obtida com nitrito (Tabela 4.5). Nos testes com biomassa coletada do SBR₃₀ durante a fase B2a, a taxa de consumo anóxico de fosfato obtida com nitrito ou nitrato como aceptor de elétrons foi similar. A razão entre a taxa de consumo anóxico de fosfato e a taxa de redução de nitrogênio (P/N) foi bastante similar nos experimentos realizados com biomassa do SBR₂₀ e SBR₃₀ durante as fases B1 e B2a, respectivamente. A taxa de redução de nitrato foi sempre superior à taxa de redução do nitrito nos experimentos usando biomassa de ambos os reatores. Esse resultado sugere que o processo de desnitrificação ocorreu predominantemente pela rota do nitrato, embora PAOII (sem capacidade de reduzir nitrato) tenha sido o único subtipo de PAO presente no SBR₃₀ e o subtipo dominante desses organismos no SBR₂₀ durante o período de realização dos testes, conforme será descrito no item 4.3.5.

Para investigar a capacidade desnitrificante de GAO, o mesmo tipo de experimentos foi realizado quando PAO foram removidos de ambos os sistemas (Fase C1 no SBR₂₀ e fase C2 no SBR₃₀). Conforme esperado, a taxa de consumo de fosfato tanto com nitrito quanto com nitrato foi praticamente desprezível, uma vez que apenas poucas células de PAO foram detectadas por meio da técnica de FISH nessas fases experimentais (Figura 4.8). A taxa de redução de nitrato foi superior ao dobro da taxa de redução de nitrito (Tabela 4.5), resultado similar ao obtido nos experimentos anóxicos em batelada nos quais se utilizou biomassa composta por PAO e GAO. Isso, de fato, também sugeriu que o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas ocorreu principalmente pela rota do nitrato no período em que os GAO dominaram a comunidade microbiana.

Outra série de experimentos, denominados de testes de ciclo anóxicos, também foi realizada. Nesses experimentos, realizados no próprio reator, somente gás nitrogênio foi fornecido aos sistemas durante a fase de mistura para assegurar condições anóxicas. Os testes de ciclo mantidos em condições anóxicas foram realizados quando os PAO e GAO coexistiram em ambos os reatores (fase B1 no SBR₂₀ e fase B2a no SBR₃₀) e também durante o regime no qual os GAO corresponderam a mais de 95% da população microbiana (fase C1 no SBR₂₀ e fase C2 no SBR₃₀).

Diferentemente dos testes anóxicos em batelada, nos testes de ciclo anóxicos, nitrito e nitrato não foram dosados na forma de pulso, mas de forma gradual. A dosagem foi baseada na taxa de desnitrificação observada durante o período de aeração

do reator em condições normais de operação. Esse procedimento de dosagem gradual, na verdade, se assemelha mais ao que acontece durante a operação convencional dos sistemas, durante a qual nitrito e nitrato são formados gradualmente com o decorrer do processo de nitrificação. Experimentos adicionais nos quais o acceptor de elétrons (nitrito ou nitrato) foi dosado a uma taxa equivalente ao dobro da taxa de desnitrificação também foram realizados. A Tabela 4.6 resume os resultados obtidos nesse conjunto de experimentos e a Figura 4.12 apresenta os perfis de concentração dos compostos envolvidos.

Tabela 4.6: Taxa de dosagem de nitrito/nitrato, taxa de redução de nitrito/nitrato, taxa de consumo anóxico de fosfato e razão entre consumo anóxico de fosfato e nitrogênio reduzido (P/N) nos testes de ciclo anóxicos em ambos os SBR durante o período no qual os PAO e os GAO coexistiram (fase B1 no SBR₂₀ e fase B2a no SBR₃₀) e quando os PAO foram removidos de ambos os sistemas (fase C1 no SBR₂₀ e fase C2 no SBR₃₀).

| Aceptor de elétrons | Taxa de dosagem de NO ₂ ⁻ ou NO ₃ ⁻ (mgNO _x -N/(gSSV·h)) | Taxa de redução de NO ₂ ⁻ ou NO ₃ ⁻ (mgNO _x -N/(gSSV·h)) ^a | | Taxa de remoção de fosfato (mgPO ₄ ³⁻ -P/(gSSV·h)) | | Razão P/N | |
|---------------------|---|--|------------------------------|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ |
| SBR ₂₀ | 1,3 ^b | 1,2 | 1,2 | 2,2 | 3,0 | 1,7 | 2,5 |
| (Fase B1) | 2,6 ^c | 1,9 | - | 3,5 | - | 1,8 | - |
| SBR ₂₀ | 1,5 ^b | 1,4 | 1,4 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| (Fase C1) | 3,0 ^c | 2,6 | 2,6 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,1 |
| SBR ₃₀ | 1,5 ^b | 1,3 | 1,2 | 3,4 | 3,4 | 2,5 | 2,7 |
| (Fase B2a) | 3,0 ^c | 2,5 | - | 3,8 | - | 1,5 | - |
| SBR ₃₀ | 1,3 ^b | 1,2 | 1,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| (Fase C2) | 2,6 ^c | 2,5 | 2,5 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |

^a A taxa de redução de NO₂⁻ ou NO₃⁻ representa a taxa de desnitrificação obtida nos testes de ciclo anóxicos; NO_x = NO₂⁻ or NO₃⁻

^b Dosagem equivalente à taxa de desnitrificação observada durante a operação em condições normais de operação

^c Dosagem (somente de nitrito) equivalente a duas vezes a taxa de desnitrificação observada durante a operação em condições normais de operação.

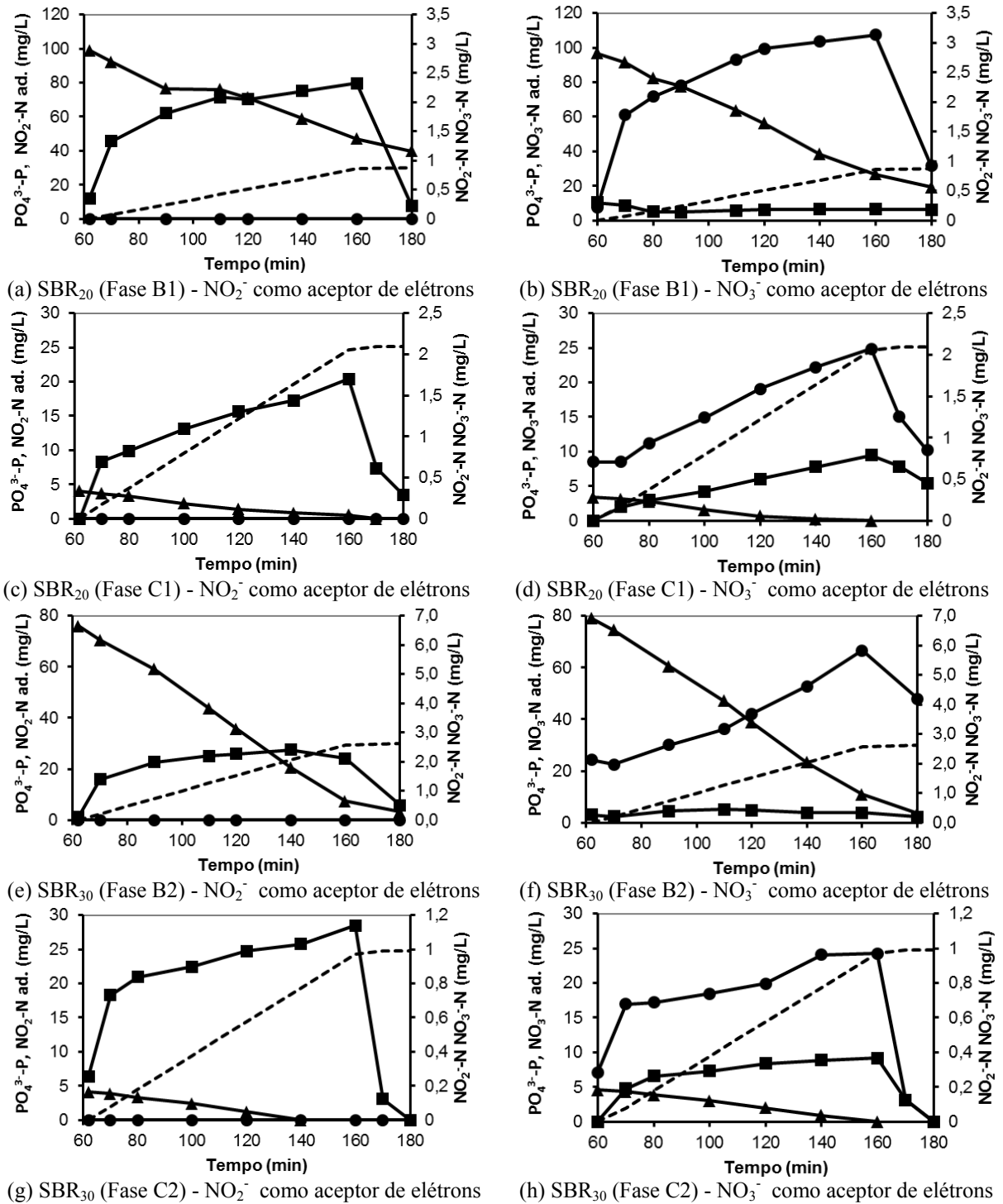


Figura 4.12: Testes de ciclo realizados em condições anóxicas no SBR₂₀ (Fases B1 e C1) e SBR₃₀ (Fases B2a e C2). Phosphate (▲) no eixo-y esquerdo, nitrito (■) e nitrato (●) no eixo-y direito. A linha tracejada representa a adição de nitrito ou nitrato (eixo-y esquerdo). Os resultados dos experimentos nos quais nitrito ou nitrato foram dosados a uma taxa equivalente a duas vezes a taxa de desnitrificação observada em condições normais de operação não estão mostrados. Ad.: adicionado.

No SBR₂₀, no qual o subtipo PAOII foi dominante e o subtipo PAOI esteve presente em pequenas proporções (fase B1), o consumo anóxico de fosfato com nitrato foi maior do que aquele obtido com nitrito. Entretanto, nos experimentos anóxicos realizados no SBR₃₀ durante a fase B2a, o consumo de fosfato foi o mesmo independentemente do aceptor de elétrons adicionado.

Quando a dosagem de nitrito foi duas vezes superior à taxa de produção do mesmo observada durante a operação normal e estimada a partir da taxa de desnitrificação, pouco acúmulo de nitrito foi observado (dados não mostrados). Nesse teste, em particular, a taxa de consumo de fosfato aumentou em ambos os reatores. Esse resultado, combinado com o fato de que o PHB intracelular ainda estava disponível no final dos testes de ciclo anóxicos, sugeriu que a remoção de fosfato em condições anóxicas esteve limitada pelo fornecimento de nitrito no teste em que a dosagem do mesmo foi igual à taxa de desnitrificação.

O mesmo tipo de experimentos foi realizado após os PAO terem sido removidos de ambos os reatores (fase C1 no SBR₂₀ e fase C2 no SBR₃₀). Como já esperado, a taxa de remoção de fosfato tanto com nitrito quanto com nitrato como aceptores de elétrons foi muito pequena (em torno de $0,2 \text{ mgPO}_4^{3-}\text{-P}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$). Quando nitrito ou nitrato foi dosado de acordo com a taxa de desnitrificação obtida em condições normais de operação, nenhum acúmulo dos mesmos foi observado, uma vez que eles foram completamente desnitrificados. Quando nitrito ou nitrato foi dosado a uma taxa equivalente a duas vezes a taxa de desnitrificação, nenhuma diferença foi observada entre a taxa de redução de nitrito e a taxa de redução de nitrato. Além disso, pouco acúmulo de nitrito e nitrato foi observado em ambos os reatores.

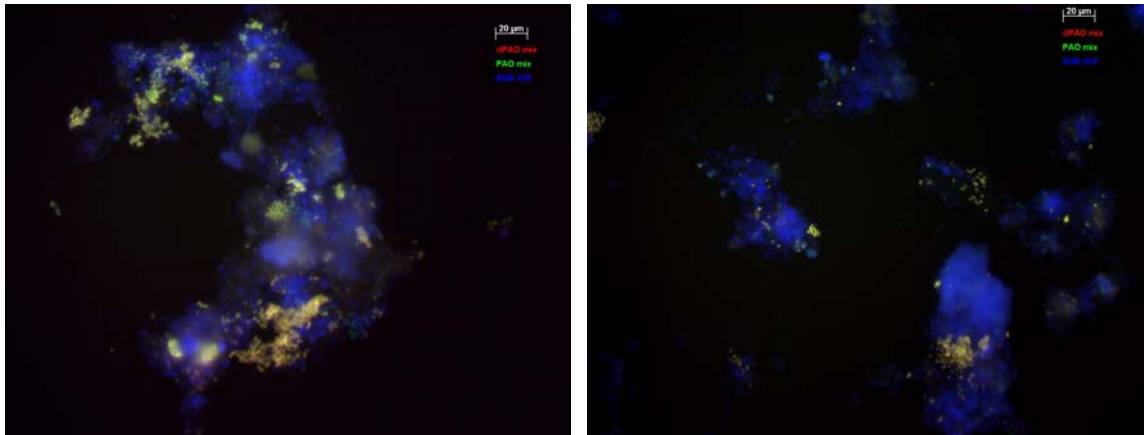
Além dos experimentos em condições anóxicas, testes de ciclo foram realizados em cada sistema em condições aeróbias, sendo a concentração de OD mantida em 100% em relação à saturação do ar. Esses testes foram realizados durante a operação, em estado pseudo-estacionário, nas fases B1 (SBR₂₀) e B2b (SBR₃₀). As taxas de remoção de fosfato obtidas no SBR₂₀ e SBR₃₀ foram de, respectivamente, 9,6 e 7,9 $\text{mgPO}_4^{3-}\text{-P}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$, enquanto a taxa de remoção de amônio aumentou para 1,6 e 2,2 $\text{mgNH}_4^+\text{-N}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$, respectivamente. As taxas de desnitrificação diminuíram de forma considerável quando comparadas com aquelas obtidas em condição normal de operação em baixas concentrações de OD, apresentando valores de 0,7 e 0,4 $\text{mgNO}_x/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$ ($\text{NO}_x = \text{NO}_2^-$ and NO_3^-) para o SBR₂₀ e SBR₃₀, respectivamente.

4.3.5. Caracterização geral da comunidade microbiana por meio da técnica de FISH

Diversas sondas oligonucleotídicas, descritas na Tabela 4.2, foram utilizadas na análise de FISH para observar as populações microbianas dominantes no SBR₂₀ e SBR₃₀ durante as fases experimentais. Os resultados dessa análise indicaram que a maioria das bactérias presentes em ambos os SBRs durante todas as fases de operação pertenceram aos grupos dos PAO ou GAO (Figuras 4.5 e 4.6). A presença de organismos heterotróficos foi mínima, uma vez que todo acetato foi consumido durante a fase anaeróbia pelos PAO e GAO, fazendo com que o carbono orgânico não estivesse presente na fase aeróbia.

A distribuição de PAO e GAO não variou muito no SBR₂₀ da fase A1 para a fase B1, embora a fração de PAO tenha aumentado consideravelmente da fase A2 para fase B2a no SBR₃₀. O aumento da população de PAO no SBR₃₀ foi especialmente observado após a remoção do excesso de lodo principalmente do topo do leito de lodo, dominado por GAO.

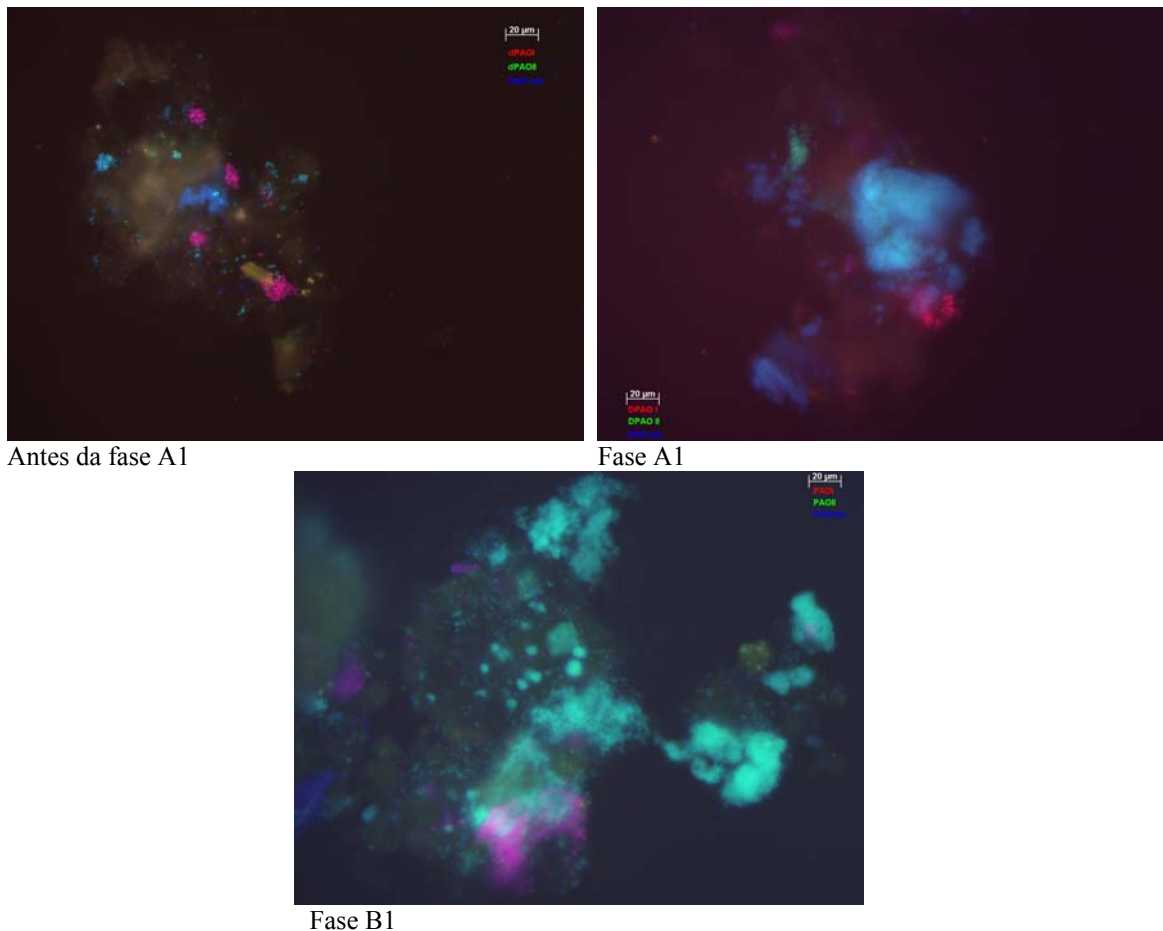
Com auxílio da técnica de FISH, igualmente observou-se completa sobreposição da mistura das populações de PAOI/PAOII e da população total de PAO (Figura 4.13). Esse resultado indicou que toda a população de PAO em ambos os sistemas foi composta pelos subgrupos PAOI e/ou PAOII. No SBR₂₀, a população de PAO foi composta pelos subgrupos PAOI e PAOII, embora PAOII tivesse sido dominante, especialmente na fase B1 (Figura 4.14). No SBR₃₀, a presença de PAOI foi somente detectada na fase A2, na qual esse reator foi inoculado com biomassa do SBR₂₀. Já durante as fases B2a e B2b, somente o subtipo PAOII esteve presente (Figura 4.15). Na fase C1 (SBR₂₀) e fase C2 (SBR₃₀), período no qual os PAO foram removidos praticamente de forma integral dos dois sistemas, os GAO representaram mais que 95% da população microbiana (Figura 4.8). Bactérias oxidadoras de amônio (AOB) e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) representaram apenas uma pequena fração de toda comunidade bacteriana ao longo de todo o período experimental (Figura 4.16).



SBR₂₀ (temperatura ambiente: 20°C)

SBR₃₀ (30°C)

Figura 4.13: Análise por FISH da população de PAOI+PAOII (DPAOmIX) entre toda população de PAO no SBR₂₀ (fase B1) e SBR₃₀ (fase B2a). A combinação PAOI+PAOII é mostrada em vermelho; a combinação PAOmIX é mostrada em verde; a combinação EUB338mix é mostrada em azul. A cor amarela é devido à superposição da cor vermelha (PAOI+PAOII) e verde (PAOmIX).

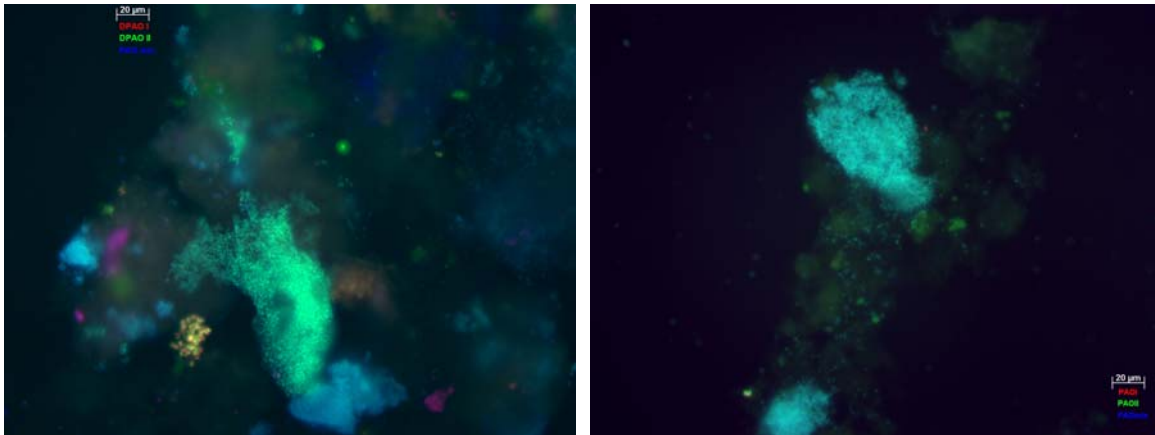


Antes da fase A1

Fase A1

Fase B1

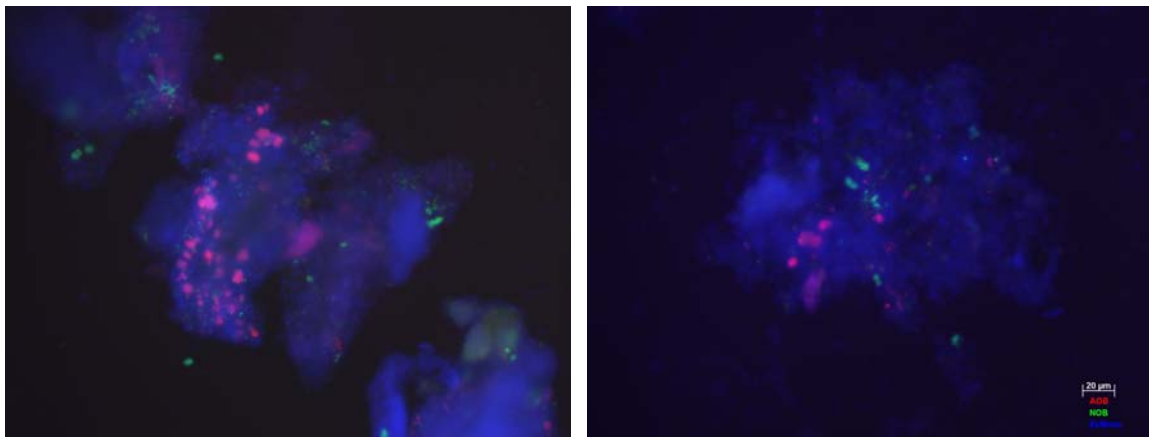
Figura 4.14: Análise por meio da técnica de FISH da população de PAOI/PAOII entre toda população de PAO no SBR₂₀ durante o período de partida desse sistema e durante as fases A1 e B1. PAOI (Acc-I-444) mostrado em vermelho; PAOII (Acc-II-444) mostrado em verde; PAOmIX (PAO462, PAO462 e PAO846) mostrado em azul.



Fase A2

Fase B2

Figura 4.15: Análise, por meio da técnica de FISH, da população de PAOI/PAOII entre toda população de PAO no SBR₃₀ durante as fases A2 e B2a. PAOI (Acc-I-444) mostrado em vermelho; PAOII (Acc-II-444) mostrado em verde; PAOmix (PAO462, PAO462 e PAO846) mostrado em azul.



SBR₂₀ – Phase B1

SBR₃₀ – Phase B2

Figura 4.16: Fração de AOB (Nso1225/Nso190/Neu653, mostrada em vermelho) e de NOB (Ntspa662/Nit1035, mostrada em verde) entre toda a comunidade bacteriana (EUB338 mix, mostrada em azul) nos grânulos de ambos os reatores.

4.3.6. Propriedades físicas dos grânulos aeróbios

O diâmetro médio dos grânulos aumentou de 0,68 mm (Fase A1) para 0,83 mm (Fase B1) no SBR₂₀. Da fase A1 para a fase B1, a área superficial total dos grânulos diminuiu de 5,1 para 4,2 m², enquanto que a fração de volume disponível para a nitrificação diminuiu de 16,5 para 13,6%. No SBR₃₀, o diâmetro médio dos grânulos aumentou de 0,72 mm (Fase A2) para 0,79 (Fase B2a) e a fração de volume para a nitrificação permaneceu constante e equivalente a 15%. Nesse reator, entretanto, a área superficial dos grânulos aumentou levemente da fase A2 para a fase B2a de 4,2 para 5,2

m². Esse fato está provavelmente associado à maior taxa de remoção de amônio obtida nessa última fase.

4.4. Discussão

4.4.1. Fatores controladores da competição entre PAO e GAO

Os GAO são geralmente relacionados com a deterioração de sistemas de remoção biológica de fósforo, uma vez que eles competem com os PAO pela matéria orgânica disponível, mas não contribuem para a remoção de fosfato (OEHMEN et al., 2006a). Estudos reportam que altas temperaturas favorecem o crescimento de GAO em detrimento ao de PAO (LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2009). De fato, a remoção de fosfato no reator operado a 20°C foi maior do que aquela observada no reator mantido a 30°C. A razão entre a quantidade de fosfato liberada e o consumo de material orgânico (P-mol/C-mol) pode ser usada para estimar a quantidade de matéria orgânica (em termos de DQO) consumida por PAO e GAO em condições anaeróbias (fase de alimentação dos reatores). Em culturas altamente enriquecidas com PAO, essa razão seria algo em torno de 0,5 P-mol/C-mol. Já em uma cultura pura de GAO, esse valor é nulo (BRDJANOVIC *et al.*, 1997). A menor razão P-mol/C-mol observada no reator operado a 30°C ($0,22 \pm 0,08$) em comparação com aquela obtida no 20°C ($0,37 \pm 0,05$) indicou uma menor contribuição dos PAO no consumo anaeróbio de substrato a 30°C. Ademais, a razão entre a liberação de fosfato e consumo de matéria orgânica observada em ambos os sistemas indicou que uma quantidade significativa de acetato foi consumida por outras bactérias que não PAO. Esses organismos se referem aos GAO.

A segregação da biomassa ao longo do leito de lodo, na qual os PAO estiveram concentrados na base do leito enquanto os GAO situaram-se preferencialmente no topo do mesmo, abriu a possibilidade de influenciar a competição entre esses organismos. A remoção seletiva do lodo em excesso principalmente da parte superior do leito de lodo propiciou a diminuição do tempo de retenção da biomassa representada por GAO, e, por conseguinte, possibilitou a obtenção de remoção completa de fosfato no reator operado a 30°C. Em adição, levou ao aumento da razão entre fosfato liberado e matéria orgânica consumida para 0,4 P-mol/C-mol, valor comparável àquele obtido no SBR₂₀. Aliado a esse fato, o aparecimento de grânulos de cor branca no SBR₃₀, nos quais a população de PAO correspondeu a mais de 90% da comunidade microbiana, também contribuiu para

que fossem obtidas maiores taxas de remoção de fosfato e maiores razões entre a quantidade de fosfato liberado e a quantidade de matéria orgânica consumida em comparação com aquelas obtidas no SBR₂₀.

A estratégia utilizada para influenciar a competição entre PAO e GAO durante a remoção do lodo em excesso, já sugerida em trabalho anterior (WINKLER *et al.*, 2011a), provou ser um bom método para favorecer o desenvolvimento e crescimento de PAO em reatores nos quais exista segregação de biomassa (tal como observada nesse estudo) e que sejam operados em condições desfavoráveis para o processo de remoção biológica de fósforo, tais como altas temperaturas (iguais ou superiores a 30°C). Em temperaturas menores, tais como 20°C, essa estratégia não é crucial, conforme observado durante a operação do SBR₂₀. Naquele sistema, em particular, remoção completa de fosfato foi obtida mesmo quando o lodo em excesso foi removido durante a fase de aeração, durante a qual a biomassa está distribuída uniformemente por todo o volume reacional, e conseqüentemente, a remoção de PAO e GAO é realizada na mesma proporção. A remoção seletiva de lodo proposta também acarreta no aumento da atividade dos PAO, tendo em vista que a alimentação é realizada a partir da base do reator, região onde esses organismos são dominantes. Conseqüentemente, esses organismos possuem a vantagem de receber mais substrato do que GAOs.

É importante ressaltar que, em estudo prévio envolvendo a operação de um reator de lodo granular similar (WINKLER *et al.*, 2011a), nenhuma fração do lodo foi removida da base do reator, rica em PAO. Isso leva a um elevado tempo de retenção dos grânulos da base do reator e, conseqüentemente, os PAO se tornarão completamente cheios de polifosfato devido à diminuição do rendimento efetivo de lodo, o que pode limitar a remoção de fosfato. Na pesquisa conduzida previamente, esse fato foi negligenciado, deixando essa questão em aberto para a implementação da estratégia proposta. Nesse cenário, foi mencionado que eventualmente seria necessário remover parte do lodo presente na base do leito de lodo para evitar valores extremos de TRS nessa porção do sistema, e também para remover polifosfato do sistema. Um elevado valor de TRS na base do reator iria acarretar em uma fração significativa de material inerte nessa biomassa, em particular, o que obviamente não é desejável. Em primeiro lugar, alto conteúdo desses materiais inertes iria levar a grânulos significativamente pesados e provavelmente iria acarretar em problemas de mistura durante a fase de aeração. É bastante provável que os grânulos contendo esses elevados índices de material inorgânico se tornariam demasiadamente grandes e a área superficial

disponível para crescimento de organismos aeróbios, tais como PAO, AOB e NOB, iria sofrer um decréscimo significativo.

Levando-se em consideração todos esses fatores, a remoção seletiva de lodo a partir de partes específicas do leito de lodo foi modificada nesse estudo em relação à aplicada na pesquisa anterior (WINKLER *et al.*, 2011a). Nesse contexto, embora a remoção de lodo em excesso tenha sido realizada principalmente a partir do topo do leito de lodo, rico em GAO, uma porção pequena (20% do lodo em excesso) foi removida da base do leito de lodo, dominada por PAO. Esse procedimento de renovação de biomassa da base do reator, além de não ocasionar problemas à remoção de fosfato, permitiu a obtenção de menor quantidade de materiais inertes na biomassa em comparação com o estudo prévio, e evitou a deterioração da remoção de fosfato que poderia vir a ocorrer durante a longa operação do reator.

Nessa pesquisa, optou-se por remover 80% do lodo em excesso do topo e 20% da base do leito de lodo. Entretanto, para aplicações em larga escala, é bastante provável que a proporção de lodo a ser removida de diferentes partes do reator deva ser controlada em função do desempenho do reator. Sendo assim, as proporções podem variar periodicamente. Essa questão deve ser estudada e testada em maiores detalhes em pesquisas envolvendo a operação de reatores em escala piloto e industrial.

Apesar de que os GAO são usualmente considerados organismos indesejados no processo de remoção biológica de fosfato, nesse trabalho foi obtida remoção completa de fosfato com uma cultura mista de micro-organismos na qual PAO e GAO coexistiram. Sob a ótica de processo, os GAO também contribuem para a remoção de matéria orgânica e podem igualmente apresentar papel importante na desnitrificação, conforme será discutido posteriormente.

4.4.2. Relação entre os principais fatores que influenciam a segregação de biomassa no leito de lodo

A ocorrência de segregação da biomassa ao longo do leito de lodo possivelmente está relacionada às diferentes velocidades de sedimentação dos grânulos da base do leito de lodo (dominados por PAO) e do topo do mesmo (dominados por GAO). Na biomassa dominada por PAO, maior conteúdo de polifosfato está presente em comparação com a biomassa dominada por GAO, uma vez que o metabolismo desses últimos micro-organismos não envolve a liberação nem consumo de fosfato.

Em uma primeira análise, a quantidade significativa de polifosfato acumulada nos grânulos da base do leito durante a fase aeróbia foi assumida como responsável pelo maior conteúdo de material inerte e pela maior densidade desses grânulos em comparação com aqueles dominados por GAO, tornando-os mais pesados e contribuindo para melhorar as suas propriedades de sedimentação. Nesse contexto, a biomassa dominada por PAO sedimentou mais rapidamente do que aquela dominada por GAO, e, por isso, passou a acumular na base do leito de lodo (WINKLER *et al.*, 2011a). Em adição, o fato dos grânulos mais pesados, contendo polifosfato, estarem localizados na base do leito de lodo fazem com que os mesmos estivessem mais expostos ao substrato (acetato) alimentado a partir da base do reator. Esse fator, aliado à remoção seletiva de lodo principalmente do topo do leito de lodo, também favoreceu a dominância dos PAO em detrimento aos GAO.

O aparecimento de grânulos de cor branca, completamente dominados por PAO, no reator operado a 30°C (Phase B2a), também está associado ao alto teor de polifosfato presente na biomassa. O desenvolvimento desses grânulos é possivelmente uma consequência do procedimento de remoção de lodo adotado. Uma vez que a maioria do lodo em excesso foi removida do topo do leito de lodo, dominado por GAO, a base do reator poderia ser altamente enriquecida com biomassa contendo PAO. Eventualmente, em alguns grânulos, a fração de PAO era superior que em outros e, por conseguinte, a quantidade de polifosfato nesses grânulos era maior. Isso poderia aumentar a possibilidade de ocorrência de precipitação de fosfato nos grânulos (CARLSSON *et al.*, 1997; MAURER *et al.*, 1999). Outro fator que pode ter contribuído para aumentar a probabilidade de ocorrência de precipitação nos grânulos do SBR₃₀ foi o aumento substancial da liberação de fosfato observada durante a operação na fase B2a. Como consequência da precipitação química, os grânulos podem ter adquirido a cor branca e o teor de inertes dessa biomassa aumentou para em torno de 40%. No entanto, a mudança de cor dos grânulos, os quais passaram de marrom para branco, não é uma prova da ocorrência de maior precipitação em alguns grânulos, embora seja uma indicação da mesma.

Por meio do arraste dos PAO de ambos os sistemas, foi possível entender melhor a relação entre os principais fatores influenciando a segregação de biomassa e com isso obter mais informações a respeito do motivo pela qual os PAO e GAO ocuparam diferentes posições no leito de lodo. Nessas condições, observou-se como a fração de inertes e o teor de polifosfato variaram de um estágio no qual PAO e GAO coexistiram

para outro no qual GAO dominaram completamente a população microbiana. Nesse último estágio, em particular, observou-se que não somente o teor de inertes, mas também a densidade dos grânulos, diminuíram consideravelmente quando os PAO foram removidos do sistema. Isso implica que a segregação PAO/GAO observada ao longo do leito de lodo é primariamente associada aos diferentes teores de polifosfato e, por conseguinte, com os diferentes teores de inertes e densidade dos grânulos dominados por PAO e GAO. Isso, de fato, confirma as expectativas prévias.

É importante ressaltar que a segregação observada nesse estudo parece ser uma tendência em reatores em batelada sequencial operados de forma similar ao realizado nessa pesquisa. Quando uma alimentação em regime *plug-flow* a partir da base do reator é aplicada, a biomassa presente na base possui a vantagem de receber mais substrato, conforme já mencionado, e a chance de ocorrer esse tipo de segregação na qual PAO são dominantes na base e GAO são dominantes no topo do leito de lodo, é ainda maior. Ademais, esse tipo de segregação é mais provável em altas temperaturas, tais como 30°C.

4.4.3. *Nitrificação/desnitrificação e consumo de fosfato em condições aeróbias/anóxicas*

Após a aclimatação da biomassa, foi observada remoção completa de amônio em ambos os sistemas, mesmo em baixas concentrações de oxigênio. A razão pela qual amônio começou a ser detectado no efluente após 40 dias de operação do SBR₂₀ durante a fase B1, sem qualquer mudança nas condições operacionais, pode ser atribuída ao decréscimo da área superficial e, conseqüentemente, à diminuição da fração de volume aeróbio disponível para a nitrificação. Por outro lado, o aumento da taxa de consumo de amônio da fase A1 para a fase B2a no SBR₃₀ está possivelmente relacionado ao aumento da área superficial dos grânulos.

A taxa de consumo anóxico de fosfato obtida nos testes de ciclo anóxicos representou 60 – 70% daquela obtida em um teste de ciclo normal realizado no mesmo período. Esse resultado sugere que uma quantidade considerável de fosfato foi consumida na região anóxica dos grânulos por DPAO, em condições normais de operação dos reatores. A relevância da desfosfatação anóxica para a remoção global de fosfato ficou ainda mais evidente nos testes de ciclo anóxicos, especialmente quando nitrito foi adicionado, como acceptor de elétrons, a uma taxa duas vezes superior à taxa

de desnitrificação obtida em condições normais de operação. Nesses experimentos, a taxa de consumo de fosfato representou 90% (SBR₂₀) e 70% (SBR₃₀) daquela obtida em um ciclo regular mantido a 1,8 mgO₂/L. Entretanto, é importante mencionar que a proporção do consumo anóxico de fosfato em relação ao total (aeróbio + anóxico) em um ciclo regular deve ser menor do que as obtidas nos testes de ciclo anóxicos.

A fração dos PAO que está ativamente realizando a desfosfatação desnitrificante em reatores de lodo granular aeróbio depende da distribuição das zonas aeróbia e anóxica na estrutura granular e da disponibilidade de aceptores de elétrons (nitrito e nitrato). A baixa concentração de OD aplicada em ambos os reatores (1,8 mgO₂/L) possivelmente estimulou o desenvolvimento de PAO desnitrificantes (PAOI e/ou PAOII) por meio do aumento da zona anóxica nos grânulos. Vale mencionar que, durante o período de partida do SBR₂₀, no qual a concentração de OD correspondeu a 100% em relação à saturação do ar (9,1 mgO₂/L a 20°C), outros PAO que não PAOI nem PAOII foram detectados na comunidade microbiana por meio da análise de FISH. Na verdade, a capacidade de desfosfatação desnitrificante desses outros grupos de PAO é desconhecida, podendo os mesmos ser ou não capazes de realizar o consumo anóxico de fosfato acoplado à redução de nitrito/nitrato.

As taxas de consumo anóxico de fosfato são geralmente menores que as respectivas taxas aeróbias (HU *et al.*, 2002a, CHUNG *et al.*, 2006). De fato, nos testes de ciclo realizados em condições puramente aeróbias (concentração de OD fixada em 100% em relação à saturação do ar) durante a operação de ambos os reatores (fase B1 no SBR₂₀ e fase B2b no SBR₃₀), foram obtidas taxas de consumo de fosfato muito superiores àquelas encontradas em condições normais de operação a 1,8 mgO₂/L ou em condições puramente anóxicas. Em altos níveis de OD, a penetração de oxigênio nos grânulos aumenta de forma considerável, o que, por sua vez, causa uma diminuição da camada anóxica dos grânulos e na taxa de desnitrificação. Observou-se que a população de PAO foi representada por PAOI e/ou PAOII em ambos os reatores no período em que foram realizados esses testes. Portanto, todo o consórcio de PAO apresentava capacidade de reduzir nitrito e/ou nitrato. Nesse contexto, a maior taxa de consumo de fosfato obtida em altos níveis de OD comparada com aquela obtida em baixas concentrações desse gás sugere que mesmos os PAO que estiveram, durante a maior parte do tempo, usando somente nitrito e/ou nitrato com aceptor de elétrons na zona anóxica dos grânulos, podem ter consumido fosfato em condições aeróbias

imediatamente após a penetração de oxigênio ter aumentado devido ao acréscimo da concentração de OD.

Ambos os sistemas apresentaram capacidade de desnitrificação superior àquela observada quando a disponibilidade de nitrito/nitrato foi limitada pela taxa de nitrificação. Essa capacidade extra permite que se possa aumentar a concentração de OD no intuito de aumentar a taxa de nitrificação, sem que ocorra a deterioração da desnitrificação. Esses testes nos quais a máxima capacidade de desnitrificação é avaliada em experimentos separado consiste em uma ferramenta bastante útil para o controle do processo e fornece informações extras que podem ser usadas para melhorar tanto as condições de operação quanto o desempenho do reator.

Quando os resultados obtidos nos testes anóxicos são comparados com aqueles obtidos nos experimentos anóxicos em batelada, uma diferença considerável é observada. A taxa de consumo de fosfato e a razão P/N obtidas nos testes anóxicos em batelada são muito menores do que aquelas obtidas nos testes de ciclo anóxicos. Esse resultado pode estar relacionado ao efeito inibitório exercido por altas concentrações de nitrito nos experimentos em batelada, as quais não foram observadas nos testes de ciclo anóxicos. Alguns estudos reportaram que a inibição do consumo anóxico de fosfato por nitrito tem início quando as concentrações do mesmo estão na faixa de 3 a 5 mgNO₂⁻/N/L (MEINHOLD *et al.*, 1999, SAITO *et al.*, 2004). Nos experimentos com adição de nitrito na forma de pulso, a concentração do mesmo chegou a 30 mgN/L, enquanto que naquelas com adição de nitrato, a concentração de nitrito atingiu 20 mgN/L. Esses altos níveis de nitrito não foram observados nos testes de ciclo anóxicos, nos quais a adição de nitrito ou nitrato foi gradual. Com isso, as taxas de consumo anóxico de fosfato observadas nesses últimos experimentos refletem melhor a máxima capacidade de remoção anóxica de fosfato na biomassa granular. Entretanto, os testes anóxicos nos quais nitrito ou nitrato foram dosados na forma de pulso são importantes para observar se a desnitrificação ocorre principalmente pela rota do nitrito ou nitrato por meio da comparação entre as taxas de redução desses dois aceptores de elétrons. Essa informação não é possível de ser obtida a partir dos testes de ciclo anóxicos, nos quais a dosagem de nitrito ou nitrato é realizada de forma gradual. O motivo é que, nesse último caso, a conversão é limitada pela taxa de dosagem.

A taxa de redução de nitrato nos experimentos anóxicos em batelada (Figuras 4.10 e 4.11) foi muito superior que a taxa de redução do nitrito. Nos testes de ciclo realizados em condições normais de operação, o acúmulo de nitrito foi muito inferior

àquele observado para o nitrato. Todas essas observações apontam para uma remoção de nitrogênio tendo nitrato como principal intermediário dos processos de nitrificação e desnitrificação.

4.4.4. PAOI/PAOII e DGAO: implicações nas conversões de nitrogênio e fósforo

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anóxicos em batelada e nos testes de ciclo realizados em condições normais de operação, foi assumido que a desnitrificação ocorreu preferencialmente pela rota do nitrato. Idealmente, PAOI poderia ser selecionado para realizar, de forma simultânea, a redução de nitrato e desfosfatação anóxica. Entretanto, em ambos os sistemas, PAOII (incapaz de utilizar nitrato como acceptor de elétrons) e não PAOI foi o subgrupo dominante de PAO nas fases B1 (SBR₂₀) e B2a (SBR₃₀). No SBR₃₀, em particular, somente PAOII esteve presente no período no qual os testes em batelada anóxicos foram realizados. Essa observação, aliada ao fato de que o consumo de fosfato obtido no teste de ciclo anóxico realizado no SBR₃₀ foi o mesmo independentemente do acceptor de elétrons dosado (nitrito ou nitrato), sugere que outros organismos foram responsáveis pela redução de nitrato a nitrito, podendo esse último ser usado por PAOII como acceptor de elétrons para o consumo anóxico de fosfato.

Muitos organismos heterotróficos podem realizar a desnitrificação utilizando nitrito e/ou nitrato como aceptores de elétrons. Nesse estudo, no entanto, toda a matéria orgânica (acetato) alimentada ao sistema foi completamente consumida durante o período de alimentação anaeróbio por PAO e GAO. Dessa maneira, tendo em vista que não havia a disponibilidade de material orgânico durante a fase de aeração, na qual a desnitrificação ocorria na zona anóxica dos grânulos, a presença de outros organismos heterotróficos que não PAO ou GAO foi mínima, fato também evidenciado pela análise FISH. Com isso, a possível contribuição dessas bactérias heterotróficas desconhecidas para o processo de desnitrificação pode ser desprezada. Os únicos micro-organismos que poderiam realizar a desnitrificação eram aqueles que haviam acumulado polímeros de reserva (tal como PHB) durante a fase de alimentação anaeróbia, isto é, PAO e GAO desnitrificantes (DPAO e DGAO). A ausência de PAOI no SBR₃₀, subgrupo capaz de usar tanto nitrito quanto nitrato como acceptor de elétrons para o consumo anóxico de fosfato, e a dominância de PAOII (sem capacidade de reduzir nitrato) em ambos os

reatores, sugeriu que os DGAO seriam os principais organismos responsáveis pela redução de nitrato a nitrito.

Os testes de ciclo anóxicos nos qual a taxa de dosagem de nitrito foi equivalente ao dobro da taxa de desnitrificação observada em condições normais de operação, também sugeriu que os DGAO apresentaram papel importante na desnitrificação em ambos os sistemas. Apesar da dosagem de nitrito ter sido duas vezes superior àquela realizada nos testes de ciclo anóxicos realizados previamente, a razão P/N permaneceu praticamente a mesma no SBR₂₀ e até mesmo diminuiu no SBR₃₀. Além disso, os experimentos anóxicos em batelada com biomassa do SBR₃₀ (na qual somente o subgrupo PAOII estava presente) mostraram que a taxa de redução de nitrato foi muito superior à taxa de redução de nitrito, apesar de que as taxas de remoção anóxica de fosfato terem sido praticamente a mesma com os dois aceptores de elétrons. Esse resultado confirma que grande parcela da desnitrificação não esteve acoplada com a remoção anóxica de fosfato e sugere que os DGAO estiveram envolvidos na desnitrificação. Entretanto, nenhuma conclusão poderia ser tirada até então, uma vez que ambos os PAO e GAO estavam presentes na comunidade microbiana de ambos os sistemas. Além disso, poucas investigações envolvendo a capacidade desnitrificante de GAO estão reportadas na literatura (ZENG *et al.*, 2003a), repercutindo na necessidade de assuntos relacionados a esse assunto.

Por meio do arraste dos PAO, realizado na fase C1 (SBR₂₀) e fase C2 (SBR₃₀), os GAO passaram a ser os organismos dominantes em ambos os sistemas. O fato de que completa desnitrificação continuou a ser obtida em condições normais de operação sugeriu que os DGAO passaram a ocupar um posto previamente ocupado por PAOII, isto é, a redução de nitrito a gás nitrogênio. Além disso, o fato da redução de nitrato continuar a ser superior à redução de nitrito nos testes anóxicos em batelada sugere que os DGAO foram, na verdade, os principais organismos responsáveis pela redução de nitrato a nitrito, o qual poderia ser finalmente utilizado por PAOII (único subtipo de PAO presente no SBR₃₀ e o subtipo dominante de PAO no SBR₂₀) para o consumo anóxico de fosfato nas fases experimentais anteriores.

Esse fato aponta para uma relação simbiótica entre GAO e PAOII, na qual os GAO reduzem o nitrato e, em menor proporção, o nitrito, tornando nitrito disponível para a população de PAOII (Figura 4.17). O papel principal dos PAOII na conversão de nitrito a gás nitrogênio é suportado pelos testes de ciclo anóxicos, nos quais se observou uma alta razão entre o máximo consumo anóxico de fosfato e o consumo total de fosfato

em condições normais de operação. Entretanto, os DGAO também podem ter participado, em alguma extensão, na conversão de nitrito a gás nitrogênio. Apesar do fato de que todos os experimentos realizados nesse estudo sugerirem que a remoção de nitrogênio por meio do processo de nitrificação/desnitrificação simultâneas tenha ocorrido principalmente pela rota do nitrato, parte do nitrito também pode ter sido diretamente desnitrificado a gás nitrogênio por PAOII, sem ser oxidado a nitrato pelas NOB.

Para a melhoria do desempenho dos processos de lodo granular, certamente seria vantajoso encontrar métodos para estimular essa conversão relativa à nitrificação-desnitrificação baseada na rota do nitrato.

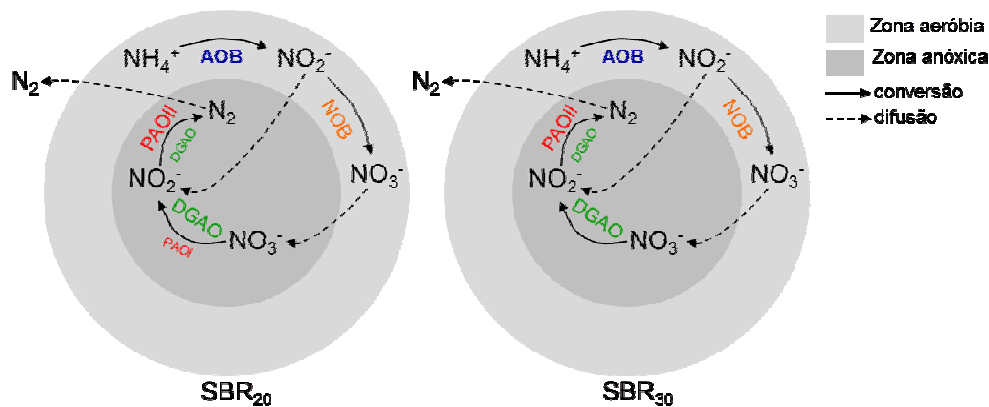


Figura 4.17: Representação esquemática da rota da nitrificação/desnitrificação na estrutura do lodo granular aeróbio no SBR₂₀ e SBR₃₀. Os micro-organismos envolvidos nas diferentes conversões estão indicados em cores diferentes: AOB (azul), NOB (laranja), PAO (vermelho) e GAO (verde).

4.5. Conclusões

Os processos de nitrificação, desnitrificação e remoção de fosfato foram caracterizados em dois reatores de lodo granular aeróbio operados em diferentes temperaturas (20 e 30°C) e submetidos a baixas concentrações de oxigênio dissolvido (menores que 2 mgO₂/L). A segregação da biomassa ofereceu a possibilidade de influenciar a competição entre PAO e GAO conforme desejado. A remoção seletiva da biomassa a partir do topo do leito de lodo do reator, rica em GAO, para obtenção de melhor desempenho do processo de remoção de fosfato, é especialmente relevante em altas temperaturas (iguais ou superiores a 30°C), desfavoráveis para esse processo. A remoção de lodo, em pequenas proporções, a partir da base do leito de lodo, rica em

PAO, não afetou negativamente a remoção de fosfato. Pelo contrário, permitiu a obtenção de biomassa com menor conteúdo de inertes.

Os resultados dessa pesquisa também mostraram que o alto conteúdo de material inerte e a densidade apresentaram relação positiva com a presença de grânulos dominados por PAO e, portanto, com alto conteúdo de polifosfato e alta eficiência de remoção de fosfato. A baixa concentração de oxigênio dissolvido aplicada favoreceu o desenvolvimento de PAO desnitrificantes (DPAO), o que, por sua vez, contribuiu para o aumento da remoção de fosfato acoplada à desnitrificação (desfosfatação desnitrificante). A desnitrificação procedeu principalmente pela rota do nitrato e os DGAO foram os principais organismos responsáveis pela redução de nitrato a nitrito, sendo esse último reduzido a nitrogênio gasoso de forma simultânea ao consumo anóxico de fosfato por PAOII.

Apêndice

$$Ar = \frac{\rho_p - \rho_w}{\rho_w} \cdot d_p^3 \cdot \frac{g}{v_w}$$

$$\Omega = \frac{v_s^3 \cdot \rho_w}{v_w \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_w)}$$

$$v_s = \frac{g}{18} \cdot \frac{\rho_p - \rho_w}{\rho_w} \cdot \frac{d_p^2}{v_w}$$

v_s = velocidade de sedimentação de uma única partícula $\left[\frac{m}{s} \right]$

d_p = diâmetro de partícula $[m]$

ρ_p = densidade de partícula $\left[\frac{kg}{m^3} \right]$

ρ_w = densidade do fluido $\left[\frac{kg}{m^3} \right]$

g = constante gravitacional 9,81 $\left[\frac{m}{s^2} \right]$

v_w = viscosidade cinemática da água $\left[\frac{m^2}{s} \right]$

**Efeito de diferentes estratégias de
adaptação ao sal na diversidade
microbiana, atividade e sedimentação de
lodo nitrificante em reatores em
batelada sequencial**

5. Efeito de diferentes estratégias de adaptação ao sal na diversidade microbiana, atividade e sedimentação de lodo nitrificante em reatores em batelada sequencial

5.1. Introdução

A nitrificação é considerada a etapa limitante do processo de remoção biológica de nutrientes, em grande parte devido à baixa taxa de crescimento dos organismos nitrificantes. As bactérias responsáveis pela nitrificação são também conhecidas pela sua extrema sensibilidade à presença de inibidores, a exemplo de compostos orgânicos (JULIASTUTI *et al.*, 2003), metais pesados (HU *et al.* 2002b; JULIASTUTI *et al.*, 2003; YOU *et al.*, 2009), e altas concentrações de substrato (ANTHONISEN *et al.* 1976).

A nitrificação também é bastante suscetível à inibição por elevados teores de sal. Sal é comumente considerado um fator de instabilidade em diversas plantas de tratamento de águas residuárias, especialmente no âmbito industrial (MOUSSA *et al.*, 2006). Altas concentrações salinas podem ser encontradas em águas residuárias oriundas de indústrias químicas, farmacêuticas, petrolíferas, de processamento de frutos do mar, de couro, de enlatados e de queijo (DAHL *et al.* 1997). O uso de água do mar para descarga em sanitários e a infiltração de águas salinas no sistema de esgoto em regiões costeiras também contribuem diretamente para o aumento do teor salino no esgoto doméstico (PANSWAD e ANAN 1999). A salinidade é conhecida por afetar a atividade metabólica das bactérias nitrificantes, reduzindo o crescimento microbiano e as taxas de oxidação de amônio (MOUSSA *et al.* 2006). Além disso, a estrutura e as propriedades de sedimentação dos flocos de lodo são afetadas, assim como a máxima solubilidade de oxigênio e sua transferência na fase líquida (VAN'T RIET e TRAMPER, 1991).

Nesse contexto, o efeito negativo da salinidade no processo de nitrificação vem sendo objeto de estudo em diversas investigações (PANSWAD e ANAN 1999; DAHL *et al.* 1997; MOUSSA *et al.* 2006; CAMPOS *et al.* 2002). Em diversos casos, os resultados reportados na literatura são difíceis de comparar e apresentam resultados contraditórios. O efeito de sal no processo de nitrificação depende da configuração do sistema e da instabilidade das condições operacionais em relação a pH, temperatura e

presença de compostos inibidores. Além disso, o modo de como a cultura de micro-organismos é adaptada a altas concentrações salinas (de forma gradual ou forma de pulso) também pode afetar a forma como o sal afeta as populações microbianas.

Uma estratégia operacional que pode ser utilizada para minimizar o efeito ocasionado pela salinidade no processo de nitrificação é adaptar os micro-organismos a altos teores salinos de forma gradual. Esse procedimento foi aplicado com sucesso em um projeto de pesquisa anterior (BASSIN *et al.* 2011a), durante o qual um reator de leito móvel com biofilme foi operado, sendo o mesmo submetido ao aumento progressivo da concentração salina de 0 a 13 gNaCl/L durante um período de 6 meses.

PANSWAD e ANAN (1999) observaram que o efeito do aumento gradual da concentração salina de 0 a 30 gNaCl/L na remoção de matéria orgânica e nitrogênio foi menos severa para um sistema anaeróbio/anóxico/aeróbio inoculado com biomassa adaptada ao sal em comparação com outro sistema inoculado com biomassa não adaptada. O lodo aclimatado a altos índices salinos também apresentou menor tempo de recuperação após choque de carga contendo elevada concentração de sal de 70 gNaCl/L. Outros estudos envolvendo a adaptação gradual ao sal mostraram que, dependendo da concentração salina, o efeito a longo prazo de sal pode ser mais pronunciado do que o efeito a curto prazo (MOUSSA *et al.*, 2006). Esses estudos não reportam como as mudanças na estrutura da comunidade microbiana influenciam o processo de adaptação a elevados teores salinos. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi investigar como diferentes estratégias de adaptação ao sal influenciam a diversidade microbiana, a atividade e a sedimentação do lodo biológico. Para esse propósito, utilizou-se uma combinação de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e análise das sequências dos fragmentos do gene 16S do RNA ribossomal amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR). A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi usada para validar os resultados baseados em PCR e também para observar a dinâmica das populações nitrificantes. Os resultados obtidos a partir das técnicas moleculares foram relacionados com o desempenho do processo de nitrificação.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Aparato experimental e condições de operação

Dois reatores em batelada sequencial de escala laboratorial (SBR₁ e SBR₂), com volume de 4 L, foram operados em paralelo. O tempo do ciclo foi de 24 h, sendo esse período dividido nas seguintes fases: alimentação por 3 min, aeração por 23 h e 7 min, sedimentação por 45 min; e descarte do efluente por 5 min. O percentual de troca de volume foi fixado em 75%. Ambos os reatores foram inoculados com lodo ativado proveniente de uma planta de tratamento de esgoto doméstico (ETIG – Rio de Janeiro) e alimentados com meio sintético inorgânico com a seguinte composição: 305 mg/L NH₄Cl, 222 mg/L KH₂PO₄, 53 mg/L MgSO₄, 889 mg/L NaCl, and 900 mg/L NaHCO₃. Uma solução de elementos traço (VISHNIAC and SANTER 1957) foi adicionada ao meio de cultura na proporção de 0,5 mL/L de meio. O meio foi suplementado com diferentes concentrações de sal (NaCl). A concentração salina foi aumentada de 0 a 20 gNaCl/L em ambos os reatores, embora o aumento tenha se dado de forma distinta em cada sistema, como mostrado na Tabela 5.1. Como pode ser observado, as fases experimentais de ambos os reatores foram similares, embora o período de operação do SBR₂ tenha sido desprovido das fases II e IV. As condições experimentais foram escolhidas de modo a proporcionar uma adaptação mais gradual ao sal no SBR₁ (aumento do teor salino realizado em 4 etapas) em comparação com a do SBR₂ (aumento do teor salino realizado em duas etapas). Ar foi fornecido por meio de difusores colocados na base de cada reator. A concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi mantida acima de 6 mgO₂/L e o pH foi mantido entre 6,8 e 7,5 por meio do uso de soluções de NaOH 1M e HCl 1M. Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente (24 ± 2°C).

Tabela 5.1: Fases de operação do SBR₁ and SBR₂.

| | Fase de Operação | NaCl (g/L) | Tempo de operação (dias) |
|------------------|------------------|----------------|--------------------------|
| SBR ₁ | I | 0 ^a | 24 |
| | II | 5 | 17 |
| | III | 10 | 16 |
| | IV | 15 | 16 |
| | V | 20 | 35 |
| SBR ₂ | I | 0 ^a | 41 |
| | III | 10 | 32 |
| | V | 20 | 35 |

^a O valor 0 corresponde, na verdade, a 0,9 gNaCl/L, uma vez que o meio de alimentação continha certa quantidade de NaCl.

5.2.2. Métodos analíticos e procedimentos de cálculo

As concentrações de amônio, sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e índice volumétrico de lodo (IVL) foram determinados de acordo com métodos padrão (APHA, 1995). As concentrações de nitrato e nitrito foram determinadas, respectivamente, por meio de cromatografia de íons (Dionex ICS 90) e por meio de um kit analítico fornecido pela Hach Co. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada com um medidor de OD (WTW Oxi-538). Temperatura e pH foram medidos com um eletrodo específico (Oakton pH 110 meter).

A eficiência de remoção de amônio foi calculada levando-se em consideração as concentrações afluente e efluente. A taxa específica de oxidação de amônio (q_{NH_4}) em cada condição de salinidade foi determinada por regressão linear da concentração de amônio ao longo do tempo dividida pela concentração de SSV, sendo expressa como uma fração da máxima taxa específica de oxidação de amônio (q_{max}) observada em cada concentração de sal.

5.2.3. Extração de DNA e amplificação por PCR

O DNA foi extraído das amostras do SBR₁ e SBR₂ no final das fases I, III e V. As amostras foram coletadas em duplicata em diferentes regiões de cada reator para confirmar a reprodutibilidade dos resultados. Nenhuma amostra foi coletada no final das fases II e IV do SBR₁, uma vez que tais fases não estiveram presentes durante a operação do SBR₂. A extração foi realizada por meio do kit FastDNA[®] SPIN (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi avaliado em gel de agarose 1% (m/v) em seguida armazenado a -20°C até uso posterior. Uma quantidade de 10 ng de DNA genômico foi utilizada para a amplificação do gene 16S rRNA por PCR, a qual foi realizada com *primers* universais para o domínio Bactéria: BAC341F (contendo um grampo de GC de 40-pb) e BAC907RM (M=A/C) (SCHÄFER e MUYZER 2001). O programa do termociclador para amplificação do gene 16S rRNA era composto de uma fase de pré-resfriamento a 4°C por 1,5 min, desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 32 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento do *primer* a 57°C por 40 s e extensão a 72°C por 40 s. Após o último ciclo, foi estabelecida uma etapa final de extensão a 72°C por 30 min e o final da amplificação terminou a 12°C. O conjunto de *primers* *amoA*-1F-GC

e *amoA*-2R (HORNEK *et al.* 2006) foi usado para a amplificação do gene que codifica para a enzima amônia monooxigenase, específica das bactérias oxidadoras de amônio (gene *amoA*). As seguintes condições foram escolhidas para a amplificação do gene *amoA*: 4 min a 94°C (desnaturação inicial), 35 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturação), 40 s a 60°C (anelamento), e 40 s a 72°C (extensão), finalizando com 30 min a 72°C (extensão final). Os produtos de PCR dos genes 16S rRNA e *amoA* foram quantificados em um gel de agarose 1% (m/v).

5.2.4. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE)

A técnica DGGE foi realizada em um equipamento Bio-Rad DCode System (Bio-Rad, Richmond, USA). A eletroforese foi realizada em géis de espessura de 1 mm, contendo 6% ou 8% poliacrilamida para os produtos de PCR dos genes 16S rRNA e *amoA*, respectivamente. Os gradientes de desnaturação dos géis variaram de 20% a 70% para os fragmentos de 16S rRNA e de 10% a 50% para os fragmentos de *amoA* (100% de desnaturantes definido como 7 M de uréia e 40% (v/v) de formamida deionizada). Os géis foram submersos em tampão TAE 1× (40 mM Tris, 40 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 7,4) para os fragmentos de 16S rRNA ou tampão TAE 0,5× para os fragmentos do gene *amoA*. Uma quantidade de 250 ng dos produtos de PCR contendo o grampo de GC foi adicionada em cada canaleta do gel. A eletroforese dos produtos de PCR do gene 16S rRNA durou 16 h em voltagem constante de 100 V e temperatura de 60°C. Para os produtos de PCR do gene *amoA*, a eletroforese foi realizada por 5 h a 200 V e temperatura de 55°C. Após a eletroforese, os géis foram corados por 30 min com 5 mL de uma solução de TAE 1× contendo o corante SYBR green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) em ambiente escuro. O gel foi visualizado em um transiluminador Safe Imager Blue-Light (Invitrogen, Carlsbad, CA). As imagens do gel foram capturadas com o sistema GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK). Bandas individuais dos géis de DGGE de ambos os genes 16S rRNA e *amoA* foram excisadas com o auxílio de navalhas cortantes esterilizadas e imediatamente eluídas em tampão Tris-HCl 1×, sendo armazenadas durante a noite a 4°C. Os mesmos programas do termociclador descritos anteriormente foram utilizados para a reamplificação dos fragmentos do gene 16S rRNA e *amoA*, lançando-se mão de *primers* desprovidos do grampo de GC. Um volume de 1 µL do DNA eluído foi utilizado como padrão para a reamplificação. O sequenciamento do DNA foi realizado pela empresa comercial Macrogen (Coréia). As

sequências dos genes 16S rRNA e *amoA* foram comparadas com as sequências armazenadas no GenBank por meio da ferramenta computacional BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Posteriormente, as sequências foram importadas para o programa ARB (<http://www.arb-home.de>) e alinhadas com o auxílio do alinhador automático. Em seguida, o alinhamento foi verificado e corrigido manualmente. Árvores filogenéticas foram geradas por meio do algoritmo de máxima verossimilhança. Os padrões de bandas de DGGE das diferentes amostras foram analisados e comparados por meio do programa GelCompar II (Applied Maths, Belgium). A análise de agrupamento, apresentada na forma de um dendrograma, foi realizada utilizando-se o método de pareamento não ponderado dos grupos usando médias aritméticas. O cálculo das similaridades entre os pares foi baseado no coeficiente de correlação de Dice. As sequências foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: JF710450–JF710456 e JF710458–JF710469 (para as sequências de 16S rRNA) e JF710470–JF710480 (para as sequências do gene *amoA*).

5.2.5. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Amostras de lodo foram coletadas de ambos os reatores em batelada sequencial no final das fases I, III e V. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) 1× (0,01M K₂HPO₄ + KPO₄, pH 7,0, 0,85% (m/v) NaCl) e foram fixadas com paraformaldeído 4% (m/v) por três horas a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000×g por 1 min, lavadas duas vezes em PBS 1× e resuspendidas em uma solução de etanol/PBS (1:1) antes do armazenamento a -20°C. As etapas de hibridização, observação de lâminas em microscópio epifluorescente e aquisição de imagens foram realizadas conforme descrito no Capítulo 3, item 3.2.3. A Tabela 5.2 apresenta as sondas oligonucleotídicas, marcadas com três corantes fluorescentes (Cy3, Fluos e Cy5) distintos.

Tabela 5.2: Sondas oligonucleotídicas e grupos microbianos alvo.

| Sonda | Sequência (5'-3') | Grupo alvo | Mistura ^a | Referência |
|-------------|-------------------------|---|----------------------|---------------------------------|
| Neu 653 | CCC CTC TGC TGC ACT CTA | Halotolerantes e halofílicos obrigatórios <i>Nitrosomonas</i> | | Wagner <i>et al.</i> (1995) |
| Nse 1472 | ACCCAGTCATGACCCCC | <i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>N. eutropha</i> , <i>N. halophila</i> | AOBmix | Juretschko <i>et al.</i> (1998) |
| Nso 1225 | CGCCATTGTATTACGTGTGA | Oxidadores de amônio β-Proteobacteria | | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Nso 190 | CGATCCCCTGCTTTTCTCC | Oxidadores de amônio β-Proteobacteria | - | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Nit 1035 | CCT GTG CTC CAT GCT CCG | <i>Nitrobacter</i> spp. | | Wagner <i>et al.</i> (1996) |
| Ntspa 662 | GGA ATT CCG CGC TCC TCT | <i>Nitrospira</i> | NOBmix | Daims <i>et al.</i> (2001) |
| Nmv | TCCTCAGAGACTACGCGG | <i>Nitrosococcus mobilis</i> | - | Juretschko <i>et al.</i> (1998) |
| EUB 338 I | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | Maioria das bactérias | | Amman <i>et al.</i> (1990) |
| EUB 338 II | GCAGCCACCCGTAGGTGT | <i>Planctomycetes</i> | EUBmix | Daims <i>et al.</i> (1999) |
| EUB 338 III | GCTGCCACCCGTAGGTGT | Verrucomicrobiales | | Daims <i>et al.</i> (1999) |

^a Combinação de sondas para detectar determinado grupo específico de bactérias.

5.3. Resultados

5.3.1. Nitrificação

A concentração de amônio afluente foi mantida em torno de 80 mgN/L e a concentração efluente foi, em geral, inferior a 1 mgN/L durante todas as fases experimentais de ambos os reatores (Figura 5.1). Alguns picos de concentração de amônio detectados no efluente foram resultantes de problemas de ajuste de pH ou a altas cargas de amônio aplicadas de forma acidental. A eficiência média de remoção de amônio foi de 95% e 96% para o SBR₁ e SBR₂, respectivamente. A concentração de nitrito foi sempre menor que 0,5 mgN/L. Um balanço de nitrogênio foi realizado levando-se em consideração a quantidade de amônio oxidado e a quantidade de nitrito/nitrato produzido. A recuperação (conservação) de nitrogênio solúvel foi de aproximadamente 88% para SBR₁ e 86% para o SBR₂, independente da concentração de

sal. O *stripping* de amônia pode ser desprezado, uma vez que os valores de pH foram sempre menores que 7,5 e as concentrações de amônio foram sempre muito reduzidas.

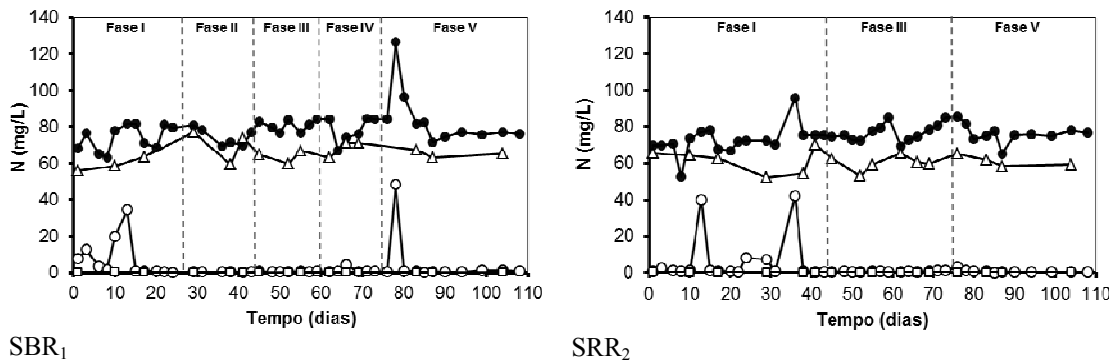


Figura 5.1: Concentração de amônio no afluente (●) e concentrações de amônio (○), nitrato (Δ) e nitrito (□) no efluente dos reatores em batelada sequencial durante todo o período experimental.

Quantificações dos compostos nitrogenados ao longo do ciclo operacional foram realizadas no final de cada fase experimental em ambos os sistemas. Os perfis de concentração de amônio estão mostrados na Figura 5.2. A carga específica de amônio alimentada ao sistema foi de aproximadamente 2 mgN/(gSSV·h). A taxa específica de oxidação de amônio (q_{NH_4}) obtida durante a operação em diferentes concentrações salinas foi calculada e expressa como uma fração da taxa máxima de oxidação de amônio obtida em cada concentração de sal (q_{max}). Os resultados estão mostrados na Figura 5.3. No SBR₁, no qual o processo de adaptação ao sal foi realizado de forma mais lenta, a máxima taxa específica de oxidação de amônio foi de aproximadamente 14 mgN/(gSSV·h), valor obtido na concentração salina de 5gNaCl/L (fase II). A q_{NH_4} obtida na fase I (sem adição de sal) e fase III foi um pouco menor, equivalendo a 13 mg N/(gSSV·h). Quando a concentração de NaCl foi aumentada de 10 para 15 g/L (transição da fase III para a fase IV), a q_{NH_4} diminuiu drasticamente, consistindo em apenas 70% do valor da q_{max} . A menor q_{NH_4} (representando metade da q_{max}) foi obtida na fase V, quando a mais alta concentração salina foi aplicada.

A aclimatação ao sal no SBR₂ acarretou um impacto maior na taxa específica de oxidação de amônio quando comparado com aquele observado no SBR₁. No SBR₂, a q_{max} foi obtida na fase I (sem adição de sal), e apresentou o valor de 13,5 mg N/(gSSV·h). Quando a concentração de NaCl foi aumentada diretamente de 0 (fase I) para 10 g/L (phase III), a q_{NH_4} diminuiu 20%. Essa atividade foi reduzida em 60% no final da fase V.

Os testes de ciclo mostraram que não ocorreu acúmulo de nitrito durante as fases experimentais em ambos os reatores, o que implica que a taxa específica de oxidação de nitrito (q_{NO_2}) foi praticamente a mesma da taxa específica de oxidação de amônio (q_{NH_4}).

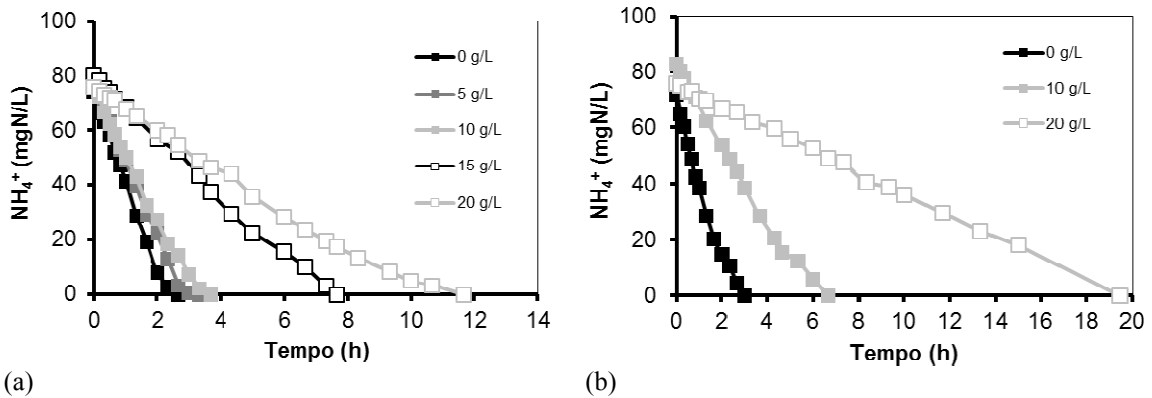


Figura 5.2: Perfis de concentração de amônio obtidos nos testes de ciclo no SBR₁ (a) e SBR₂ (b) em diferentes fases de operação.

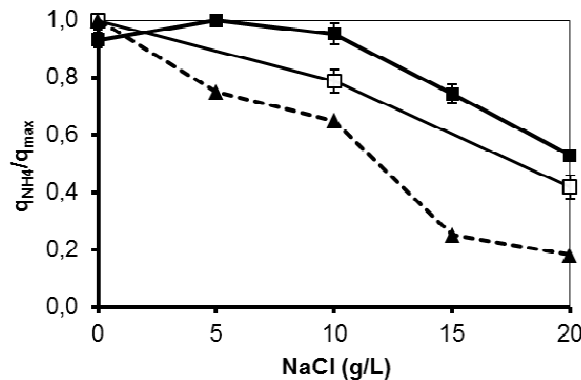


Figura 5.3: Taxa específica de oxidação de amônio (q_{NH_4}) em função da máxima taxa de oxidação de amônio (q_{max}) obtida durante a operação do SBR₁ (■) e SBR₂ (□) em diferentes concentrações de sal. Resultados obtidos por MOUSSA *et al.* (2006) estão mostrados nas linhas pontilhadas.

5.3.2. Concentração de biomassa e propriedades do lodo

As concentrações de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) do SBR₁ e SBR₂ obtidas ao longo da operação desses dois reatores estão mostradas na Tabela 5.3. Durante a fase I, a concentração de biomassa tendeu a apresentar um valor constante em ambos os sistemas. Quando a concentração de sal foi aumentada de 0 para 5 g/L no SBR₁, um decréscimo na concentração de biomassa foi observado. Esse fato foi resultado da maior quantidade de células arrastadas,

evidenciado pelo aumento da turbidez do sobrenadante. Com o início da fase III, um arraste considerável de sólidos foi observado, particularmente no SBR₂, no qual o teor de NaCl foi aumentado diretamente de 10 para 20 g/L. No SBR₁, o aumento de sal de 5 (fase II) para 10 g/L (fase III) não acarretou diferença significativa no teor de SSV. Em contrapartida, a transição da fase III (10 g/L) para a fase IV (15 g/L) foi acompanhada de um aumento considerável na concentração de sólidos no sobrenadante do SBR₁, o que repercutiu no aumento de biomassa no efluente e, conseqüentemente, na diminuição do teor de SSV no reator.

Na fase V, observou-se apenas uma pequena diminuição da concentração de biomassa em ambos os reatores e o teor de sólidos tendeu a um valor constante. Em geral, a diminuição da concentração de sólidos foi mais pronunciada no SBR₂ em comparação com a observada no SBR₁, especialmente levando-se em consideração a fase III do primeiro reator. Conseqüentemente, o tempo de retenção de sólidos (TRS) diminuiu mais drasticamente no SBR₂, atingindo o valor de 20 dias no final da operação. A proporção de SSV em relação aos SST também diminuiu com o incremento de sal em ambos os sistemas, indicando que ocorreu acúmulo de material inorgânico no lodo. O rendimento de biomassa foi de aproximadamente 0,02 gSSV/gNH₄⁺-N oxidado. Esse valor não apresentou variação significativa com o aumento da salinidade.

O índice volumétrico de lodo (IVL) foi monitorado durante as fases I-V (Tabela 5.3). Uma diminuição do IVL foi observada com o aumento da salinidade em ambos os reatores. No SBR₁, o IVL decresceu gradualmente de 110 mL/g (fase I) até 70 mL/g (fase IV). Durante a transição da fase IV para a fase V, nenhuma variação foi observada. No SBR₂, a redução do IVL foi levemente superior àquela observada no SBR₁. O valor desse parâmetro diminuiu de 110 mL/g (fase I) para 60 mL/g (fase V).

Organismos tais como protozoários, nematóides e rotíferos foram encontrados no lodo no início da operação de ambos os reatores. Quando a concentração salina foi aumentada de 5 (fase II) para 10 gNaCl/L (fase III) no SBR₁, esses organismos começaram a desaparecer. No final da fase III, somente um pequeno número deles ainda estavam presentes. No SBR₂, esses organismos desapareceram completamente durante a transição da fase I para a fase III. A pressão osmótica parece apresentar uma grande influência na sobrevivência desses organismos (MOUSSA *et al.*, 2006) e a adaptação ao sal realizada de forma mais lenta no SBR₁ aumentou a tolerância dos mesmos aos níveis de salinidade crescentes. Bactérias filamentosas também foram detectadas nas fases I e

II do SBR₁ e na fase I no SBR₂. Entretanto, quando a concentração de sal foi igual ou superior a 10 g/L, esses micro-organismos não conseguiram sobreviver.

Tabela 5.3: Sólidos suspensos totais (TSS), sólidos suspensos voláteis (SSV), tempo de retenção de sólidos (TRS) e índice volumétrico de lodo nas diferentes fases de operação do SBR₁ e SBR₂.

| Fases operacionais | SBR ₁ | | | | | SBR ₂ | | |
|-----------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|
| | I | II | III | IV | V | I | III | V |
| SST _{reator} (g/L) | 2,9 | 2,5 | 2,3 | 1,9 | 1,8 | 2,6 | 1,8 | 1,6 |
| SSV _{reator} (g/L) | 2,4 | 2,0 | 1,8 | 1,1 | 1,1 | 2,1 | 1,0 | 0,7 |
| SRT | 85 | 68 | 55 | 36 | 34 | 85 | 28 | 27 |
| SVI (mL/g) | 110 | 91 | 80 | 70 | 70 | 110 | 68 | 60 |

5.3.3. Dinâmica da população microbiana revelada por PCR-DGGE

5.3.3.1 Dinâmica da comunidade bacteriana geral

A composição da comunidade microbiana geral nos reatores foi investigada por meio da técnica DGGE, baseada nos fragmentos de 16S rRNA amplificados por PCR. A Figura 5.4 apresenta os padrões de bandas de DGGE das amostras provenientes de ambos os reatores no final das fases I, III e V. Um dendrograma representando a similaridade entre os diferentes *fingerprints* também está ilustrado na respectiva Figura.

Observou-se que a composição da comunidade microbiana do SBR₁ e SBR₂ foi bastante similar no início do experimento, embora tenha ocorrido uma divergência significativa com o aumento da salinidade. A estratégia mais rápida de adaptação ao sal realizada no SBR₂ causou uma modificação mais pronunciada na comunidade microbiana comparada com aquela observada no SBR₁. Duplicatas de cada amostra foram analisadas para observar a reprodutibilidade dos resultados. A similaridade entre as duplicatas foi superior a 97%. Uma vez que cada duplicata foi coletada em diferentes zonas dos reatores, pode-se inferir que não ocorreu gradiente da população microbiana no interior dos mesmos devido à mistura completa da fase líquida. Os perfis de DGGE indicaram a presença de uma comunidade de micro-organismos diversa. Um total de 27 bandas foram excisadas do gel de DGGE e sequenciadas. Desse total, seis bandas (B13, B16, B20, B22, B24 e B25) forneceram resultados de sequenciamento ambíguos e, por conseguinte, foram negligenciados na análise filogenética posterior.

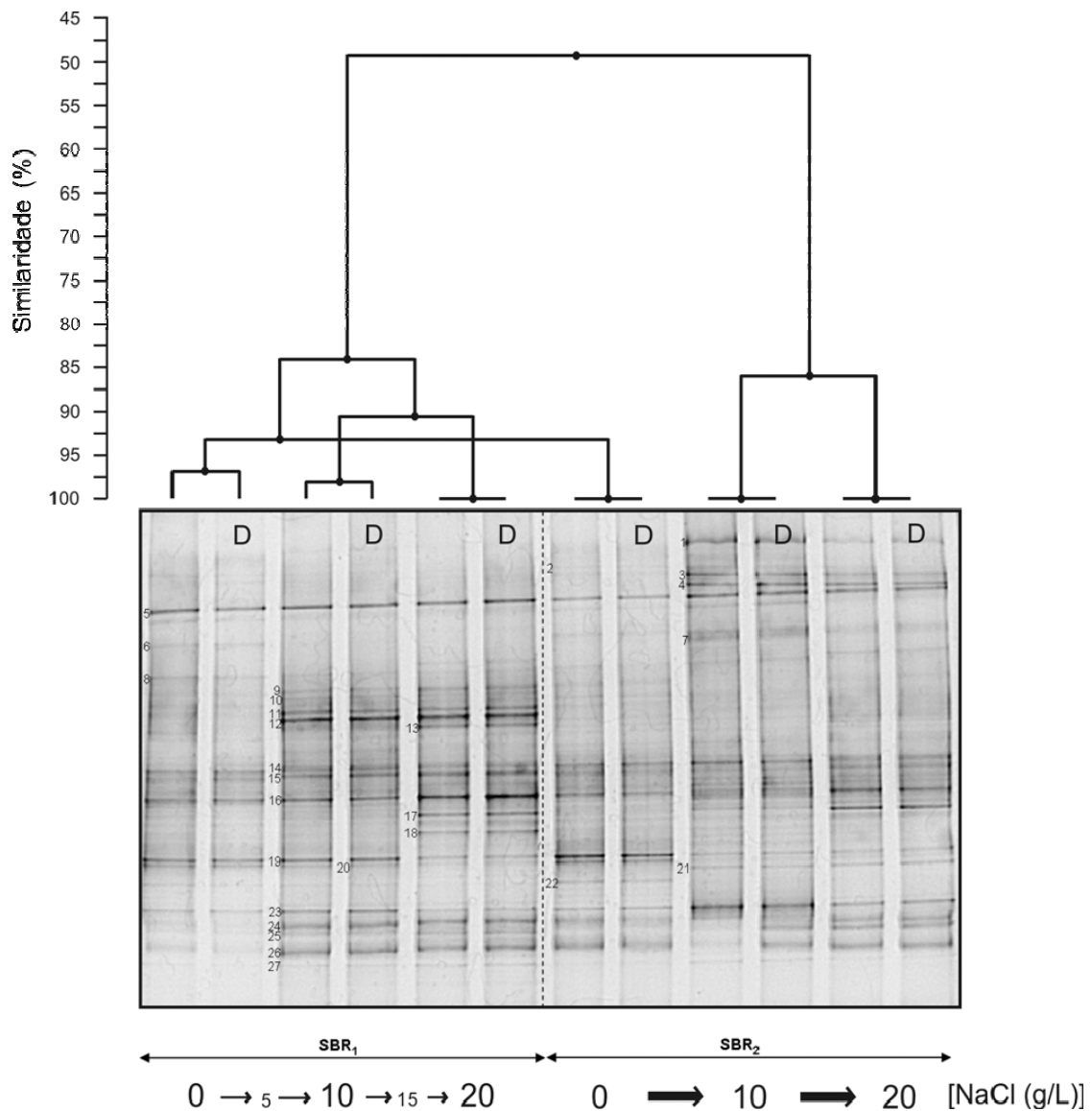


Figura 5.4: Perfil de bandas do gel de DGGE refletindo a diversidade microbiana dos reatores expostos ao aumento da concentração de sal. A análise de agrupamento mostrando as similaridades está graficamente mostrada na forma de um dendrograma. “D” indica as duplicatas de cada amostra.

A Figura 5.5 ilustra a árvore filogenética baseada na sequência parcial dos fragmentos do gene 16S rRNA das amostras. Os micro-organismos encontrados pertencem a diferentes filos, tais como Proteobacteria (Subclasses α , β e γ), Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes e Actinobacteria.

No final da fase I, os perfis de bandas do SBR₁ e SBR₂ foram bastante similares, conforme indicado pela análise de agrupamento (similaridade de 93%). Esse resultado era de certa forma esperado, uma vez que ambos os sistemas estavam sendo operados nas mesmas condições durante a fase inicial, isto é, sem adição de sal. A maioria das

bandas dominantes foram encontradas no final da primeira fase experimental, com exceção das bandas B1, B4, B7, B17, B18 e B21, as quais apareceram em fases posteriores. Entre as bandas da fase I, as bactérias oxidadoras de amônio (AOB) foram detectadas nas bandas B9-B12, todas pertencendo ao gênero *Nitrosomonas*. As bandas B9 e B11, em particular, apresentaram resultados de sequenciamento idênticos. As bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) foram encontradas nas bandas B14, B15 e B26. A banda B14 apresentou sequência similar a *Nitrobacter vulgaris* e a sequência das bandas B15 e B26 foi similar a *Nitrobacter hamburgensis*.

Embora os reatores fossem alimentados somente com meio autotrófico desprovido de compostos orgânicos, algumas bactérias heterotróficas estiveram presentes na comunidade microbiana na fase I. Esses micro-organismos foram encontrados nas bandas B3, B5, B6, B8, B19, B23 e B27. Desse conjunto, as bandas B3, B5 e B6 foram agrupadas entre os membros do filo Bacteroidetes. A sequência da banda B8 pertenceu a subclasse α -Proteobacteria. As bandas B19 e B23 representaram bactérias pertencendo aos grupos Firmicutes e Chloroflexi, respectivamente. Por fim, a banda B27 foi vinculada ao grupo Gemmatimonadetes, isolada de um sistema de remoção biológica de fosfato.

O padrão de bandas mostrado na fase III relevou diferenças entre a composição microbiana do SBR₁ e SBR₂, resultado atribuído aos diferentes procedimentos de adaptação ao sal adotados em cada reator. No SBR₁, observou-se que as bandas B2, B3 e B6 desapareceram da fase I para fase II. Em contrapartida, a intensidade da banda B12 e bandas B23-B27 aumentou com o aumento da concentração salina ocorrido da fase I para fase III. Conforme indicado pelo dendrograma, a similaridade entre as fases I e III do SBR₁ foi de aproximadamente 85%.

Com o aumento da concentração de sal diretamente de 0 (fase I) para 10 gNaCl/L (fase III) no SBR₂, a população de micro-organismos variou de forma diferente em comparação com aquela observada no SBR₁. Uma variação significativa na comunidade microbiana foi observada da fase I para a fase III, conforme indicado pelo baixo nível de similaridade (50%) entre os *fingerprints* dessas duas fases experimentais. Observou-se o aparecimento de novas bandas (B1, B4, B7 and B21). Com exceção da banda 21, as sequências representativas de todas as outras bandas foram agrupadas ao filo Bacteroidetes. A sequência das bandas B1 e B4 apresentaram alta similaridade com membros da família Chitinophagaceae. A banda 21 apresentou sequência similar a *Nitrospira moscoviensis*. As bandas B9-B12, relacionadas ao gênero *Nitrosomonas*, não

foram mais detectadas. Observou-se um aumento da intensidade das bandas B3 (Bacteroidetes) e B23 (Chloroflexi) e uma diminuição da intensidade da banda B19.

De acordo com o perfil de bandas do SBR₁, as diferenças entre a estrutura da comunidade microbiana na fase III e fase V são mínimas. Levando-se em consideração a análise de agrupamento, observou-se mais de 90% de similaridade entre os *fingerprints* dessas duas fases. As únicas diferenças se referem ao aparecimento das bandas B17 (sequência similar a *Denitromonas* sp.) e B18 (sequência similar a *Arthrobacter soli*) e diminuição da intensidade da banda B19.

A transição da fase III para a fase V no SBR₂ também foi acompanhada de pequenas variações na estrutura da comunidade de bactérias. Observou-se o aparecimento da banda B17 e o aumento da intensidade das bandas B8, B15 e B16. De acordo com a análise de agrupamento, a similaridade entra as fases III e V foi em torno de 85%.

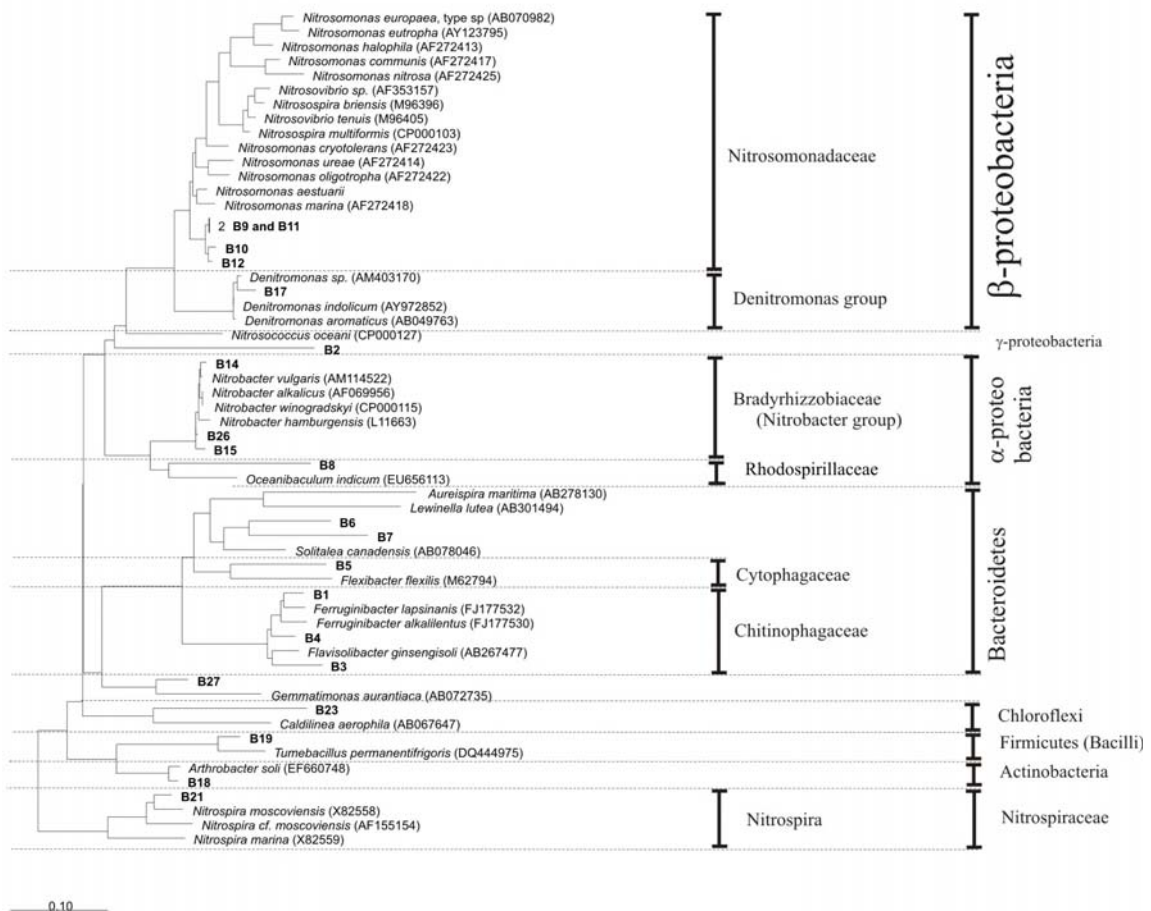


Figura 5.5: Árvore filogenética das sequências de 16S rRNA obtidas a partir das bandas excisadas do gel de DGGE. As sequências obtidas nesse trabalho estão mostradas em negrito.

5.3.3.2 Dinâmica das bactérias oxidadoras de amônio (AOB)

Para a obtenção de uma melhor visão da dinâmica das AOB ao longo do experimento, um estudo foi realizado por meio da análise de DGGE dos fragmentos do gene *amoA* amplificados por PCR (Figura 5.6). Essa análise também foi realizada para se obter informação suficiente de sequências a partir das bandas do gel de DGGE para análise filogenética da comunidade de AOB

Como anteriormente descrito, os resultados de DGGE com fragmentos do gene 16S rRNA mostraram que as duplicatas das amostras foram praticamente idênticas. Sendo assim, apenas uma amostra representativa de cada fase experimental foi levada em consideração para a análise DGGE com fragmentos do gene *amoA*.

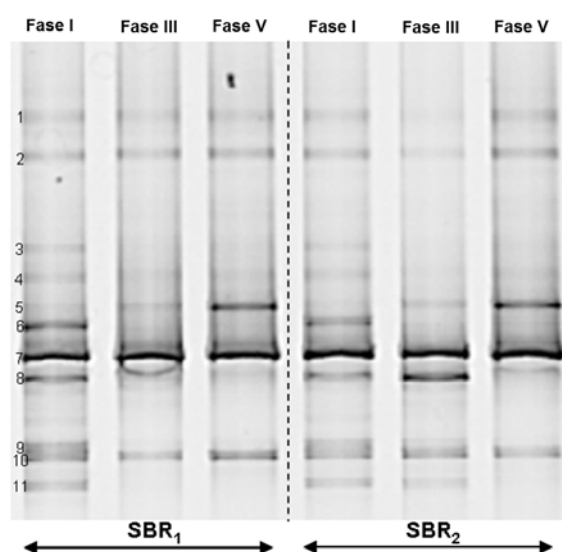


Figura 5.6: Padrões de bandejamento mostrando a composição das bactérias oxidadoras de amônio (AOB) ao longo das fases experimentais.

Onze bandas dominantes foram selecionadas, excisadas e sequenciadas no intuito de revelar a identidade dos micro-organismos envolvidos. A afiliação filogenética das bandas dominantes foi analisada e mostrada na forma de uma árvore filogenética, ilustrada na Figura 5.7. Como observado para o gel de DGGE com fragmentos do gene 16S rRNA, a comunidade microbiana na fase I (sem adição de sal em ambos os sistemas) foi a mesma no SBR₁ e SBR₂. Além disso, a análise DGGE mostrou que todas as principais bandas representando a comunidade de AOB já se fizeram presentes na fase I em ambos os reatores. Com o aumento da concentração de sal de 0 (fase I) para 5 g/L (fase II) e subsequentemente para 10 g/L (fase III) no SBR₁, as bandas B3, B6, B8, B9 e B11 desapareceram completamente. No SBR₂, um comportamento similar foi observado durante a transição da fase I diretamente para a

fase III, embora algumas diferenças tenham sido observadas, a saber: a banda B4 não foi mais detectada, a intensidade da banda B8 aumentou e as bandas B9 e B11 continuaram sendo detectadas no final da fase III.

As mesmas bandas da fase III foram detectadas na fase V no SBR₁. No SBR₂, a única mudança do padrão de bandeamento da fase III para a fase V se refere ao desaparecimento das bandas B8, B9 e B11. Para ambos os reatores, observou-se que a intensidade da banda B5 aumentou ao longo das fases experimentais. Já as bandas B1, B2, B7 e B10, permaneceram estáveis ao longo de todo o experimento.

A análise filogenética mostrou que todas as AOB pertenceram ao gênero *Nitrosomonas*. Os resultados de sequenciamento mostraram que as bandas B1-B4, B6, B7 e B9 apresentaram grande similaridade a *Nitrosomonas europaea*. A intensidade da banda B5, relacionada a *Nitrosomonas* sp., aumentou de forma significativa na maior concentração salina testada. As bandas B8, B10 e B11 apresentam alta similaridade com *Nitrosomonas eutropha*. Embora o padrão de bandas tenha sido modificado de forma distinta da fase I para a fase III no SBR₁ e SBR₂, a comunidade de AOB foi bastante similar em ambos os sistemas no final do experimento (fase V). Os resultados deixaram claro que as mudanças na diversidade microbiana observadas na análise do gene *amoA* foram menores que aquelas com observadas na análise do gene 16S rRNA, permitindo inferir que o impacto do sal sobre as AOB foi pequeno.

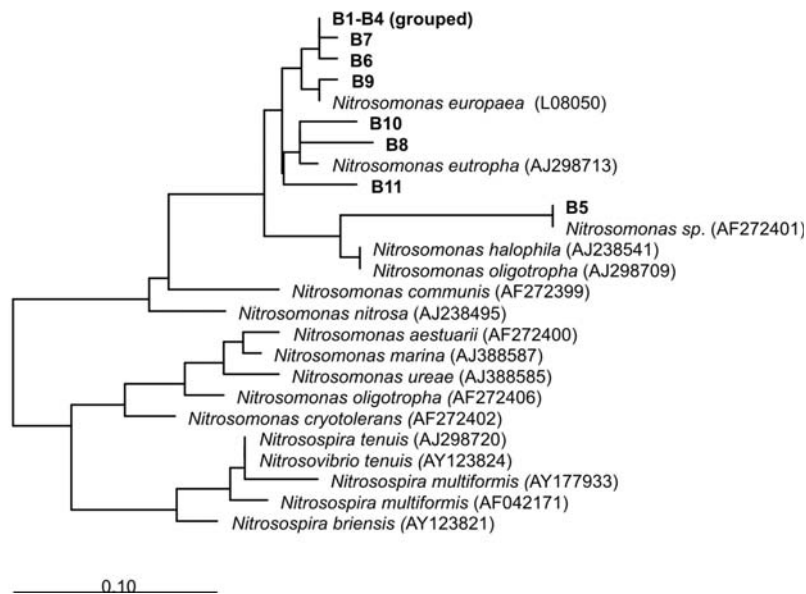


Figura 5.7: Árvore filogenética das sequências do gene *amoA* representativas das bandas do gel de DGGE. A barra de escala indica uma diferença de 10% entre as sequências.

5.3.3. Análise das populações de bactérias oxidadoras de amônio (AOB) e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) por meio da técnica de FISH

A análise FISH foi realizada utilizando-se a combinação de sondas oligonucleotídicas para detectar as AOB e NOB. A Figura 5.8 apresenta imagens de FISH representativas das amostras coletadas em ambos os SBR no final das fases I e V. Observou-se que a proporção das bactérias nitrificantes no total da comunidade bacteriana foi similar em ambos os reatores no final da fase I, período no qual os mesmos foram operados nas mesmas condições (sem adição de sal). Os resultados obtidos por FISH mostraram que a proporção de AOB e NOB na comunidade microbiana aumentou quando a concentração salina foi aumentada de 0 a 10 g NaCl/L no SBR₁, permanecendo relativamente constante quando a salinidade foi posteriormente incrementada para 20 g/L. No SBR₂, a população de AOB diminuiu com o aumento do teor salino, embora nenhuma variação significativa tenha sido observada na população de NOB (Figura 5.8).

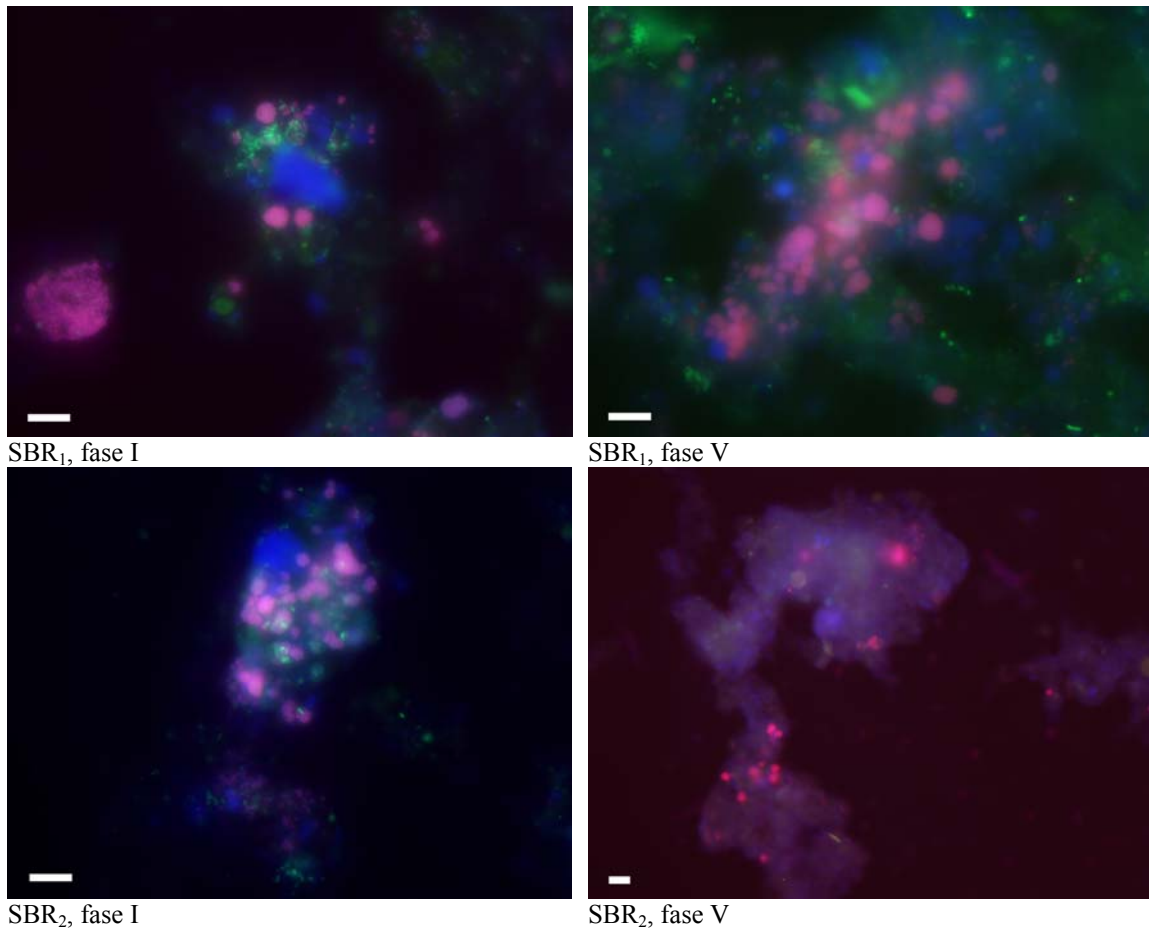


Figura 5.8: Populações de AOB (em vermelho) e NOB (em verde) entre toda comunidade bacteriana (em azul) na primeira e última fase experimental de ambos os SBR. As AOB aparecem na cor violeta devido à superposição da combinação de sondas AOBmix e a combinação de sondas EUBmix, enquanto que as NOB aparecem na cor azul turquesa devido à superposição da combinação de sondas NOBmix e a combinação de sondas EUBmix. A barra de escala indica 5 μm .

5.4. Discussão

5.4.1. Efeito de sal na concentração de biomassa e propriedade do lodo

Os resultados mostraram que as concentrações de sólidos suspensos totais (TSS) e sólidos suspensos voláteis (SSV) diminuíram gradualmente com o incremento da salinidade da fase I a fase V em ambos os reatores. A adaptação ao sal mais rápida realizada no SBR₂ ocasionou maior arraste de sólidos em comparação com a observada no SBR₁. Ademais, a quantidade de material inorgânico do lodo aumentou, conforme evidenciado pela diminuição da razão SSV/SST, especialmente na concentração mais elevada de sal (20 gNaCl/L).

Observou-se também um aumento da turbidez do sobrenadante, o que resultou em maior arraste da biomassa. O fato de que o rendimento de biomassa permaneceu praticamente constante ao longo das diferentes fases de operação sugeriu que o arraste substancial de biomassa devido ao aumento do teor salino foi a principal causa da perda de lodo nos reatores. Elevadas concentrações de sal são conhecidas por aumentar a densidade da água, fato que pode potencialmente ocasionar o arraste de pequenos flocos de lodo. De acordo com WOOLARD e IRVINE (1994), sistemas biológicos submetidos a altas cargas de sal respondem com o aumento da concentração de sólidos suspensos no efluente e perda de sólidos suspensos voláteis, similarmente ao observado nesse trabalho. PANSWAD e ANAN (1999) também observaram uma diminuição do teor de SST com o aumento da concentração salina. Esses autores observaram uma redução de 60% da concentração de SST com o aumento da salinidade de 0 a 30 g/L. Nessa pesquisa, o decréscimo da concentração de SST foi um pouco menor (40% e 45% para o SBR₁ e SBR₂, respectivamente), mas a maior concentração salina testada foi 20 gNaCl/L e não 30 gNaCl/L como no caso do trabalho de PANSWAD e ANAN (1999).

O efeito de sal nas propriedades físicas do lodo é um fator importante para avaliar a capacidade do lodo em se manter no interior do reator. O índice volumétrico (IVL) é um importante parâmetro para avaliar a sedimentação de flocos microbianos. Nesse estudo, o aumento da concentração salina acarretou a diminuição do IVL, resultado que contrasta com o aumento da turbidez do sobrenadante ocasionado pela pobre sedimentabilidade dos agregados de lodo e organismos dispersos arrastados facilmente do reator. De acordo com MOUSSA *et al.* (2006), devido ao aumento da salinidade e, por conseguinte, da densidade da água, flocos mais leves são arrastados, aumentando o turbidez do efluente. Em contrapartida, flocos densos permanecem no reator, contribuindo para diminuir o IVL. O procedimento mais rápido de adaptação ao sal realizado no SBR₂ causou um aumento um pouco maior no IVL em comparação com aquele observado no SBR₁. Além disso, o decréscimo na concentração de sólidos foi mais pronunciado no SBR₂, especialmente quando se considera a fase III desse reator, quando o aumento da concentração de sal se deu diretamente de 0 a 10 gNaCl/L. Esse resultado pode ser explicado devido ao fato que um aumento mais gradual da salinidade possivelmente estimula a seleção de flocos densos com arraste mínimo de biomassa, tal como observado no SBR₁. Por outro lado, um aumento do teor de sal mais brusco, tal como realizado no SBR₂, aumenta drasticamente a densidade da água, podendo ocasionar arraste substancial de sólidos do reator (MOUSSA *et al.*, 2006).

Diversas pesquisas foram realizadas no intuito de investigar o efeito da salinidade no IVL. A exemplo do observado nesse trabalho, CAMPOS *et al.* (2002) e MOUSSA *et al.* (2006) também observaram um decréscimo do IVL com o aumento da concentração de sal. MOON *et al.* (2002) mencionam que o aumento do teor salino provoca modificações na propriedade físicas dos agregados microbianos. Esses autores também observaram um aumento no IVL imediatamente após a concentração de sal ter sido aumentada.

Observações microscópicas relevaram que organismos presentes no lodo, tais como protozoários, nematóides e rotíferos, desapareceram gradualmente com o aumento da concentração salina. Além disso, o processo de adaptação ao sal mais gradual, realizado em quatro etapas no SBR₁, aumentou a tolerância desses organismos quando comparada com aquela apresentada pelos mesmos no processo de adaptação de duas etapas, realizado no SBR₂. MOUSSA *et al.* (2006) também observaram que rotíferos, protozoários e nematóides presentes em lodo nitrificante não conseguiram suportar concentrações salinas acima de 8 g NaCl/L. SALVADÓ *et al.* (2001) reportaram que um aumento de sal de 3 a 10 g NaCl/L afetou, de forma gradual, as comunidades de protozoários e metazoários. Esses organismos consistem em importantes predadores que se alimentam de bactérias e outras partículas orgânicas mantidas em suspensão nos sistemas de tratamento de águas residuárias (CURDS *et al.*, 1968; WHEALE e WILLIAMSON, 1980). Por conseguinte, eles influenciam indiretamente a formação dos flocos de lodo, favorecendo a separação sólido-líquido. Devido à sua importância relacionada à clarificação do meio líquido (*bulk*), o desaparecimento gradual desses organismos na medida em que a salinidade foi aumentada pode ter contribuído para a maior turbidez do sobrenadante e conseqüentemente, ao maior arraste de biomassa em níveis crescentes de salinidade.

Os resultados desse estudo também indicaram que bactérias filamentosas, as quais são comumente relacionadas ao intumescimento do lodo (*bulking*) (PIPES, 1978), também não conseguiram suportar concentrações de sal acima de 10 gNaCl/L em ambos os sistemas. Esse resultado pode explicar o motivo pelo qual maiores valores de IVL (refletindo piores características de sedimentabilidade do lodo) foram observados quando a concentração de sal foi inferior a 10 g/L. Por outro lado, as bactérias filamentosas são importantes, uma vez que são capazes de melhorar a estrutura dos flocos de lodos e com isso aumentar a sua integridade mecânica além da requerida para a floculação (URBAIN *et al.*, 1993). Nesse contexto, a falta dos organismos

filamentosos pode ter relação com o aumento da turbidez do sobrenadante. A completa ausência desses organismos a partir da concentração de 10 g NaCl/L em ambos os reatores possivelmente ocasionou o aumento da turbidez do efluente, levando ao aumento do arraste e perda de biomassa. A redução de protozoários e organismos filamentosos com o aumento da salinidade também foi reportada por WOOLARD (1993) e LUDZACK e NORAN (1965).

5.4.2. Diferentes estratégias de adaptação ao sal: implicações no processo nitrificante e na estrutura da comunidade microbiana

O processo de adaptação gradual a elevados índices salinos realizado em ambos os SBR permitiu a obtenção de eficiências de remoção de amônio em torno de 100% em todas as fases experimentais. Entretanto, embora a funcionalidade de ambos os reatores tenha permanecido a mesma, a análise dos fragmentos de 16S rRNA por meio de DGGE (Figura 5.4) mostrou uma variação significativa na comunidade de bactérias oxidadoras de amônio, especialmente no SBR₂. A maioria das bandas cujas sequências pertenceram ao gênero *Nitrosomonas* (B9-B12) praticamente não foram detectadas na fase III desse reator, embora a eficiência de remoção de amônio não tenha sido afetada no decorrer das fases I-V. Além disso, bactérias pertencendo a esse gênero específico foram detectadas por meio da técnica de FISH (Figura 5.8) no SBR₂, mesmo na mais alta concentração salina testada (20 gNaCl/L), embora em número reduzido quando comparado com a fase experimental na qual o meio de alimentação não foi suplementado com quantidades extras de sal. A razão pela qual as AOB praticamente não foram detectadas mais no SBR₂, particularmente no final das fases III e V, está relacionada ao fato de que a sua abundância pode ter sido menor que o limite de detecção por meio de DGGE utilizando-se *primers* universais. O não aparecimento das AOB é obviamente um resultado inesperado, uma vez que o reator foi mantido sob condições autotróficas durante todo o período experimental. Ademais, esse fato não foi presenciado no SBR₁, submetido às mesmas condições de operação, com a exceção dos diferentes modos de aumento de sal adotados em cada reator. Assim, os resultados microbiológicos sugeriram que a adaptação ao sal realizada em duas etapas o SBR₂ foi mais severa para as AOB quando comparada com a adaptação mais lenta (quatro etapas) submetida ao SBR₁. Essa constatação é suportada pela análise FISH (Figura 5.8) e vai ao encontro dos resultados dos testes de ciclo (Figuras 5.2 e 5.3), os quais mostraram

menores taxas de oxidação de amônio no SBR₂ em comparação com o SBR₁, especialmente quando a salinidade foi aumentada de 10 a 20 g NaCl/L.

É interessante comparar os resultados obtidos nesse trabalho com aqueles obtidos durante a operação de um reator de lodo granular, também submetido ao aumento da concentração de sal até 33 gNaCl/L. Os resultados obtidos nesse estudo estão descritos no capítulo 6. Só para se ter uma ideia, a mudança da estrutura da comunidade de AOB nos grânulos aeróbios devido ao aumento de sal foi consideravelmente menor quando comparado com aquela observada no SBR₁ e SBR₂. O reator de lodo granular, destinado à remoção simultânea de nitrogênio e fósforo, também foi alimentado com meio sintético contendo amônio como fonte de nitrogênio, embora também apresentasse acetato como fonte de carbono orgânico.

As baixas concentrações de sal tiveram um efeito positivo na atividade de oxidação de amônio, particularmente quando se considera o aumento de sal de 0 a 5 gNaCl/L no SBR₁. Em concentrações maiores que 10 gNaCl/L, a taxa específica de oxidação de amônio decresceu drasticamente. Esse resultado, combinado à redução do tempo de retenção de sólidos com o aumento da salinidade, resultou na diminuição substancial das taxas volumétricas de conversão de amônio.

No intuito de observar com maior riqueza de detalhes o comportamento da comunidade de AOB com o aumento da concentração salina, realizou-se a comparação dos *fingerprints* de DGGE referentes aos fragmentos do gene funcional *amoA*, de diferentes amostras, amplificados por PCR. Foi demonstrado que a estrutura da comunidade de AOB foi bastante diversificada em ambos os sistemas e que os diferentes métodos de adaptação ao sal realizados no SBR₁ e SBR₂ apresentaram apenas uma pequena influência na comunidade dessas bactérias.

O micro-organismo cuja sequência parcial foi obtida a partir da banda excisada B5 foi afiliado ao gênero *Nitrosomonas* sp. Ao que tudo indica, esse grupo microbiano, em particular, apresenta alta afinidade por sal. Em contrapartida, outros micro-organismos cujas sequências parciais foram obtidas a partir das bandas B8 e B11 (similares a *Nitrosomonas eutropha*) e banda B9 (similar a *Nitrosomonas europaea*) pareceram ser mais afetados pela longa exposição ao sal ocorrida no SBR₁ do que à modificações mais rápidas dos níveis salinos no SBR₂.

É importante frisar que a análise do gene *amoA* não reflete uma avaliação quantitativa, fornecendo apenas resultados qualitativos. Nesse sentido, embora a diversidade de AOB tenha sido maior no SBR₂ a 10 g/L (fase III), nada pode ser

afirmada a respeito de sua quantidade. Outro ponto interessante a ser destacado é que a estrutura da comunidade microbiana estava variando mais rapidamente do que o esperado, levando-se em consideração o tempo de retenção de sólidos (TRS). Essa constatação pode ser observada a partir da análise DGGE de ambos os fragmentos dos genes 16S rRNA e *amoA*. Para exemplificar, observou-se desaparecimento de diversos organismos no SBR₁ desde fim da fase I até o fim da fase III (33 dias de operação), embora o TRS tenha sido de 85 dias.

Embora muitas vezes reportado na literatura, o acúmulo de nitrito devido à inibição das NOB por altas concentrações salinas (YE *et al.* 2009; JIN *et al.* 2007) não foi observado nos testes de ciclo realizados durante a operação dos reatores, mesmo na condição de salinidade mais severa (20 g NaCl/L). Realmente, quando se considera os perfis de bandas do gel de DGGE dos fragmentos do gene 16S rRNA, as bandas representando a população de NOB (B14, B15, and B26) estiveram presentes ao longo de todo o experimento. Além disso, a intensidade das bandas B15 e B26 aumentou conforme ocorreu o aumento da concentração de sal. O micro-organismo cuja sequência parcial foi obtida a partir da banda 21 apresentou alta similaridade com *Nitrospira moscoviensis* e possivelmente apresenta alta afinidade por sal, uma vez que só foi detectado nas fases III e V do SBR₂. Os resultados da análise FISH também mostraram que as NOB não foram afetadas com o aumento da concentração salina, uma vez que essa população bacteriana não diminuiu em condições de alta pressão osmótica.

A despeito do lodo nitrificante em ambos os reatores ter sido cultivado apenas com meio inorgânico, algumas bactérias heterotróficas foram detectadas na análise de DGGE. Esses micro-organismos podem ter desenvolvido à custa de produtos solúveis oriundos das bactérias nitrificantes, as quais fixam e reduzem o carbono inorgânico (CO₂) para a síntese celular (BROCK e MADIGAN, 1991) e produzem produtos orgânicos solúveis a partir de seu metabolismo e decaimento celular (RITTMAN *et al.*, 1994). Assim, essas bactérias também interagem com a troca de materiais orgânicos no sistema. OKABE *et al.* (1999) também verificaram a coexistência de bactérias nitrificantes e heterotróficas em um biofilme nitrificante alimentado somente com meio sintético inorgânico.

RITTMANN e BRUNNER (1984) observaram que uma população heterotrófica ativa foi mantida em um reator com biofilme quando os compostos orgânicos foram removidos da alimentação. Esses autores postularam que as bactérias nitrificantes ativas produziam, de forma contínua, substratos orgânicos para os heterotróficos. Ainda não

se sabe se a diversidade de organismos heterotróficos crescendo em sistemas puramente autotróficos pode estar relacionada com o uso de compostos orgânicos produzidos por bactérias autotróficas. A falta de informação relacionada com a interação ecofisiológica entre nitrificantes e heterotróficos limita a realização de análises mais refinadas.

Um modelo matemático usado para descrever a interação entre bactérias nitrificantes e heterotróficas em sistemas de tratamento biológico de águas residuárias foi realizado por MOUSSA *et al.* (2005). Os resultados obtidos por esses autores mostraram que a DQO afluente era responsável por 40% do total de biomassa heterotrófica formada, sendo que 60% dessa biomassa era resultado de decaimento celular. Ademais, mesmo quando a DQO afluente era relativamente baixa (5 – 10 mg/L), a formação de biomassa heterotrófica em um sistema autotrófico foi possibilitada. MOUSSA *et al.* (2005) mencionam que tais valores reduzidos de DQO podem ser indiretamente introduzidos no sistema por meio de impurezas presentes no meio de alimentação ou no ar usado para a aeração dos sistema.

Nesse trabalho, o longo tempo sem disponibilidade de substrato (de até 20 h em alguns ciclos durante a operação a 0 e 5 gNaCl/L) após o seu término também pode ter favorecido a presença de uma diversidade significativa de bactérias heterotróficas em ambos os reatores, uma vez que rotatividade de biomassa foi aumentada. Na ausência de substrato nitrogenado (amônio), o decaimento de biomassa nitrificante possivelmente foi intensificado, favorecendo o crescimento heterotrófico. Além disso, o longo período sem substrato pode ter influenciado o baixo rendimento celular obtido (em torno de 0,02 gSSV/gN), valor muito inferior àqueles obtidos em sistemas de lodo ativado autotrófico reportados por BLACKBURNE *et al.* (2007) e BRAUER *et al.* (1992), os quais obtiveram 0,14 e 0,4 gSSV/gN, respectivamente.

Organismos pertencendo ao gênero *Nitrospira* apresentam um papel importante em ecossistemas como solo e sistemas de distribuição de água potável, podendo ganhar vantagem em relação a *Nitrobacter* em condições de limitação de substrato (WAGNER e LOY 2002; DIONISI *et al.* 2002). Entretanto, nesse estudo, *Nitrobacter* sp. (banda B14) e *Nitrobacter vulgaris* (banda B26) coexistiram com *Nitrospira* sp. (banda B21), particularmente no SBR₂. Os resultados dessa pesquisa são diferentes daqueles obtidos por MOUSSA *et al.* (2006), os quais observaram que *Nitrospira* sp. dominou a população de NOB até 16,5 gNaCl/L, embora não tenha conseguido sobreviver quando a concentração salina foi superior a esse valor.

Entre os organismos heterotróficos encontrados na comunidade bacteriana, um micro-organismo relacionado com *Arthrobacter soli* (banda B18) foi detectado. VERSTRAETE e ALEXANDER (1972) observaram que *Arthrobacter* sp. constitui um organismo envolvido no processo de nitrificação heterotrófica, capaz de oxidar amônio a hidroxilamina, ácido hidroxâmico e nitrito. Diversos compostos orgânicos e inorgânicos podem ser usados como fonte de nitrogênio para a nitrificação heterotrófica, e uma fonte de carbono orgânico é necessária para o crescimento dos micro-organismos e para a nitrificação (FOCHT e VERSTRAETE, 1977). Nesse estudo, a ocorrência de nitrificação heterotrófica não pode ser negligenciada devido à presença de carbono orgânico proveniente dos produtos orgânicos solúveis liberados pelas bactérias nitrificantes e possivelmente advindos de impurezas do meio de cultura ou do ar usado para aeração.

Como descrito no item 5.3.1., a recuperação de nitrogênio no meio líquido foi de aproximadamente 88% para o SBR₁ e 86% para o SBR₂, o que evidencia uma perda de nitrogênio de 12% e 14% para o SBR₁ e SBR₂, respectivamente. Essa perda de nitrogênio solúvel pode ser atribuída a outros processos paralelos, tais como formação de N₂O ou NO por bactérias nitrificantes (KAMPSCHREUR *et al.*, 2007). Ademais, as bactérias também utilizam nitrogênio para o crescimento celular. Levando em consideração a quantidade de lodo (SSV) produzido por dia e considerando um conteúdo de nitrogênio na biomassa de 10%, estimou-se que a quantidade de nitrogênio utilizada para o crescimento foi em torno de 5 – 8% do total de amônio afluente.

5.5. Conclusões

Os resultados desse trabalho evidenciam o fato de que lodo ativado proveniente de uma planta convencional de tratamento de esgoto doméstico pode ser considerado uma fonte de bactérias nitrificantes, as quais podem se adaptar a concentrações significativas de sal mediante adaptação gradual.

As duas estratégias de adaptação ao sal aplicadas nesse estudo (mais gradual no SBR₁ e mais rápida no SBR₂) permitiram a obtenção de boas eficiências de nitrificação e ocasionaram diferentes modificações na estrutura da comunidade microbiana. Os resultados desse trabalho sugerem que, independentemente do consórcio microbiano nitrificante presente em cada reator, o processo de nitrificação pode ser mantido de forma estável na faixa de salinidade testada (até 20 gNaCl/L). A atividade das AOB foi

mais afetada quando a adaptação ao sal foi realizada mais rapidamente. As propriedades de sedimentação do lodo melhoraram com o aumento do teor salino, embora alguns organismos tais como protozoários, nematóides e rotíferos e também bactérias filamentosas não conseguiram suportar os altos índices salinos aplicados.

**Efeito de elevadas concentrações de sal
no processo de lodo granular aeróbio:
relacionando atividade e estrutura da
comunidade microbiana**

6. Efeito de elevadas concentrações de sal no processo de lodo granular aeróbio: relacionando atividade e estrutura da comunidade microbiana

6.1. Introdução

Conforme descrito no capítulo 5, item 5.1, diversas águas residuárias podem conter uma concentração significativa de sais inorgânicos. Como exemplo, pode-se mencionar as indústrias de processamento de frutos de mar, petróleo, conservas e queijo. O uso de água do mar para a descarga em navios, instalações *offshore* e em regiões com problemas de abastecimento de água é responsável pelo aumento dos índices de salinidade das plantas de tratamento de esgoto doméstico.

O tratamento de águas residuárias contendo elevados níveis salinos requer a presença de micro-organismos tolerantes ao sal, os quais, em geral, não estão presentes na comunidade microbiana de sistemas de tratamento de esgoto. A alta salinidade exerce alta pressão osmótica sobre os micro-organismos, e a maioria das populações microbianas presentes em água doce são incapazes de sobreviver sob estresse osmótico (MADIGAN *et al.*, 2002). Por conseguinte, altas concentrações de sal apresentam uma influencia negativa nos sistemas biológicos de tratamento de efluentes, afetando processos importantes como remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo (DALMACIJA *et al.*, 1996). Em geral, a maioria dos estudos envolvendo o efeito da salinidade sobre esses processos reporta que a inibição por sal ocorre quando a concentração do mesmo é superior a 1% (m/v), isto é, 10 g/L (PANSWAD *et al.*, 1999; UYGUR e KARGI, 2004; WU *et al.*, 2008).

No presente momento, há um interesse crescente no uso da tecnologia de grânulos aeróbios para o tratamento de águas residuárias. Esse processo apresenta inúmeras vantagens quando comparado com o processo convencional de lodos ativado a saber: excelentes propriedades de sedimentação, estrutura compacta e capacidade de suportar choques de carga orgânica e tóxica (BEUN *et al.*, 1999). Somando-se a todas essas características, os grânulos aeróbios propiciam boa retenção de biomassa no reator. O processo de granulação aeróbio ainda apresenta a vantagem de não necessitar de superfícies para o crescimento do biofilme e, por conseguinte, dispensa o uso de materiais suporte. Desenvolvida no final da década passada (HEIJNEN *et al.*, 1998), um

número expressivo de estudos vem sendo realizados com o intuito de explorar os potenciais da tecnologia de lodo granular aeróbio para o tratamento de águas residuárias com alta concentração de compostos orgânicos (CHEN *et al.*, 2008, SCHWARZENBECK *et al.*, 2005, MOY *et al.*, 2002), compostos aromáticos tóxicos (LIU *et al.*, 2009, ZHU *et al.*, 2008, JIANG *et al.*, 2002), metais pesados (XU e LIU, 2008, YAO *et al.*, 2008, LIU *et al.*, 2002) e corantes têxteis (SUN *et al.*, 2008). Em adição, a tecnologia de grânulos aeróbios foi extensivamente aplicada para a remoção de nutrientes (DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004; DE KREUK *et al.*, 2005c, MOSQUERA-CORRAL, 2005, QIN e LIU, 2006). Entretanto, somente alguns estudos referentes ao efeito da salinidade sobre o lodo granular aeróbio foram reportados na literatura. FIGUEROA *et al.* (2008) investigaram o tratamento de efluente de indústria de enlatados de peixe contendo alta concentração de sal (de até 30 gNaCl/L) em um reator de lodo granular aeróbio operado em bateladas sequenciais. Esses autores observaram que a biomassa granular conseguiu suportar as elevadas concentrações de sal impostas ao sistema. Uma vez que os grânulos já estavam formados, a presença de sal não ocasionou efeito adverso na operação do reator. Outro estudo referente ao efeito de sal sobre grânulos aeróbios foi realizado por Li e WANG (2008). Baseados em análises termogravimétricas, esses autores investigaram o efeito de componentes orgânicos e inorgânicos na estrutura do lodo granular aeróbio em baixas (1% m/v) e altas (5% m/v) concentrações de sal. Nesse estudo, observou-se que a superfície dos grânulos apresentou-se de maneira mais regular em altos níveis de salinidade, condição em que os grânulos também cresceram mais rapidamente.

Esses dois estudos referentes ao efeito salino no processo de lodo granular aeróbio reportados até então na literatura não apresentam nenhuma informação a respeito da dinâmica da comunidade microbiana com o aumento da concentração salina. Nesse contexto, o principal objetivo dessa pesquisa foi investigar o efeito do aumento do teor de sal nos principais processos biológicos ocorrendo em um sistema de grânulos aeróbios e relacioná-lo com as observações da dinâmica das populações microbianas. Para tanto, fragmentos dos genes 16S rRNA e *amoA*, amplificados por PCR, foram analisados por meio da técnica DGGE. Os produtos de PCR obtidos a partir do DNA genômico e do rRNA após transcriptase reversa foram comparados para identificar as bactérias presentes e as bactérias metabolicamente ativas no sistema. Além disso, lançou-se mão da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) tanto para a identificação e quantificação de populações específicas e quanto para validar os

resultados baseados em PCR. Esse é um dos primeiros trabalhos de ecologia microbiana molecular envolvendo o estudo de micro-organismos metabolicamente ativos em um processo de remoção simultânea de nitrogênio e fósforo.

6.2. *Materiais e Métodos*

6.2.1. *Unidade experimental e condições de operação*

Um reator em batelada sequencial (SBR) de 2,7 L, com diâmetro interno de 5,6 cm e altura total de 90 cm, foi utilizado nessa pesquisa. O reator foi inoculado com lodo granular aeróbio oriundo de um sistema de escala piloto, integrante de uma estação de tratamento de águas residuárias (EPE, Holanda). Ar foi introduzido por meio de um difusor poroso, colocado na base do reator. O fluxo de ar foi mantido constante em 4 L/min e a temperatura do sistema foi de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. A concentração de oxigênio dissolvido (OD) e o pH foram medidos continuamente. O nível OD foi mantido superior a 90% em relação à saturação do ar a 20°C e o pH foi ajustado continuamente para $7,0 \pm 0,2$ por meio da dosagem de soluções de NaOH 1 M ou HCl 1M. Para tornar possível a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo no mesmo reator, o mesmo foi operado em ciclos de 3 h, período durante o qual o reator foi submetido a condições anaeróbias e aeróbias alternadas. Cada ciclo do SBR foi dividido em 4 fases: 60 min de enchimento em condições anaeróbias a partir da base do reator, em regime *plug-flow* através do leito de lodo, 112 min de aeração, 3 min de sedimentação e 5 min de descarte do efluente (sobrenadante). O efluente foi descartado por uma saída situada próxima ao meio do reator, fazendo com que o percentual de troca de volume fosse de 56%. Por conseguinte, o tempo de retenção hidráulica (TRH) foi de 5,3 h. O meio sintético de alimentação foi composto por duas soluções (A e B), com as seguintes composições: (A) Acetato de sódio (NaAc) 63 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,6 mM, KCl 4,7 mM e (B) NH_4Cl 35,4 mM, K_2HPO_4 4,2 mM, KH_2PO_4 2,1 mM e 10 ml/L de uma solução de elementos traço (VISHNIAC e SANTER, 1957). A cada ciclo, 150 mL de cada meio era misturado com 1200 mL de água. O sistema foi operado por 449 dias e sua operação foi dividida em quatro fases distintas, durante as quais o reator foi submetido a diferentes concentrações de sal (Tabela 6.1). O tempo de retenção de sólidos (TRS) foi mantido em aproximadamente 30 dias por meio da remoção periódica de lodo do reator.

Tabela 6.1: Fases experimentais do SBR de lodo granular aeróbio em função da concentração salina.

| Fase | NaCl (g/L) | Tempo de operação (dias) |
|------|------------|--------------------------|
| I | 0 | 15 |
| II | 11 | 317 |
| III | 22 | 71 |
| IV | 33 | 46 |

6.2.2. Experimentos em batelada

Diversos testes em batelada foram realizados para investigar o efeito a curto prazo de sal nos processos de remoção de nitrogênio e fósforo. Para a realização desse conjunto de experimentos, grânulos foram coletados do reator no último dia de operação de cada fase. A biomassa foi coletada do reator imediatamente após a fase de alimentação, isto é, após acúmulo de polihidroxialcanoatos por organismos acumuladores de polifosfato (PAO). Os grânulos foram colocados em uma peneira e lavados com água. Quantidades iguais de grânulos (com base em massa úmida) foram introduzidas em diferentes frascos de 250 mL, preenchidos com tampão Tris-HCl (pH 7,0) contendo os mesmos minerais do meio sintético de alimentação (com exceção de acetato) e diferentes concentrações de NaCl (variando de 0 a 40 g/L). Os frascos foram aerados por meio de difusores de ar e os experimentos em batelada duraram 2 horas. Amostras líquidas foram coletadas de cada frasco ao longo do experimento em intervalos de tempo definidos a priori, geralmente variando de 5 a 20 min. Durante a amostragem, sólidos não foram removidos dos frascos. Para evitar problemas relacionados com a correção de volume para o cálculo da concentração de biomassa, a determinação de taxas específicas de consumo de substrato não se baseou na concentração de biomassa e sim na quantidade total de biomassa (expressa em g), a qual foi constante durante os testes em batelada. De maneira similar, ao invés de concentrações, levou-se em consideração a quantidade total (em mg) de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ e $\text{NH}_4^+\text{-N}$ presente em determinado tempo de experimento, a qual foi obtida pela soma da quantidade de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ e $\text{NH}_4^+\text{-N}$ remanescente no frasco e a quantidade removida pela amostragem. Taxas específicas de consumo de substrato foram determinadas dividindo-se a quantidade total de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ e $\text{NH}_4^+\text{-N}$ em determinado tempo pela quantidade de sólidos suspensos voláteis (SSV).

6.2.3. Medições analíticas

Amônio, nitrato e nitrito foram quantificados por meio de análise por injeção em fluxo (QuikChem 8500, Lachat Instruments, Inc.). Fosfato foi determinado com o auxílio de testes de cubeta da Hach Lange (LCK 350). A concentração de biomassa foi determinada de acordo com métodos padrão (APHA, 1998).

6.2.4. Extração de ácidos nucleicos

Amostras para extração de DNA e RNA foram coletadas do reator em diferentes de semanas de operação das fases II a IV e armazenadas a -80°C. Nenhuma amostra foi coletada durante a fase I. No total, cinco ou três amostras de cada fase experimental foram levadas em consideração para análise baseada em DNA e RNA (cDNA), respectivamente. A biomassa foi centrifugada e a mesma quantidade da mesma foi introduzida em tubos de extração de DNA/RNA. As extrações de DNA e RNA foram realizadas, respectivamente, com os kits UltraClean Microbial DNA Isolation Kit e UltraClean Microbial RNA Isolation Kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA e RNA extraídos foram avaliados em gel de agarose 1% (m/v) e armazenados a -20°C antes de ser utilizados nas análises. Uma quantidade de aproximadamente 10 ng de DNA extraído foi utilizada como modelo para a PCR, na qual foram utilizados *primers* específicos para os genes 16S rRNA e *amoA* (que codifica para a subunidade A da enzima amônia monooxigenase em AOB).

6.2.5. Transcriptase reversa de RNA e amplificação por PCR

A transcriptase reversa do RNA para cDNA foi realizada por meio do kit iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, CA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O procedimento de transcriptase reversa foi realizado para duas amostras de cada fase experimental, com exceção da fase I. Foi utilizado 1 µL (80 a 100 ng) do padrão de RNA nessa etapa. O conjunto de *primers* usado para a amplificação do gene 16S rRNA foi BAC341f (com grampo de GC contendo 40-bp) e BAC907rM (M=A/C) (SCHÄFER e MUYZER, 2001). Utilizou-se 0,5 µL de ambos o DNA e cDNA como padrões para as reações de amplificação. O programa de PCR para o gene 16S rRNA

incluiu uma fase de pré-resfriamento do termociclador a 4°C durante 15 min e desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 32 ciclos composto das seguintes fases: desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 57°C por 40 s e extensão a 72°C por 40 s. Após o último ciclo, uma etapa de extensão final a 72°C por 30 min foi realizada e a amplificação terminou a 12°C. Para a amplificação do gene *amoA*, os *primers* utilizados foram *amoA*-1F-GC e *amoA*-2R (HORNEK *et al.*, 2006). O ciclo de amplificação do gene *amoA* compreendeu uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, seguida de 35 ciclos compostos pelas seguintes etapas: desnaturação de 30s a 94°C, anelamento de 40 s a 60°C e extensão de 40 s a 72°C. Uma etapa final de extensão foi realizada por 30 min a 72°C. Os produtos de PCR de ambos os genes (16S rRNA e *amoA*) foram avaliados em gel de agarose 1% (m/v).

6.2.6. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), excisão e eluição de bandas de DGGE, sequenciamento de DNA e análise filogenética

A técnica DGGE, a excisão das bandas do gel, o sequenciamento das amostras e a análise filogenética das sequências dos genes 16S rRNA e *amoA* foram realizados conforme descrito no capítulo anterior, especificamente no item 5.2.4.

As sequências determinadas nesse estudo foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: JF276761-JF276773 (para as sequências de 16S rRNA).

6.2.7. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Amostras de biomassa foram coletadas do reator durante as fases II – IV. Os grânulos foram esmagados de forma cuidadosa, lavados com tampão fosfato-salino (PBS) 1× e imediatamente fixados em solução de paraformaldeído 4% por 3 h a 4°C. Após a etapa de fixação, as células foram centrifugadas a 13000 g por 1 min, lavadas duas vezes em PBS 1× e ressuspensas em solução de etanol/PBS (1:1) para armazenamento a -20 °C. A hibridização e a observação das células hibridizadas foram realizadas conforme descrito no capítulo anterior, item 5.2.5. A quantificação das células hibridizadas com sondas marcadas com diferentes fluorocromos (Cy3 e Fluos) e a determinação da fração do sinal dessas sondas específicas relativa ao sinal observado com a combinação de sondas para a comunidade bacteriana geral (marcada com Cy5)

foi realizada por meio de um programa de análise quantitativa (Leica QWin). Pelo menos 10 imagens gravadas das amostras foram levadas em consideração para a análise quantitativa. As sondas oligonucleotídicas, marcadas com diferentes fluorocromos (Cy3, Fluos e Cy5), estão listadas na Tabela 6.2. A combinação PAOmix (PAO642, PAO 651 e PAO846) foi utilizada para detectar *Candidatus* Accumulibacter. Para diferenciar os subgrupos de PAO (PAOI e PAOII), sondas específicas desenvolvidas por FLOWERS *et al.* (2009) foram utilizadas. Organismos pertencendo ao grupo *Candidatus* Competibacter foram detectados com a combinação GAOmix (GAOQ431 e GAOQ989).

Tabela 6.2: Sondas oligonucleotídicas e grupos microbianos alvo.

| Sonda | Sequência (5'-3') | Grupo alvo | Combinação de sondas | Referência |
|-------------|----------------------------|--|----------------------|-------------------------------|
| PAO 462 | CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC | PAO cluster ^a | PAOmix | Crocetti <i>et al.</i> (2000) |
| PAO 651 | CCCTCTGCCAAACTCCAG | PAO cluster ^a | | Crocetti <i>et al.</i> (2000) |
| PAO 846 | GTTAGCTACGGCACTAAAAGG | PAO cluster ^a | | Crocetti <i>et al.</i> (2000) |
| Acc-I-444 | CCCAAGCAATTTCTTCCCC | Clade IA | GAOmix | Flowers <i>et al.</i> (2009) |
| Acc-II-444 | CCCGTGCAATTTCTTCCCC | Clade IIA | | Flowers <i>et al.</i> (2009) |
| GAO Q431 | TCCCCGCCTAAAGGGCTT | Competibacter phosphatis ^b | | Crocetti <i>et al.</i> (2002) |
| GAO Q989 | TTCCCCGGATGTCAAGGC | Competibacter phosphatis ^b | | Crocetti <i>et al.</i> (2002) |
| Nso 190 | CGATCCCCTGCTTTTCTCC | Oxidadores de amônio β -proteobacteria | - | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Ntspa 662 | GGA ATT CCG CGC TCC TCT | Gênero <i>Nitrospira</i> | - | Daims <i>et al.</i> (2001) |
| Nit 1035 | CCT GTG CTC CAT GCT CCG | <i>Nitrobacter spp.</i> | - | Wagner <i>et al.</i> (1996) |
| Neu 653 | CCC CTC TGC TGC ACT CTA | Maioria halofílicos e halotolerantes <i>Nitrosomonas spp.</i> | - | Wagner <i>et al.</i> (1995) |
| Nso 1225 | CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA | <i>Nitrosomonas</i> | - | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| EUB 338 I | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | Maioria das bactérias | EUBmix | Amann <i>et al.</i> (1990b) |
| EUB 338 II | GCAGCCACCCGTAGGTGT | <i>Planctomycetes</i> | | Daims <i>et al.</i> (1999) |
| EUB 338 III | GCTGCCACCCGTAGGTGT | Verrucomicrobiales | | Daims <i>et al.</i> (1999) |

^a Relacionado com *Rhodocyclus* (*Candidatus* Accumulibacter phosphatis)

^b *Candidatus* Competibacter phosphatis

6.3. Resultados

6.3.1. Efeito a longo e curto prazo de sal nos processos de nitrificação/desnitrificação e remoção de fosfato

A Figura 6.1 apresenta os perfis de concentração de amônio, nitrito e nitrato obtidos durante as medições ao longo do ciclo de operação no final das fases I – IV. A primeira amostra foi coletada 2 min após o início da fase de aeração para garantir a homogeneização da mesma. Como se pode observar, a concentração de amônio após o período de alimentação anaeróbio foi menor do que o esperado, levando-se em consideração a concentração de amônio afluente e a diluição do afluente com o líquido remanescente no reator. Esse fato foi atribuído à adsorção de amônio, fenômeno investigado em um estudo separado não descrito nesse documento (Bassin *et al.*, 2011c, Lin *et al.*, 2012). Além disso, as concentrações de nitrito e nitrato mostradas no instante 0 do ciclo foram calculadas com base em suas concentrações no final do ciclo e na diluição ocorrida no reator. Em virtude da alimentação ter sido realizada em regime *plug-flow*, tanto o nitrato quanto o nitrito remanescentes do ciclo anterior foram empurrados para cima durante essa fase, evitando o seu contato com a biomassa e, por conseguinte, o crescimento de organismos heterotróficos desnitrificantes que poderiam utilizar a matéria orgânica afluente para desnitrificar esses compostos nitrogenados.

A eficiência de remoção de amônio não foi afetada mesmo na maior concentração de sal empregada (33 gNaCl/L). Todo amônio foi nitrificado em menos de 60 min durante a fase de aeração em todas as condições de salinidade. O principal produto da nitrificação durante as fases I – III foi nitrato. Na fase III, ocorreu acúmulo de nitrito durante o ciclo de operação, mas o mesmo foi subsequentemente oxidado a nitrato pelas NOB ou levado a N₂ por organismos acumuladores de polifosfato e/ou organismos acumuladores de glicogênio desnitrificantes. Durante a operação na condição de 33 gNaCl/L, uma quantidade significativa de nitrito de até 20 mgN/L acumulou, indicando que as NOB foram mais sensíveis à alta salinidade imposta ao reator em comparação com as AOB.

Contrariamente à nitrificação, a remoção de fosfato foi severamente afetada pelo aumento da concentração de sal. Tanto a liberação de fosfato durante a fase anaeróbia quanto o consumo do mesmo na fase aeróbia subsequente diminuíram com o incremento da concentração de sal de 11 a 22 g/L. Nas concentrações salinas de 11 e 22

gNaCl/L, um decréscimo na taxa de remoção de fosfato pode ser facilmente observado durante o ciclo de operação, exatamente no período em que ocorreu o acúmulo de altas concentrações de nitrito, conforme mostrado nas Figuras 6.1b e 6.1c. Quando a concentração de nitrito começou a diminuir, a taxa de remoção de fosfato aumentou novamente. A liberação e consumo de fosfato foram completamente interrompidos durante a operação em estado estacionário na fase IV, quando a concentração salina foi de 33 gNaCl/L. Durante esse período, ocorreu acúmulo de nitrito e o mesmo não foi subsequentemente oxidado a nitrato pelas NOB. Ademais, a desnitrificação pelos organismos heterotróficos restantes no reator (organismos acumuladores de glicogênio desnitrificantes) foi praticamente desprezível.

Experimentos em batelada foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito a curto prazo de sal nos processos de nitrificação/desnitrificação e remoção de fosfato em diferentes concentrações salinas (0, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 gNaCl/L). As taxas específicas de consumo de amônio e fosfato obtidas nesses testes foram expressas como uma fração da taxa máxima obtida em cada condição salina (Figura 6.2). No teste no qual se utilizou biomassa coletada no final da fase I, não aclimatada ao sal, a máxima taxa de remoção de fosfato foi obtida quando sal não foi adicionado ao meio (Figura 6.2a). Mesmo em baixas concentrações salinas (5 gNaCl/L), a taxa específica de consumo de fosfato correspondeu a somente 25% da taxa máxima obtida no teste sem adição de sal. Quando a concentração de sal variou de 10 a 40 gNaCl/L, o consumo de fosfato por PAO cessou completamente. Pelo contrário, foi observada uma liberação adicional de fosfato.

Nos testes com biomassa coletada no final da fase II (aclimatada a 11 gNaCl/L) e fase III (aclimatada a 22 gNaCl/L), a taxa específica de consumo de fosfato foi obtida na concentração de 10 gNaCl/L. No teste com biomassa adaptada a 11 gNaCl/L, em particular, a taxa de remoção de fosfato permaneceu praticamente constante quando a concentração salina variou de 0 a 10 gNaCl/L. Já em concentrações salinas mais elevadas, tais como 30 gNaCl/L, a taxa de remoção de fosfato foi praticamente nula. No teste utilizando-se biomassa adaptada a 22 g/L de NaCl, a taxa específica de remoção de fosfato obtida nas concentrações de 0, 5 e 15 g/L de sal foram praticamente as mesmas, sendo observado uma queda significativa de atividade quando a salinidade foi variada de 15 a 40 gNaCl/L. No teste no qual foi utilizada biomassa aclimatada a 33 gNaCl/L, não ocorreu consumo de fosfato em nenhuma concentração testada e a liberação de fosfato foi ínfima.

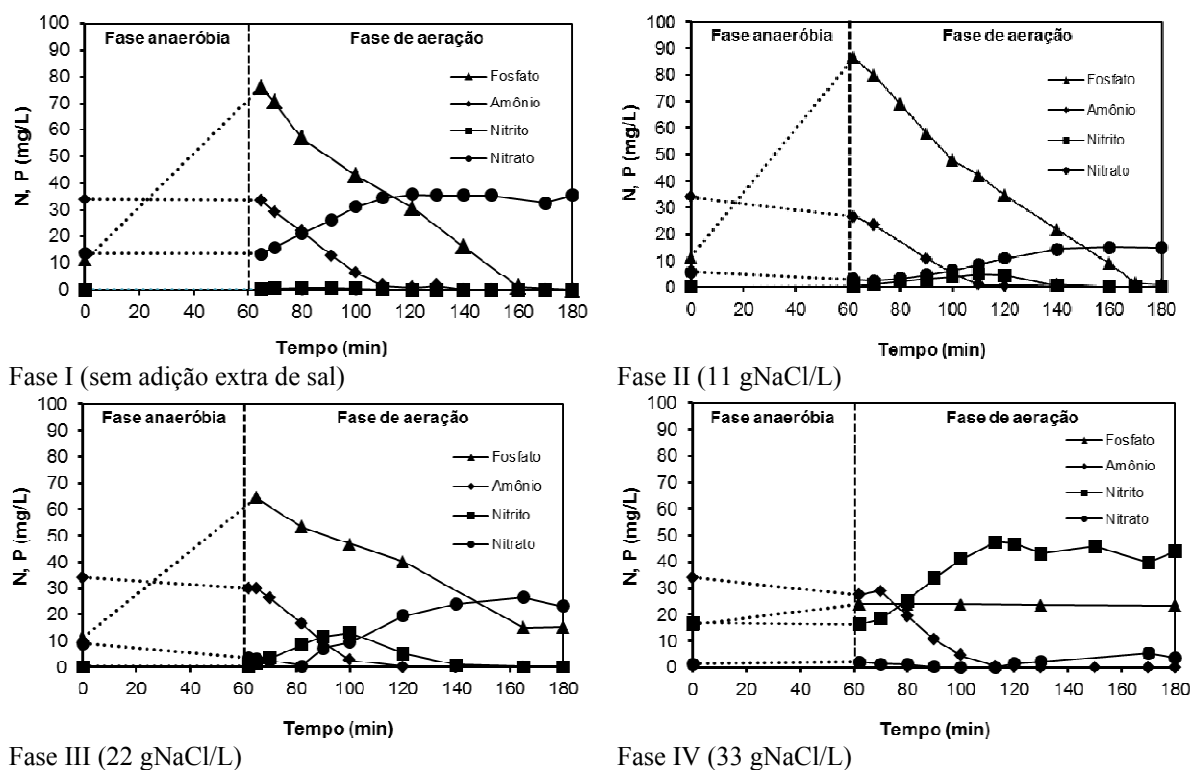


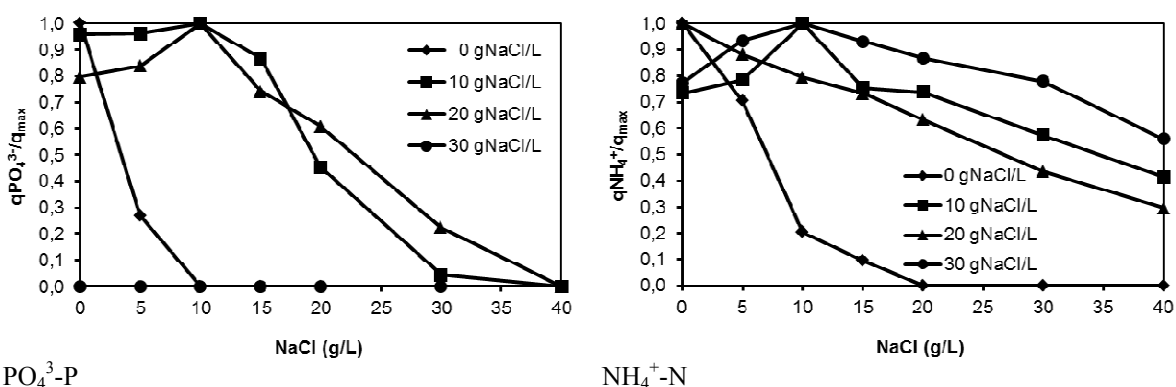
Figura 6.1: Concentrações de amônio, nitrito e fosfato obtidas nos testes de ciclo realizados no final das fases I – IV. As concentrações de amônio e fosfato mostradas no início do ciclo (instante 0) foram calculadas com base na concentração afluente ($60 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/L}$ e $20 \text{ mgPO}_4^{3-}-\text{P/L}$) e na diluição no reator com a alimentação. As concentrações de nitrito e nitrato no instante 0 foram calculadas levando-se em consideração as suas concentrações no final do ciclo e na diluição no reator.

A taxa específica de consumo de amônio foi reduzida de forma substancial em concentrações de sal acima de 10 g/L . Tal constatação é especialmente válida para o caso do teste em que biomassa não adaptada ao sal foi utilizada, no qual o consumo de amônio foi observado em concentrações de sal excedendo 20 g/L foi nulo (Figura 6.2b). Nos testes utilizando biomassa aclimatada a 11 e 33 gNaCl/L , as máximas taxas específicas de consumo de amônio foram observadas na concentração de sal de 10 g/L . Para o teste no qual utilizou-se biomassa adaptada a 22 g/L , a máxima taxa específica de consumo de amônio foi obtida quando o meio de cultura foi desprovido de sal.

As concentrações de nitrito e nitrato também foram quantificadas ao longo dos experimentos em batelada. O principal produto da nitrificação em todas as concentrações salinas nos testes utilizando biomassa adaptada a 0 e 11 gNaCl/L foi nitrate, enquanto que as concentrações de nitrito foram inferiores a 2 mgN/L . Nos testes utilizando-se grânulos aclimatados a 22 e 33 gNaCl/L , nitrito passou a ser o principal produto do processo nitrificante, alcançando concentrações de até 9 mgN/L (no caso do

teste usando biomassa adaptada a 22 gNaCl/L) e 20 mgN/L (no caso do experimento utilizando grânulos aclimatados a 33 gNaCl/L).

De acordo com o balanço de massa para o nitrogênio, realizado levando-se em consideração as concentrações dos compostos nitrogenados quantificados ($\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ e $\text{NO}_2^-\text{-N}$), a maior atividade desnitrificante foi observada no experimento com biomassa aclimatada a 11 gNaCl/L, no qual a remoção de nitrogênio situou-se na faixa compreendida entre 70 e 85% para todas as concentrações salinas testadas. No experimento utilizando biomassa adaptada a 22 e 33 gNaCl/L, a remoção máxima de nitrogênio obtida ficou em torno de 45% e 20%, respectivamente.



$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$

$\text{NH}_4^+\text{-N}$

Figura 6.2: Efeito a curto prazo da salinidade nas taxas específicas de consumo de fosfato e amônio nos testes com biomassa adaptada a 0 gNaCl/L, 11 gNaCl/L, 22 gNaCl/L e 33 gNaCl/L.

6.3.2. Análise da comunidade microbiana por meio de DGGE dos fragmentos do gene *16S rRNA*

A comunidade microbiana do reator de lodo granular foi investigada por meio da análise DGGE dos fragmentos do gene 16S rRNA. A Figura 6.3 apresenta o padrão de bandas referente à comunidade microbiana das fases II – IV. A extração do DNA começou a ser realizada depois de 275 dias a partir do início da operação do reator, o qual já havia sendo aclimatado a 11 gNaCl/L por um longo tempo. Nenhuma amostra foi coletada durante a fase I, no qual o meio sintético de alimentação foi desprovido de NaCl.

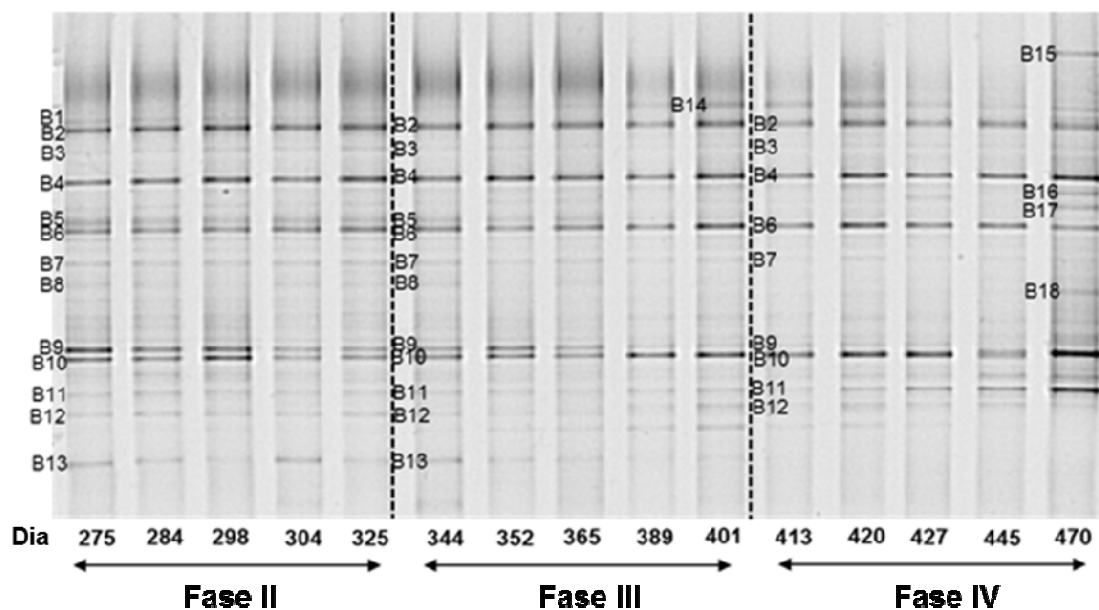


Figura 6.3: Gel de DGGE ilustrando a diversidade de micro-organismos nas fases II (11 gNaCl/L), III (22 gNaCl/L) e IV (33 gNaCl/L). Cinco amostras representativas das fases II-IV foram levadas em consideração nessa análise. Os dias de operação no qual as amostras analisadas foram coletadas estão indicados na parte inferior do gel.

O perfil de DGGE indica uma grande diversidade de bactérias, refletida pelo número considerável de bandas. Grande parte das bandas dominantes esteve presente durante todo o período experimental, sendo que poucas variações foram observadas. O padrão derivado do DNA das amostras do reator durante as fases II-IV resultou em 18 bandas. Algumas dessas bandas foram excisadas de diferentes canaletas do gel e o resultado do sequenciamento mostrou que sua sequência de nucleotídeos foi a mesma. A maioria das bandas enumeradas foi sequenciada satisfatoriamente e utilizada para análise filogenética. Entretanto, algumas bandas, tais como B1, B2, B3 e B16, apresentaram resultados de sequenciamento ambíguos e não foram levadas em consideração nas análises de filogenia. Algumas dessas bandas, particularmente a B1, B2 e B3, foram excisadas de três diferentes géis de DGGE contendo as mesmas amostras e em seguida sequenciadas, embora todos os resultados do sequenciamento não tenham sido satisfatórios. Por conseguinte, foram negligenciados.

O padrão de bandas referente à fase II resultou em aproximadamente 13 bandas, designadas por B1-B13. Essas bandas permaneceram até o final dessa fase experimental, o que permite inferir que não ocorreu variação da composição da comunidade microbiana durante esse período. Como pode ser observado a partir da árvore filogenética (Figura 6.4), algumas bactérias interessantes se fizeram presentes no consórcio microbiano, as quais provavelmente estiveram diretamente relacionadas às

principais conversões biológicas que estavam ocorrendo no sistema. A sequência obtida a partir da banda B9 apresentou alta similaridade com *Candidatus Accumulibacter*, principal organismo responsável pelo processo de remoção biológica de fósforo. A sequência capturada a partir da banda B8 foi bastante similar a apresentada por *Nitrosomonas* sp., representante da população de AOB. Já a sequência da banda B13 foi afiliada com *Nitrospira* sp., integrante da comunidade de NOB. As bandas B10 e B11 foram agrupadas com o grupo *Denitromonas*. As bandas B5, B6 e B7 foram relacionadas com bactérias não cultivadas encontradas em sistemas de remoção biológica de fósforo pertencentes ao filo Bacteroidetes. As Bandas B5 e B6, em particular, apresentaram mobilidade similar no gel de DGGE, apresentando sequências de nucleotídeos idênticas. A banda B4 pertenceu à família Cytophagaceae e a banda B12 esteve relacionada com *Dokdonella soli* (γ -proteobacteria).

Na fase III, quando a concentração de sal foi aumentada para 22 g/L, as bandas B5, B7 e B9 tenderam a desaparecer, apresentando intensidades menores quando comparadas com aquelas da fase II. Uma nova banda (B14), cuja sequência apresentou alta similaridade com uma bactéria não cultivada da família Flavobacteriaceae e detectada em ambiente salino, apareceu significativamente somente no início da fase III, provavelmente devido à sua afinidade por concentrações salinas mais elevadas.

Quando a concentração salina foi aumentada de 22 a 33 g/L, na transição da fase III para a fase IV, as bandas B8 e B13 não foram mais detectadas. Como observado na fase III, a intensidade da banda B9 continuou a diminuir, estando presente somente no início da fase IV. Em contrapartida, a intensidade da banda B11 aumentou durante a operação a 33 gNaCl/L. Curiosamente, a última amostra mostrada no gel, coletada do reator no final da fase IV (470° dia de operação do reator), apresentou novas bandas (B15, B16, B17 and B18). A banda 16 não apresentou resultados satisfatórios de sequenciamento, conforme descrito anteriormente. A banda B17 apresentou sequência similar a *Denitromonas* sp., igualmente ao ocorrido com a banda B11. A banda B18, também pertencente ao grupo *Denitromonas*, apresentou sequência similar a um organismo não cultivado isolado de uma cultura desnitrificante. A Banda 15 foi relacionada a uma bactéria não cultivada pertencente a família Cryomorpaeae, isolada de água do mar superficial.

Deve-se mencionar que em outros géis de DGGE realizados previamente, nos quais somente amostras correspondentes às fases II e III foram analisadas, observou-se bandas que não apareceram no gel mostrado na Figura 6.3. Todas essas bandas extras a

que se refere, detectadas em géis anteriores, representaram a população de organismos acumuladores de glicogênio (GAO) e apareceram na parte inferior do gel de DGGE. Esse comportamento indica que sequência nucleotídica dessas bactérias apresenta um conteúdo de G/C maior que as sequências dos outros micro-organismos no gel. Dessa forma, é possível que as bandas representativas da população de GAO tenham migrado para fora do gel mostrado na Figura 6.3. Entretanto, embora esses micro-organismos não estivessem presentes no gel de DGGE mostrado nesse documento, os mesmos foram levados em consideração para análise filogenética, especialmente devido ao fato de terem se tornado dominantes, conforme será descrito posteriormente no item 6.3.5.

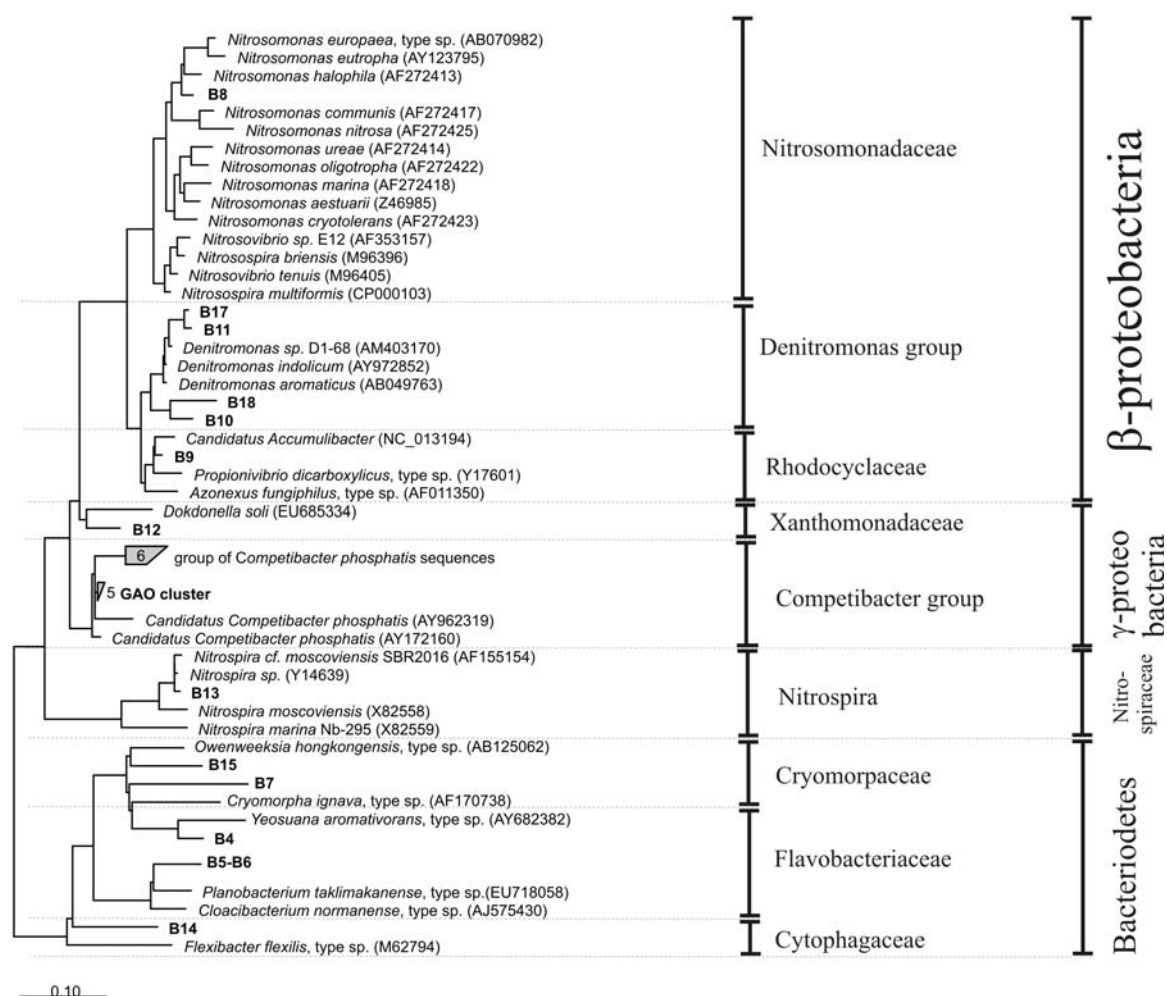


Figura 6.4: Análise filogenética das sequências de 16S rDNA excisadas do gel de DGGE. As sequências determinadas nessa pesquisa estão marcadas em negrito. A barra de escala indica uma diferença de 10% entre as sequências.

6.3.3. Análise comparativa do DGGE derivado DNA (diversidade) e RNA (funcionalidade)

Uma vez que a estrutura da comunidade microbiana permaneceu bastante estável ao longo da operação reator e levando-se em consideração que algumas bactérias poderiam estar presentes na estrutura dos grânulos mesmo sem apresentarem atividade devido ao fato do tempo de retenção de sólidos ter sido relativamente longo, uma análise para comparar a diversidade e a atividade da comunidade microbiana foi realizada. A diversidade está relacionada com a presença de populações bacterianas que estão acima do limite de detecção de DGGE. A partir do número de bandas derivadas da análise DGGE do DNA, pode-se inferir a diversidade microbiana de uma amostra. Por sua vez, a atividade está relacionada com as bandas de DGGE derivadas do RNA, as quais refletem as principais populações de bactérias ativas (DAR *et al.*, 2007). Nesse contexto, uma análise do RNA foi conduzida para avaliar quais grupos de micro-organismos estiveram realmente metabolicamente ativos nos grânulos aeróbios. Os perfis de DGGE obtidos com os fragmentos do gene 16S rRNA amplificados por PCR e com fragmentos desse mesmo gene transcritos reversamente em cDNA foram comparados nessa análise de diversidade versus funcionalidade (Figura 6.5).

Os *fingerprints* obtidos na análise de DGGE de ambos os fragmentos do gene 16S rRNA amplificados por PCR e os fragmentos de 16S rRNA após transcrição reversa foram bastante similares. A maioria das bandas do perfil de DGGE dos produtos de PCR do gene 16S rRNA também foi detectada no perfil derivado do RNA (cDNA), embora a intensidade das bandas tenha diferido. Nessa análise, duas amostras representativas das fases II-IV foram levadas em consideração. Os respectivos dias de operação do reator nos quais cada amostra foi coletada estão indicados na parte inferior do gel. As bandas foram numeradas de B1 – B13, de forma similar ao realizado no gel de DGGE mostrado anteriormente (Figura 6.3). Em concordância à análise realizada no gel anterior, os resultados de sequenciamento mostraram que os micro-organismos detectados em cada banda específica, nas suas respectivas posições, eram os mesmos nos dois géis. A única exceção se refere às bandas B9 e B10, que trocaram de posição em relação ao gel de DGGE prévio. Foi observado também que as bandas excisadas a partir de diferentes canaletas do gel apresentaram sequências idênticas.

A intensidade de algumas bandas, tais como B1, B2, B3, B4 e B6 diminuíram do perfil derivado do DNA para o perfil do cDNA. Em contrapartida, a intensidade da

banda B8 (relacionada com *Nitrosomonas* sp.) aumentou do perfil do DNA para o perfil do cDNA. Esse resultado sugere que esses micro-organismos apresentaram alta atividade metabólica. A intensidade da banda referente a *Candidatus Accumulibacter* (B10 e não B9 como no gel de DGGE anterior) foi também superior do perfil de cDNA em comparação com o derivado do DNA, particularmente quando se considera as fases II e III. Durante a fase IV, a banda B10 foi praticamente imperceptível, resultado que vai ao encontro daquele obtida com a análise de DGGE anterior. As bandas B11-B13 não apresentam resultados expressivos no gel mostrado na Figura 6.5.

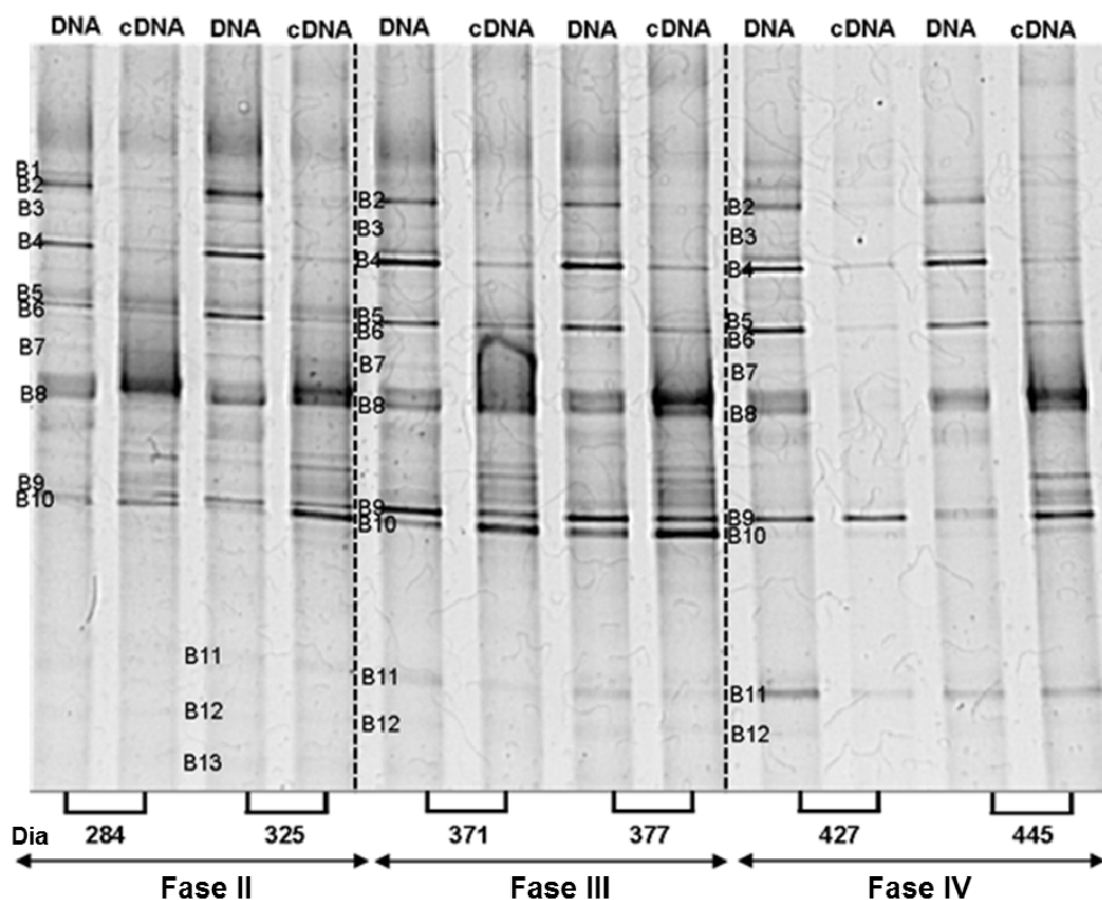


Figura 6.5: Perfil de bandas derivados do DNA e RNA (cDNA). Duas amostras representativas das fases II – IV foram selecionadas para análise diversidade versus funcionalidade. As bandas de mesmo número foram excisadas de diferentes canaletas e apresentaram sequências idênticas.

6.3.4. Estrutura da comunidade de bactérias oxidadoras de amônio (AOB)

No intuito de investigar com maior riqueza de detalhes o perfil da comunidade de AOB ao longo dos regimes de salinidade submetido ao sistema de lodo granular

aeróbio, realizou-se uma análise de DGGE utilizando *primers* específicos para o gene *amoA*. O padrão de bandas mostrou que apenas uma banda dominante foi observada em todas as fases experimentais (Figura 6.6). Os resultados do sequenciamento indicaram que essa banda apresentou sequência bastante similar a *Nitrosomonas* sp., resultado similar àquele obtido com a análise DGGE dos fragmentos do gene 16S rRNA. As bandas de pequena intensidade apresentaram resultados de sequenciamento iguais à banda dominante.

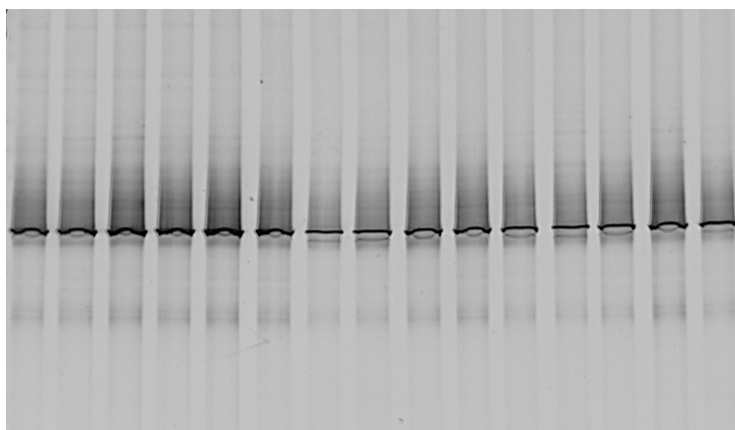


Figura 6.6: Diversidade de AOB avaliado por meio de DGGE com fragmentos do gene *amoA*.

6.3.5. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Diversas sondas oligonucleotídicas foram utilizadas para a análise FISH, conduzida com o objetivo de complementar os resultados obtidos por meio da análise DGGE. A técnica de FISH também foi realizada para a quantificação de algumas populações bacterianas específicas presentes no reator ao longo das fases II-IV.

Os resultados de FISH indicaram que praticamente todo o conjunto microbiano presente no reator foi integrante da comunidade de PAO e GAO (Figura 6.7). Das fases II a IV, a fração de PAO na comunidade total de bactérias decresceu de forma significativa (Figura 6.7a-e). A análise quantitativa (Figura 6.8) das células de PAO (marcadas com fluorocromo Cy3, em vermelho) e de GAO (marcadas com Fluos, em verde) e a determinação da fração dessas populações em relação à comunidade bacteriana total (marcada com Cy5, em azul) revelaram que a proporção de PAO e GAO no total de bactérias foi similar durante a fase II. Na fase III, no entanto, a fração de PAO decresceu, enquanto que a população de GAO aumentou. Uma semana após o

início da fase IV, a população de GAO se tornou ainda mais dominante (Figura 6.7c). Somente algumas células de PAO ainda estiveram presentes após a segunda semana de operação nesse período no qual a concentração salina foi de 33 gNaCl/L (Figura 6.7d) e nenhum sinal positivo foi detectado no final da mesma (Figura 6.7e). As bactérias nitrificantes (AOB e NOB) foram detectadas em quantidade bastante reduzida em comparação com as populações de PAO+GAO (Figura 6.7f). A análise FISH também mostrou que quase toda a população de PAO pertenceu ao subgrupo I (PAO I), capaz de usar nitrato e nitrito como aceptores de elétrons para o consumo anóxico de fosfato (FLOWERS *et al.*, 2009).

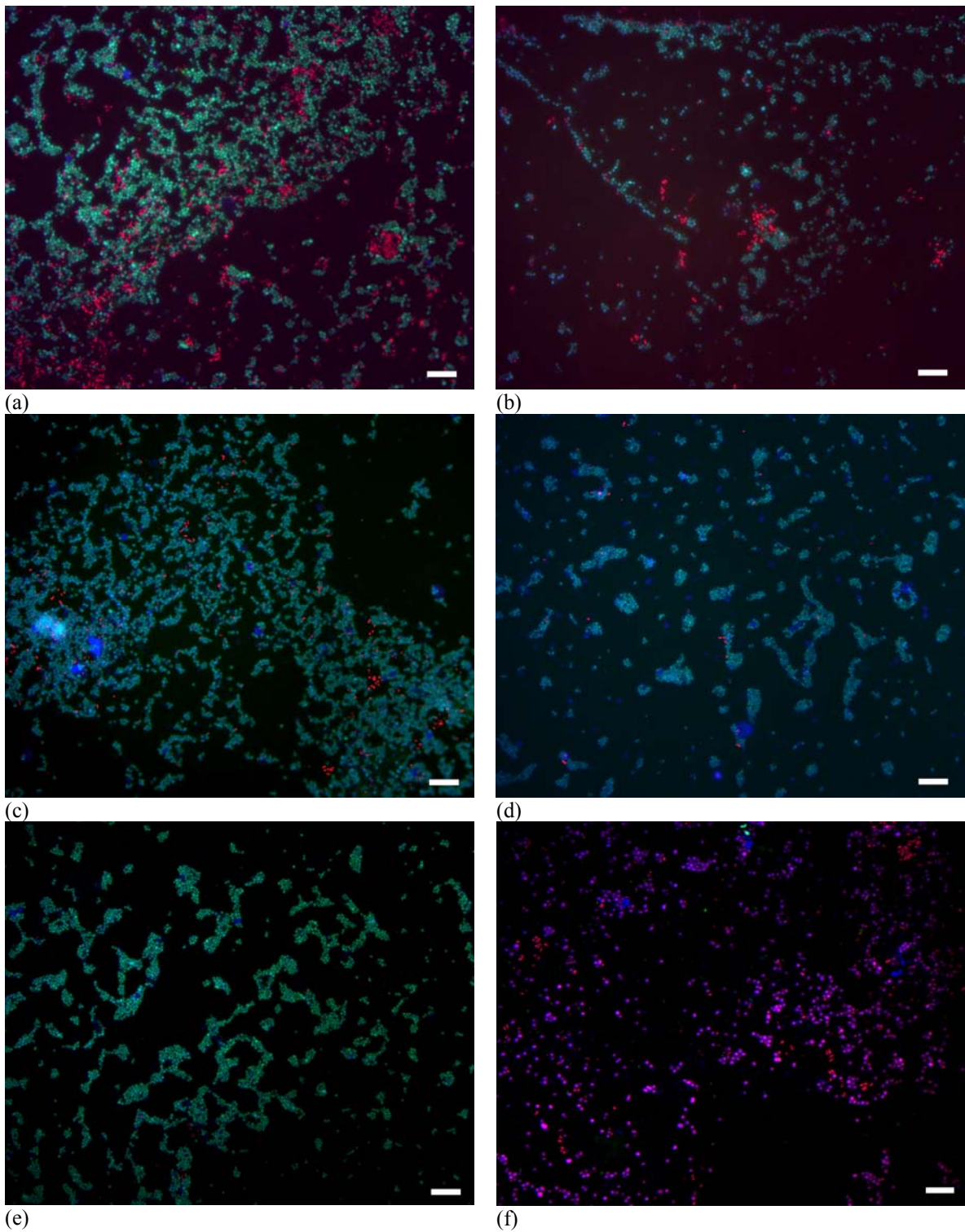


Figura 6.7: Hibridização *in situ* por fluorescência das populações de PAO (em vermelho) e GAO (em verde) entre todas as bactérias presentes no reator (em azul) no final da fase II (a), final da fase III (b), primeira semana da fase IV (c), segunda semana da fase IV (d) e terceira semana da fase IV (e); fração das populações de PAO+GAO (em vermelho) e AOB+NOB (em verde) entre toda a comunidade bacteriana dos grânulos durante a fase II (f). A barra de escala indica 20 μm .

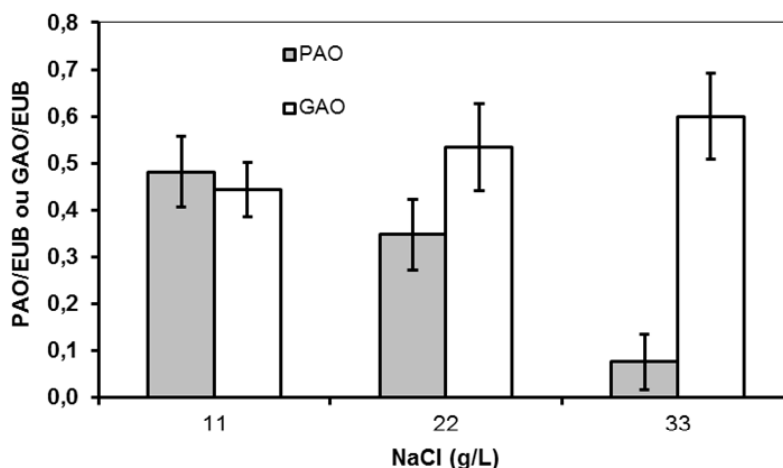


Figura 6.8: Proporção de PAO e GAO entre toda a comunidade de bactérias nas fases II, III e IV. Na análise quantitativa, foram consideradas pelo menos 10 imagens para cada condição de salinidade, conforme indicado no item 6.2.7.

6.4. Discussão

6.4.1. Impacto do aumento da concentração de NaCl na competição entre PAO e GAO

Os resultados dessa pesquisa mostraram que a remoção de fosfato foi severamente afetada pelo aumento da concentração salina, particularmente nas condições de salinidade de 22 e 33 gNaCl/L. Tanto a liberação de fosfato durante o período de alimentação anaeróbio quando o consumo de fosfato na fase de aeração diminuíram gradualmente com o decorrer das fases II-IV. CUI *et al.* (2009) reportaram que a liberação de fosfato diminuiu drasticamente com o aumento da salinidade, especialmente em concentrações superiores a 5 gNaCl/L. Em experimentos realizados por HONG *et al.* (2007) em um reator anaeróbio/anóxico/aeróbio, o processo de remoção de fósforo foi completamente inibido quando a concentração de sal foi maior que 4 gNaCl/L. UYGUR e KARGI (2004) também observaram um decréscimo na eficiência de remoção de fosfato de 84 a 22% quando a concentração de NaCl foi aumentada de 0 a 6% (m/v), isto é, 60 g/L.

Os resultados obtidos nos testes de ciclo sugeriram que o considerável acúmulo de nitrito observado durante o ciclo de operação, em especial quando a concentração salina foi superior a 11 gNaCl/L possivelmente contribuiu para a redução da capacidade de remoção de fosfato do sistema. Conforme reportado em trabalhos da literatura, o nitrito pode afetar negativamente a atividade dos organismos acumuladores de polifosfato (PAO) tanto em condições aeróbias quanto anóxicas. Concentrações de 2

mgNO₂⁻-N/L já são consideradas inibitórias para PAO de acordo com SAITO *et al.* (2004). Esses autores reportaram a ocorrência de inibição completa da remoção aeróbia de fosfato quando a concentração de nitrito do meio foi superior a 6 mgN/L. MEINHOLD *et al.* (1999) observaram uma inibição severa da remoção de fosfato tanto em condições aeróbias quanto em anóxicas quando a concentração de nitrito esteve na faixa de 6 - 8 mgN/L.

Nessa pesquisa, o efeito da salinidade foi prejudicial à atividade das NOB, fato que pode ser inferido pelo substancial acúmulo de nitrito. Conseqüentemente, a taxa de remoção de fosfato foi reduzida quando as concentrações de nitrito foram maiores que 4 mgN/L. A partir do momento que o nível de nitrito foi reduzido, a taxa de remoção de fosfato aumentou, sugerindo dessa maneira um efeito inibitório reversível. Nesse contexto, a deterioração gradual da remoção de fosfato foi possivelmente ocasionada pelo efeito combinado de sal e nitrito. Entretanto, pesquisas adicionais devem ser realizadas para confirmar o efeito adverso de nitrito na atividade dos PAO. PIJUAN *et al.* (2011) reportaram que o ácido nitroso, cuja concentração está vinculada à concentração de nitrito e ao pH, apresentou um efeito mais pronunciado na atividade dos PAO do que na dos GAO, propiciando uma vantagem competitiva para os últimos micro-organismos em sistemas de remoção biológica de fosfato. Os resultados obtidos nessa pesquisa vão ao encontro dos dados reportados por PIJUAN *et al.* (2011), uma vez que mostram o enriquecimento da comunidade microbiana em GAO e desaparecimento de PAO à medida que a concentração salina foi aumentada e o nitrito passou a acumular no sistema.

A partir da análise da comunidade microbiana, pode-se concluir que o decréscimo da remoção de fosfato observada durante a fase III (22 gNaCl/L) está diretamente ligada ao desaparecimento gradual do micro-organismos relacionados com *Candidatus Accumulibacter* nessa respectiva fase de operação (Banda B9 do gel de DGGE contendo fragmentos do gene 16S rRNA). A tendência de desaparecimento desses organismos continuou no início da fase IV (33 gNaCl/L), durante a qual a banda B9 praticamente não foi detectada e tanto a liberação quanto o consumo de fosfato foram ínfimas. A ausência completa desses micro-organismos durante a operação da fase IV coincidiu com a completa deterioração da liberação e remoção de fosfato.

Experimentos em batelada confirmaram que a longa exposição da biomassa à concentração salina de 33 gNaCl/L foi prejudicial aos PAO e, conseqüentemente, à remoção biológica de fosfato. É interessante ressaltar que no teste em batelada no qual

foi utilizada biomassa adaptada a 22 gNaCl/L, observou-se a ocorrência de remoção de fosfato mesmo quando em condições salinas de 30 gNaCl/L. Esse resultado sugere que os PAO são capazes de remover fosfato a 30 gNaCl/L, embora não consigam competir os GAO no interior do reator submetido à longa exposição a esse teor salino.

Vale mencionar que, embora a integridade dos grânulos tenha sido estável ao longo de todo o experimento, a estrutura da população microbiana variou mais rapidamente do que o esperado caso não houvesse crescimento, levando-se em consideração o tempo de retenção de sólidos. Durante a fase IV, na qual a salinidade foi de 33 gNaCl/L, a atividade dos PAO foi praticamente nula e esses organismos desapareceram completamente em três semanas, embora o tempo de retenção de sólidos tenha sido de 30 dias.

Em paralelo ao desaparecimento dos PAO, os GAO se tornaram dominantes em índices de salinidade mais elevados, conforme evidenciado pela análise FISH. Os GAO realizam transformações metabólicas similares às realizadas pelos PAO, embora em seu metabolismo não ocorra liberação nem consumo de fosfato (OEHMEN *et al.*, 2006a). Estudos reportaram que os GAO dominaram culturas de laboratório alimentadas com acetato (CROCETTI *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2003a; OEHMEN *et al.*, 2004). Esses micro-organismos são geralmente associados com a deterioração do desempenho de sistemas de remoção biológica de fósforo (OEHMEN *et al.*, 2006a). Alguns fatores operacionais tais como tempo de retenção de sólidos (FUKASE *et al.*, 1984), aeração excessiva (BRDJANOVIC *et al.*, 1998b), altas temperaturas (LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2007) e baixa razão fósforo/carbono na alimentação (LIU *et al.*, 1997a) são conhecidos por favorecer o crescimento dos GAO em detrimento aos PAO. Nesse estudo, a dominância de GAO ocorrida conforme a proporção de PAO foi diminuída esteve diretamente relacionada ao aumento da concentração de sal. Os resultados mostraram que os PAO foram capazes de se adaptar bem a 11 gNaCl/L, razoavelmente bem a 22 gNaCl/L, mas não conseguiram suportar a condição mais severa de salinidade imposta (33 gNaCl/L). Dessa forma, perderam a competição com os GAO. Esse é o primeiro trabalho evidenciando que altos índices salinos favorecem os GAO em detrimento aos PAO.

6.4.2. Impacto do aumento da concentração de NaCl sobre a nitrificação

Os resultados desse trabalho mostraram que a remoção de amônio não foi afetada pelo aumento da concentração de sal até 33 gNaCl/L. O único trabalho descrito na literatura envolvendo o efeito de sal na remoção de nutrientes em sistema de lodo granular aeróbio foi realizado por FIGUEROA *et al.* (2008), os quais observaram um pequeno decréscimo na eficiência de remoção de amônio quando o conteúdo salino foi superior a 16 gNaCl/L. Nessa pesquisa, o período relativamente longo de operação (mais de 300 dias) em concentração salina moderada (11 gNaCl/L), pareceu ter melhorado a tolerância das AOB, sugerindo que esse procedimento de adaptação pode ser usado para a obtenção de boas eficiências de remoção de amônio em níveis salinos elevados.

Apesar do fato da remoção de amônio não ter sido afetada com o aumento da concentração de sal, observou-se que os únicos representantes da comunidade de AOB, pertencentes ao gênero *Nitrosomonas*, tiveram sua quantidade substancialmente reduzida (abaixo do nível de detecção por DGGE) ao longo da fase III, conforme mostrado na análise DGGE com fragmentos de 16S rRNA. Esse resultado trouxe à tona a hipótese de que outras AOB não detectadas na análise DGGE estariam ativas no sistema, isto é, convertendo amônio em nitrito, ou então a população de *Nitrosomonas* diminuiu de forma que não fosse mais detectada por meio da análise de DGGE utilizando-se *primers* específicos para o gene 16S rRNA.

No intuito de investigar com maior riqueza de detalhes a estrutura da população de AOB, a análise DGGE foi realizada com fragmentos do gene *amoA*, específico desses organismos. Contrariamente aos perfis de DGGE derivados dos fragmentos do gene 16S rRNA, a análise dos fragmentos do gene *amoA* mostrou que *Nitrosomonas* sp. esteve presente durante todo o período de experimentos. Essa observação vem ao encontro do desempenho do reator, o qual apresentou sempre remoção integral de amônio. Uma vez que os resultados de sequenciamento das bandas excisadas da análise DGGE com fragmentos de 16S rRNA e *amoA*, referentes às AOB, foram os mesmos, pode-se inferir que a composição de AOB não variou ao longo do tempo. Na verdade, o que ocorreu foi uma adaptação gradual às crescentes concentrações salinas impostas ao sistema.

Conforme mostrado por meio da análise FISH, as bactérias nitrificantes representaram apenas uma fração de 1 a 2% do total da comunidade microbiana dominada por PAO e GAO. Devido ao reduzido número de AOB presente no consórcio microbiano, é possível que durante a amplificação, por PCR, utilizando-se *primers*

universais (região 16S rRNA), algumas AOB não fossem amplificadas. Esse resultado evidencia a importância do uso de *primers* específicos de genes funcionais para detectar micro-organismos de crescimento lento e em quantidade reduzida em uma complexa mistura de bactérias.

Vale mencionar que a análise do gene *amoA* não reflete uma avaliação quantitativa da população de AOB, fornecendo apenas dados qualitativos. Em outras palavras, essa análise é baseada na presença ou ausência de um determinado grupo bacteriano, embora não forneça informações a respeito de sua quantidade. Nesse contexto, embora um determinado micro-organismo esteja presente em quantidades bastante reduzidas, os *primers* específicos de determinado gene funcional são capazes de detectar o organismo desejado. MOUSSA *et al.* (2006) também observaram que *Nitrosomonas europaea* foi o único representante da população de AOB em altas concentrações salinas (30 e 40 gNaCl/L), embora esses autores tenham observado outras espécies desse grupo em condições salinas menos severas (de até 16 gNaCl/L).

Uma combinação perfeita entre os dados analíticos e a diversidade microbiana foi obtida em relação à segunda etapa da nitrificação (nitratação). A mudança de nitrato para nitrito como principal produto da nitrificação foi acompanhada pelo desaparecimento do único representante da população de NOB (*Nitrospira* sp.). Esse fato é facilmente perceptível durante a operação a 33 gNaCl/L (fase IV), quando altas concentrações de nitrito foram observadas. Experimentos em batelada com biomassa aclimatada a 33 gNaCl/L também mostraram que praticamente todo o amônio foi oxidado a nitrito em todas as concentrações de sal testadas. Esse resultado confirma que as NOB foram fortemente inibidas a 33 gNaCl/L. De forma similar, CHEN *et al.* (2003) observaram que as NOB desapareceram quando o conteúdo salino foi aumentado de 16 a 30 gNaCl/L. MOUSSA *et al.* (2006) observaram que *Nitrospira* sp. dominou a população de NOB em concentrações salinas de até 16,5 gNaCl/L. Diversos trabalhos na literatura mencionam que bactérias do gênero *Nitrospira* dominaram o consórcio de NOB (SCHRAMM *et al.*, 1998, BURRELL *et al.*, 1998; OKABE *et al.*, 1999), embora a maioria deles não estão relacionados com a operação de sistemas em condições de alta salinidade.

A partir dos dados extraídos dessa pesquisa, pode-se concluir que as AOB presentes no sistema de lodo granular investigado foram muito menos susceptíveis ao efeito salino do que as NOB, resultado que vai ao encontro de diversas observações feitas anteriormente por outros pesquisadores (SCHENK e HEGEMANN, 1995,

DINCER e KARGI, 1999, DINCER e KARGI, 2001, CUI *et al.*, 2009; SÁNCHEZ *et al.*, 2004).

6.4.3. Mudanças adicionais na estrutura da comunidade microbiana com o aumento da concentração salina

Os resultados de DGGE indicaram que as bactérias pertencendo ao grupo *Denitromonas* parecem ter alta afinidade por altas concentrações de sal, tendo que vista que a intensidade das bandas representativas desses micro-organismos, tais como B10 e B11, aumentou com o acréscimo do nível salino. Ademais, outras bandas como B17 e B18, igualmente representando espécies de *Denitromonas*, apareceram durante a operação da fase IV, na qual a maior concentração salina foi aplicada. Nessa condição, em particular, a turbidez do efluente aumentou significativamente. No trabalho descrito no capítulo anterior, referente ao efeito da salinidade na nitrificação e na composição de bactérias nitrificantes em cultura de lodo nitrificante, também foi observado que organismos do gênero *Denitromonas* sp. apareceram em altas concentrações salinas (20 gNaCl/L). Essas bactérias fazem parte da classe Betaproteobacteria, encontradas em números consideráveis em reatores desnitrificantes (ETCHEBEHERE *et al.*, 2003). Pouca informação sobre esses organismos está disponível na literatura, e o único trabalho que descreve a presença de *Denitromonas* em condições de alta salinidade (60 g/L NaCl) foi realizado por XIAO *et al.* (2010).

Levando-se em consideração que as células que crescem ativamente contêm altos níveis de rRNA, conforme descrito em pesquisas anteriores (DELONG *et al.*, 1989; POULSEN *et al.*, 1993; PICHARD e PAUL, 1993, AOI *et al.*, 2004), e que células dormentes apresentam baixa atividade e portanto estão associadas com baixo conteúdo de rRNA (WITZIG *et al.*, 2002), a intensidade de bandas do gel de DGGE mostrando o perfil de cDNA pode ser relacionado com o conteúdo de ribossomos e fornece informação a respeito da atividade da população microbiana. A partir da análise comparativa da diversidade (padrão derivado do DNA) e da atividade (padrão derivado do cDNA) da população microbiana, observou-se que os micro-organismos metabolicamente ativos foram aqueles relacionados com a remoção de amônio (*Nitrosomonas* sp.) e de fosfato (*Candidatus Accumulibacter*), resultado suportado pelo aumento da intensidade da banda referente a esses organismos do perfil de DNA para o perfil de cDNA. Para *Candidatus Accumulibacter*, de forma particular, a alta atividade

metabólica vale apenas até a concentração salina de 22 gNaCl/L, mais uma vez confirmando o efeito prejudicial da longa exposição desses organismos a 33 gNaCl/L. Todas as outras bandas corresponderam a organismos com baixa atividade metabólica, a maioria deles pertencendo ao grupo *Bacteroidetes*, representando bactérias heterotróficas provavelmente crescendo às custas de outras bactérias ativas (tais como PAO, GAO e organismos nitrificantes), não apresentando importância significativa nos processos biológicos ocorrendo nos grânulos aeróbios. A relevância do estudo envolvendo diversidade versus funcionalidade reside no fato de que, embora a população microbiana tenha sido bastante diversa, somente os micro-organismos diretamente relacionados com as principais conversões biológicas, tais como PAO e AOB, apresentaram alta atividade metabólica.

6.5. Conclusões

Os resultados desse estudo demonstraram que *Nitrosomonas* sp. e *Nitrospira* consistiram, respectivamente, nos únicos representantes da população de AOB e NOB no sistema granular. As AOB foram capazes de tolerar a maior concentração de NaCl testada (33 g/L), fato evidenciado pela estável e completa remoção de amônio. Em contrapartida, as NOB foram severamente afetadas pelo aumento do teor salino, repercutindo em elevado acúmulo de nitrito. O aumento da concentração de sal também apresentou efeito adverso na remoção de fosfato, resultado diretamente relacionado ao desaparecimento gradual de *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (PAO). Tanto a liberação de fosfato durante o período anaeróbio quanto o consumo de fosfato na fase de aeração cessaram completamente durante a operação, em estado estacionário, a 33 gNaCl/L (fase IV). Em condições de alta salinidade, os PAO foram substituídos por GAO, os quais se tornaram os organismos dominantes do consórcio microbiano presente no reator. Os resultados obtidos nessa pesquisa em relação ao desempenho e à análise da diversidade microbiana por métodos moleculares certamente poderão ajudar a entender melhor a operação de processos de remoção simultânea de nitrogênio e fósforo em ambientes de alta salinidade e potencialmente contribuir para a melhoria do seu desempenho.

Considerações Finais

7. Considerações Finais

Esse trabalho de pesquisa esteve relacionado a inúmeros estudos relacionados com a remoção biológica de nutrientes em sistemas compactos. As conclusões específicas de cada estudo estão descritas nos seus respectivos capítulos. Para uma visão geral do conteúdo dos trabalhos apresentados nesse documento, alguns tópicos de discussão interessantes são apresentados a seguir.

7.1. Lodo granular aeróbio versus reator de leito móvel com biofilme

Embora durante esse trabalho de pesquisa tenham sido realizados diferentes estudos lançando mão de sistemas de lodo granular aeróbio (AGS) e reatores de leito móvel com biofilme (MBBR), uma comparação geral pode ser feita entre essas duas tecnologias.

Uma diferença notável entre esses sistemas é o fato de que os reatores de grânulos aeróbios possibilitam uma retenção de biomassa muito superior em comparação com os MBBR. Trabalhos na literatura envolvendo a tecnologia de AGS reportaram concentrações de biomassa (expressas como sólidos suspensos totais - SST) que variam de 6 – 12 g/L (TAY *et al.*, 2002, LIU e TAY, 2004; DE KREUK *et al.*, 2005c). Durante essa pesquisa, experimentos com lodo granular aeróbio permitiram se alcançar concentrações de biomassa de até 20 g/L. Como resultado da excelente capacidade de retenção de sólidos, maiores cargas orgânica e nitrogenada podem ser aplicadas a esses sistemas.

Os sistemas MBBR, por sua vez, apresentam menor capacidade de retenção de biomassa. JOHNSON *et al.* (2000) reportaram que concentrações menores que 2 gSST/L estiveram presentes em reatores MBBR de escala industrial. BROCH-DUE *et al.* (1994) descreveram que a máxima concentração de biomassa fixada aos suportes de um MBBR de escala laboratorial foi em torno de 2,9 gSST/L. De forma semelhante, SALVETTI *et al.* (2006) obtiveram 3,0 gSST/L como máximo teor de sólidos. Esse valor é, por sinal, similar ao obtido nessa pesquisa. Em decorrência de apresentarem menor concentração de sólidos, as taxas de conversão volumétricas de sistemas MBBR são muito inferiores àquelas de reatores de AGS.

Apesar disso, a tecnologia MBBR apresenta a vantagem de ser facilmente aplicada para melhorar a capacidade de plantas de tratamento de águas residuárias existentes, sem necessitar de tanques adicionais e com mínimas modificações do sistema. Por meio da inserção de telas de retenção na saída do reator e do ajuste da aeração, é possível manter os suportes móveis no interior do sistema (possibilitando o aumento da concentração de biomassa) e propiciar boa movimentação dos mesmos no volume reacional. Esses fatores certamente contribuem para a melhoria do desempenho do reator, possibilitando, a um custo reduzido, adequar efluente tratado aos padrões de descarte estabelecidos pela legislação ambiental em vigor. Após a adaptação do sistema convencional para o sistema híbrido com biomassa em suspensão e biofilme, o aumento da capacidade do sistema pode ser atingido simplesmente pela adição de materiais suporte, aumentando a área superficial para crescimento da biomassa.

Outra vantagem do sistema híbrido é a retenção de bactérias de crescimento lento, tais como as nitrificantes, mesmo em baixos tempos de retenção de sólidos. Isso é possível graças à adesão dos micro-organismos aos materiais suporte. Além disso, caso ocorra algum distúrbio no sistema que leve ao arraste significativo de biomassa, pelo menos a biomassa que se encontra aderida aos suportes irá permanecer no tanque de aeração, propiciando um período de recuperação mais rápido.

A capacidade e o desempenho de plantas de tratamento baseadas no processos de lodos ativados também podem ser aumentados por meio do uso de lodo granular aeróbio (AGS). Considerado como um tipo de consórcio microbiano auto-imobilizado, a tecnologia de grânulos aeróbios, diferentemente do sistema MBBR, não requer materiais suportes. Isso, de fato, representa um importante vantagem do sistema granular, uma vez que os suportes móveis de MBBR são geralmente patenteados por empresas comerciais, o que obviamente aumenta os custos de implantação dessa tecnologia. Para a aplicação prática da tecnologia de AGS, determinada quantidade de grânulos deve estar disponível para acelerar o processo de granulação ou as condições de operação dos sistemas convencionais de lodos ativados devem ser modificadas no intuito de favorecerem somente o desenvolvimento de partículas com alta velocidade de sedimentação e propiciarem o arraste de flocos de lodo pobremente sedimentáveis. Para conseguir tal façanha, pressões de seleção importantes, tais como pequeno tempo de sedimentação em reatores em batelada sequencial, devem ser aplicadas para se obter a granulação.

7.2. Efeito da salinidade em sistemas com biomassa suspensa e biomassa granular

O desempenho dos processos biológicos de tratamento diminuiu com o aumento da concentração salina devido ao efeito negativo de sal nos micro-organismos presentes no reator. Dois trabalhos foram realizados com o objetivo de investigar o efeito salino. Em um deles, avaliou-se o efeito de diferentes modos de adaptação ao sal na diversidade e atividade de uma cultura de micro-organismos nitrificantes mantida em suspensão. A outra investigação se refere ao estudo do efeito de elevados índices salinos no processo de lodo granular aeróbio (AGS) destinado à remoção simultânea de matéria orgânica e nutrientes (nitrogênio e fósforo).

Apesar dos objetivos desses dois trabalhos serem distintos, algumas comparações podem ser feitas. À medida que a salinidade foi aumentada, a estrutura da comunidade microbiana, avaliada por meio da técnica de DGGE com os fragmentos do gene 16S rRNA, permaneceu mais estável no sistema de AGS em comparação com o sistema de lodo nitrificante em suspensão. Além disso, a capacidade de oxidação de amônio no reator de grânulos aeróbios permaneceu estável independentemente da concentração de sal aplicada (de até 33 gNaCl/L). Pelo contrário, as taxas de remoção de amônio decresceram de forma considerável no lodo nitrificante em suspensão à medida que a salinidade foi aumentada gradativamente até 20 gNaCl/L.]

A estrutura resistente e compacta do AGS provavelmente funcionou como uma espécie de proteção aos micro-organismos contra o efeito adverso da salinidade. As bactérias presentes na região externa dos grânulos, tais como as bactérias oxidadoras de amônio (AOB), foram possivelmente afetadas pelo teor salino, levando à diminuição da atividade dessa população microbiana. Como consequência do decaimento de biomassa nessa região externa dos grânulos, a penetração de oxigênio pode ter atingido zonas mais internas da biomassa granular, na qual o sal pode ter encontrado resistência à difusão e as AOB puderam se desenvolver. Esse fato pode ter compensado a perda da atividade de oxidação de amônio devido ao aumento da salinidade no sistema granular.

Outro aspecto importante a ser discutido se refere ao maior arraste de biomassa no sistema de lodo nitrificante em suspensão e consequente perda da capacidade volumétrica de tratamento, fatos relacionados aos problemas de sedimentação da biomassa observados com aumento do teor salino. Flocos de lodo mais leves provavelmente não sedimentaram de forma satisfatória quando a densidade do meio líquido foi aumentada devido ao aumento da salinidade. Esse problema não é observado

em sistemas de AGS, nos quais estão presentes partículas dotadas de alta velocidade de sedimentação.

Seria interessante a realização de estudos envolvendo o efeito de sal nos processos de lodo granular aeróbio e de lodos ativados convencional, ambos desenvolvendo os mesmos processos biológicos (por exemplo, nitrificação, desnitrificação e remoção de fosfato). Esses trabalhos de investigação não devem ser limitados às principais conversões biológicas, mas devem apontar diferenças entre a estrutura da comunidade microbiana desses dois processos, mantidos sob condições de operação similares. Os resultados obtidos a partir das análises químicas e microbiológicas devem ser combinados para fornecer uma visão mais completa da suscetibilidade de cada tipo específico de biomassa à índices salinos crescentes.

7.3. Relevância das técnicas de biologia molecular aplicadas a processos de engenharia ambiental

A ecologia microbiana fornece a fundamentação teórica para os processos aplicados em biotecnologia ambiental. Por sua vez, os processos em biotecnologia ambiental consistem em ecossistemas interessantes para ecologistas microbianos aperfeiçoarem os seus métodos e conhecimentos (RITTMANN, 2006). Além de enfatizar a importância da ecologia microbiana, os avanços revolucionários dos métodos moleculares ocorridos nas últimas duas décadas vêm melhorando o entendimento dos processos biológicos de tratamento de águas residuárias, ao mesmo tempo que auxiliam na melhoria de sua estabilidade e eficiência (DAIMS *et al.*, 2006, RITTMANN, 2006).

Graças às técnicas moleculares independentes de cultivo microbiano, o estudo de complexas comunidades de bactérias presentes em sistemas de tratamento tornou-se possível. Em adição, novas descobertas a respeito de bactérias não cultivadas foram realizadas e organismos-chave envolvidos nos processos de tratamento foram identificados.

Alguns estudos realizados nesse trabalho de pesquisa são exemplos de como a combinação entre os dados analíticos levantados durante a operação de sistemas de tratamento e os resultados obtidos pelos métodos moleculares é importante para determinar a função de alguns micro-organismos em conversões específicas, observar a seleção e enriquecimento de populações microbianas de acordo com as condições experimentais aplicadas, melhorar a eficiência de tratamento e entender melhor as rotas

das conversões bioquímicas. No Capítulo 3, por exemplo, a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi aplicada para observar o enriquecimento do biofilme em nitrificantes em sistemas MBBR. Essa técnica também foi de suma importância no estudo descrito no Capítulo 4, uma vez que por meio dela observou-se uma segregação da biomassa ao longo do leito de lodo dos sistemas de lodo granular aeróbio. A segregação observada, por sua vez, abriu a possibilidade de favorecer algumas populações microbianas desejadas e, por conseguinte, melhorar o desempenho do reator, particularmente no que se refere à remoção de fosfato. Ademais, a identificação de diferentes linhagens de bactérias responsáveis pelo processo de remoção de fosfato por meio da técnica de FISH permitiu o melhor entendimento da rota de desnitrificação nos sistemas de grânulos aeróbios.

A técnica de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) foi empregada para monitorar mudanças na estrutura da comunidade microbiana em reatores submetidos ao aumento da concentração salina. No Capítulo 5, essa técnica de *fingerprinting* molecular permitiu observar a influência de diferentes estratégias de adaptação ao sal na comunidade bacteriana de uma cultura de lodo nitrificante mantida em suspensão em um reator operado em bateladas sequenciais. A técnica de DGGE também foi bastante útil para detectar variações no perfil da comunidade de micro-organismos em um reator de lodo granular aeróbio submetido a índices crescentes de salinidade, estudo esse descrito no Capítulo 6. A comparação entre os perfis de DGGE derivados de DNA e RNA (cDNA) tornou possível observar quais as bactérias que apresentaram alta atividade metabólica. Nesse trabalho, em particular, a técnica de FISH foi usada para quantificar populações dominantes de bactérias, servindo também para validar os resultados baseados em PCR.

Os diversos estudos realizados nesse trabalho de pesquisa representam apenas algumas das oportunidades promissoras oferecidas pelas ferramentas moleculares para melhor entender e gerenciar os sistemas de tratamento de águas residuárias, no intuito de melhorar o desempenho dos mesmos. Os benefícios trazidos pelas técnicas de biologia molecular podem ser muito maiores. Por exemplo, estudos envolvendo genômica ambiental fornecem uma visão mais profunda a respeito da ecofisiologia e evolução de micro-organismos presentes em sistemas de tratamento. Estudos de genômica comparativa podem fornecer informações a respeito da variabilidade genômica existente entre organismos funcionalmente similares, permitindo o melhor entendimento da relação entre estrutura e função de comunidades microbianas (DAIMS

et al., 2006). Como consequência, alguns fatores que levam à estabilidade de processos-chave em sistemas de tratamento podem ser mais facilmente identificados. Por outro lado, a aplicabilidade da informação obtida a partir de estudos de ecologia microbiana molecular depende da habilidade de engenheiros ambientais, os quais muitas vezes consideram os sistemas biológicos como um sistema “caixa preta”, para transformar todo o conhecimento acumulado em novas implementações técnicas no intuito de se alcançar o sucesso almejado. Uma das melhores formas para se atingir os objetivos desejados é combinar a experiência prática e teórica de engenheiros com os estudos fundamentais em ecologia microbiana realizados por microbiologistas. A melhor integração entre essas duas disciplinas é fundamental para o melhor uso dos potenciais da biotecnologia ambiental.

Referências

- ADAV, S.S., LEE, D.-J., LAI, J.-Y., 2010, "Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, pp. 1601-1610.
- ADAV, S.S., LEE, D.-J., SHOWN K.-Y., TAY, J.-H., 2008, "Aerobic granular sludge: recent advances", *Biotechnology Advances*, v. 26, pp. 411-423.
- AHN, Y.H., 2006, "Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review", *Process Biochemistry*, v. 41, n. 8, pp. 1709-1721.
- AMANN, R.I., BINDER, B.J., OLSON, R.J., CHISHOLM, S.W., DEVEREUX, R., STAHL, D.A., 1990b, "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, pp. 1919-1925.
- AMANN, R.I., KRUMHOLZ, L., STAHL, D.A., 1990a, "Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental-studies in microbiology", *Journal of Bacteriology*, v. 172, pp. 762-770.
- ANTHONISEN, A.C., LOEHR, R.C., PRAKASAM, T.B.S., SRINATH, E.G., 1976, "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid", *Journal of the Water Pollution Control Federation.*, v. 48, pp. 835-852.
- AOI, Y., MASAKI, Y., TSUNEDA, S., HIRATA, A., 2004, "Quantitative analysis of *amoA* mRNA expression as a new biomarker of ammonia oxidation activities in a complex microbial community", *Letters in Applied Microbiology*, v. 39, pp. 477-482.
- APHA – American Public Health Association, 1995, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19^a ed., Washington D.C., USA.
- APHA – American Public Health Association, 1998, *Standard methods for examination of water and wastewater*, 20^a ed., Washington D.C., USA.
- ARDERN, E., LOCKETT, W.T., 1914, "Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters", *Journal of the Society of Chemical Industry*, v. 33, pp. 523-539.
- ARROJO, B., MOSQUERA-CORRAL, A., GARRIDO, J.M., MÉNDEZ, R., 2004, "Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors", *Water Research*, v. 38, pp. 3389-3399.
- BAE, W., BAEK, S., CHUNG, J., LEE, Y., 2001, "Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors", *Biodegradation*, v. 12, pp. 359-839.
- BARAK, Y.; TAL, Y.; VAN RIJN, J., 1998, "Light-mediated nitrite accumulation during denitrification by *Pseudomonas sp.* Strain JR12", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 3, pp. 813-817.

BASSIN, J.P., 2011a, *Novos processos de remoção biológica de nitrogênio*. In: DEZOTTI, M., SANT'ANNA JR, G.L., BASSIN, J.P (Org.) Processos biológicos avançados para tratamento de efluente e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana. Rio de Janeiro: Editora Interciência.

BASSIN, J.P., 2011b, *Tecnologia de granulação aeróbia (lodo granular aeróbio)*. In: DEZOTTI, M., SANT'ANNA JR, G.L., BASSIN, J.P (Org.) Processos biológicos avançados para tratamento de efluente e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana. Rio de Janeiro: Editora Interciência.

BASSIN, J.P., DEZOTTI, M., 2011, *Reator de leito móvel com biofilme*. In: DEZOTTI, M., SANT'ANNA JR, G.L., BASSIN, J.P (Org.) Processos biológicos avançados para tratamento de efluente e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana. Rio de Janeiro: Editora Interciência.

BASSIN, J.P., DEZOTTI, M., ROSADO, A.S., 2011b, *Técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da diversidade microbiana de sistemas de efluentes*. In: DEZOTTI, M., SANT'ANNA JR, G.L., BASSIN, J.P (Org.) Processos biológicos avançados para tratamento de efluente e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana. Rio de Janeiro: Editora Interciência.

BASSIN, J.P., DEZOTTI, M., SANT'ANNA Jr, G.L., 2011a, "Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor", *Journal of Hazardous Materials*, v. 185, pp. 242-248.

BASSIN, J.P., PRONK, M., KRAAN, R., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2011c, "Ammonium adsorption in aerobic granular sludge, activated sludge and anammox granules", *Water Research*, v. 45, pp. 5257-5265.

BEUN, J.J., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2002b, "N-removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 75, pp. 82-92.

Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J., 1999, "Aerobic granulation in a sequencing batch reactor", *Water Research*, v. 33, pp. 2283-2290.

BEUN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 2002a, "Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor", *Water Research*, v. 36, pp. 702-712.

BLACKBURNE, R., VADIVELU, V.M., YUAN, Z., KELLER, J., 2007, "Determination of growth rate and yield of nitrifying bacteria by measuring carbon dioxide uptake rate", *Water Environment Research*, v. 79, pp. 2437-2445.

BORGHEI, S.M., HOSSEINI, S.H., 2004, "The treatment of phenolic wastewater using a moving bed biofilm reactor", *Process Biochemistry*, v. 39, pp. 1177-1181.

BRAUER, H., ANNACHHATRE, A.P., 1992, "Wastewater nitrification kinetics using reciprocating jet bioreactor", *Bioprocess Engineering*, v. 7, pp. 277-286.

- BRDJANOVIC, D., 1998, *Modeling biological phosphorus removal in activated sludge systems*, Tese de doutorado, Delft University of Technology e UNESCO-IHE, Delft, Holanda.
- BRDJANOVIC, D., SLAMET, A., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HOOIJMANS, C.M., ALAERTS, G.J., HEIJNEN, J.J., 1998b, "Impact of Excessive Aeration on Biological Phosphorus Removal from Wastewater", *Water Research*, v. 32, pp. 200-208.
- BRDJANOVIC, D., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HOOIJMANS, C.M., ALAERTS, G.J., HEIJNEN, J.J., 1997, "Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal", *Journal of Environmental Engineering*, v. 123, pp. 144-153.
- BRDJANOVIC, D., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HOOIJMANS, C.M., ALAERTS, G.J., HEIJNEN, J.J., 1998a, "Minimal aerobic sludge retention in biological phosphorus removal systems", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, pp. 326-332.
- BROCH-DUE, A., ANDERSEN, R., KRISTOFFERSEN, O., 1994, "Pilot plant experience with an aerobic moving bed biofilm reactor for treatment of NSSC wastewater", *Water Science and Technology*, v. 29, pp. 283-294.
- BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., 1991, *Biology of Microorganisms*. 6^a ed., New Jersey: Prentice-Hall.
- BUISSON, H., COTE, P., PRADERIE, M., PAILLARD, H., 1998, "The use of immersed membranes for upgrading wastewater treatment plants", *Water Science and Technology*, v. 37, pp. 89-95.
- BURRELL, P.C., KELLER, J., BLACKALL, L.L., 1998, "Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, pp. 1878-1883.
- CABEZAS, A., ETCHEBEHERE, C., MUXÍ, L., 2004, "Quantification of autotrophic nitrifying bacteria in wastewater treatment systems". *Proceedings of "Anaerobic Digestion"*, 10th World Congress, Montreal, Canada.
- CAMMAROTA, M.C., SANT'ANNA JR., G.L., 1998, "Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation", *Biotechnology Letters*, v. 20, pp. 1-4.
- CAMPOS, J.L., GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.M., MÉNDEZ, R., LEMA, J.M., 1999, "Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit", *Bioresource Technology*, v. 68, pp. 141-148.
- CAMPOS, J.L., GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.M., MOSQUERA-CORRAL, A., MÉNDEZ, R., 2007, "Stability of a nitrifying activated sludge reactor", *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, pp. 87-92.

- CAMPOS, J.L., MOSQUERA-CORRAL, A., MÉNDEZ, R., LEMA, J.M., 2002, "Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit", *Water Research*, v. 36, pp. 2555-2560.
- CARLSSON, H., ASPEGREN, H., LEE, N., HILMER, A., 1997, "Calcium phosphate precipitation in biological phosphorus removal systems", *Water Research*, v. 31, pp. 1047-1055.
- CARVALHO, G., LEMOS, P.C., OEHMEN, A., REIS, M.A.M., 2007, "Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure", *Water Research*, v. 41, pp. 4383-4396.
- CHANG, C.N., CHEN, H.R., HUANG, C.H., CHAO, A., 2000, "Using sequencing batch biofilm reactor (SBBR) to treat ABS wastewater", *Water Science and Technology*, v. 41, pp. 433- 440.
- CHEN, G.H., OKABE, S., WATANABE, Y., 2003, "Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increased chloride concentration", *Water Research*, v. 37, pp. 3125-3135.
- CHEN, Y., JIANG, W.J., LIAND, D.T., TAY, J.-H., 2008, "Biodegradation and Kinetics of Aerobic Granules under High Organic Loading Rates in Sequencing Batch Reactor", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, pp. 301-308.
- CHENG, S.S., CHEN, W.C., 1994, "Organic carbon supplement influencing performance of biological nitrification in a fluidized bed reactor", *Water Science and Technology*, v. 11, pp. 131-142.
- CHIEMCHAISRI, C., WONG, Y.K., URASE, T., YAMAMOTO, K., 1992, "Organic stabilization and nitrogen removal in membrane separation bioreactor for domestic wastewater treatment", *Water Science and Technology*, v. 25, pp. 231-240.
- CHUNG, J., KIM, Y., LEE, D.-J., SHIM, H., KIM, J.-O., 2006, "Characteristics of denitrifying phosphate accumulating organisms in an anaerobic-intermittently aerobic process", *Environmental Engineering Science*, v. 23, pp. 981-993.
- CICEK, N., DIONYSIOU, D., SUIDAN, M.T., GINESTET, P., AUDIC, J.M., 1999, "Performance deterioration and structural changes of a ceramic membrane bioreactor due to inorganic abrasion", *Journal of Membrane Science*, v. 163, pp. 19-28.
- CICEK, N., MACOMBER, J., DAVEL, J., SUIDAN, M.T., AUDIC, J., GENESTET, P., 2001, "Effect of solids retention time on the performance and biological characteristics of a membrane bioreactor", *Water Science and Technology*, v. 43, pp. 43-50.
- CROCETTI, G.R., BANFIELD, J.F., KELLER, J., BOND, P.L., BLACKALL, L.L., 2002, "Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes", *Microbiology*, v. 148, pp. 3353-3364.

- CROCETTI, G.R., HUGENHOLTZ, P., BOND, P.L., SCHULER, A., KELLER, J., JENKINS, D., BLACKALL, L.L., 2000, "Identification of polyphosphate accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, pp. 1175-1182.
- CUI, Y., PENG, Y., YE, L., 2009, "Effects of salt on microbial populations and treatment performance in purifying saline sewage using the MUCT Process", *Clean*, v. 37, pp. 649-656.
- CURDS, C.R., COCKBURN, A., VANDIKE, J.M., 1968, "An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated-sludge process", *Water Pollution Control*, v. 67, pp. 312-329.
- DAHL, C., SUND, C., KRISTENSEN, G.H., VREDENBREGT, L., 1997, "Combined biological nitrification and denitrification of high-salinity wastewater", *Water Science and Technology*, v. 36, pp. 345-352.
- DAIMS, H., BRÜHL, A., AMANN, R., SCHLEIFER, K.H., WAGNER, M., 1999, "The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set", *Systematic and Applied Microbiology*, v. 22, pp. 434-444.
- DAIMS, H., NIELSEN, J.L., NIELSEN, P.H., SCHLEIFER, K.H., WAGNER, M., 2001, "In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, pp. 5273-5284.
- DAIMS, H., TAYLOR, M.W., WAGNER, M., 2006, "Wastewater treatment: a model system for microbial ecology", *Trends in Biotechnology*, v. 24, pp. 483-489.
- DALMACIJA, B., KARLOVIC, E., TAMAS, Z., MISJOVIC, D., 1996, "Purification of high salinity wastewater by activated sludge process", *Water Research*, v. 30, pp. 295-298.
- DAR, S.A., Yao, L., VAN DONGEN, U., KUENEN, J.G., MUYZER, G., 2007, "Analysis of diversity and activity of sulfate-reducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and *dsrB* genes as molecular markers", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, pp. 594-604.
- DE KREUK, M.K., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2005c, "Simultaneous COD, nitrogen and phosphate removal by aerobic granular sludge", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 90, pp. 761-769.
- DE KREUK, M.K., MCSWAIN, B.S., BATHE, S., Tay, S.T.L., Schwarzenbeck, N., Wilderer, P.A., 2005a, *Discussion outcomes*. In: Aerobic granular sludge, water and environmental management series. Munich: IWA Publishing.
- DE KREUK, M.K., PRONK, M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2005b, "Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures", *Water Research*, v. 39, pp. 4476-4484.

- DE KREUK, M.K., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2004, "Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability", *Water Science and Technology*, v. 49, pp. 9-17.
- DE MAN, A.W.A., VAN DER LAST, A.R.M., LETTINGA, G., 1988, "The use of EGSB and UASB anaerobic systems for low strength soluble and complex wastewaters at temperatures ranging from 8 to 30°C". *Proceedings of the Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion*, Bologna, Italy. Oxford: Pergamon.
- DEBSARKAR, A., MUKHERJEE, S., DATTA, S., 2006, "Sequencing batch reactor (SBR) treatment for simultaneous organic carbon and nitrogen removal – a laboratory study", *Journal of Environmental Science and Engineering*, v. 48, pp. 169-174.
- DELONG, E.F., WICKHAM, G.S., PACE, N.R., 1989, "Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells", *Science*, v. 243, pp. 1360-1363.
- DENNIS, P., EDWARDS, E.A., LISS, S.N., FULTHORPE, R., 2003, "Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, pp. 769-778.
- DINCER, A.R., KARGI, F., 1999, "Salt inhibition in nitrification and denitrification of saline wastewater", *Environmental Technology*, v. 20, pp. 1147-1153.
- DINCER, A.R., KARGI, F., 2001, "Salt inhibition kinetics in nitrification of synthetic saline wastewater", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, pp. 661-665.
- DIONISI, H.M., LAYTON, A.C., HARMS, G., GREGORY, I.R., ROBINSON, K.G., SAYLER, G.S., 2002, "Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira spp.* from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, pp. 245-253.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., 1956, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Analytical Chemistry*, v. 28, pp. 350-356.
- EBRAHIMI, S., GABUS, S., ROHRBACH-BRANDT, E., HOSSEINI, M., ROSSI, P., MAILLARD, J., HOLLIGER, C., 2010, "Performance and microbial community composition dynamics of aerobic granular sludge from sequencing batch bubble column reactors operated at 20°C, 30°C and 35°C", *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 87, pp. 155-1568.
- EPA - United States Environmental Protection Agency (1983). *Emerging technology: the biological aerated filter – a promising biological process*. 832/R-83-102.
- EPA - United States Environmental Protection Agency (2007) *National Section 303(d) List Fact Sheet*. Acesso em 25 de novembro de 2011. Disponível na página web: URL: http://www.epa.gov/national_rpt.control.

- ETCHEBEHERE, C., CABEZAS, A., DABERT, P., MUXI, L., 2003, “Evolution of the bacterial community during granules formation in denitrifying reactors followed by molecular, culture-independent techniques”, *Water Science and Technology*, v. 48, pp. 75-79.
- ETTERER, T., WILDERER, P.A., 2001, “Generation and properties of aerobic granular sludge”, *Water Science and Technology*, v. 43, pp. 19-26.
- FIGUEROA, L.A., SILVERSTEIN, J., 1992, “The effect of particulate organic matter on biofilm nitrification”, *Water Environment Research*, v. 64, pp. 728-733.
- FIGUEROA M., MOSQUERA-CORRAL, A., CAMPOS, J.L., MÉNDEZ, R., 2008, “Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors”, *Water Science and Technology*, v. 58, pp. 479-485.
- FILIPE, C.D.M., DAIGGER, G.T., GRADY, C.P.L., 2001, “Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms”, *Water Environment Research*, v. 73, pp. 213–222.
- FLOWERS, J.J., He, S., YILMAZ, S., NOGUERA, D.R., MCMAHON, K.D., 2009, “Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different “*Candidatus Accumulibacter*” clades”, *Environmental Microbiology Reports*, v. 1, pp. 583-588.
- FOCHT, D.D., VERSTRAETE, W., 1977, “Biochemical ecology of nitrification and denitrification”, *Advances in Microbial Ecology*, v. 1, pp. 135-214.
- FUKASE, T., SHIBATA, M., MIYAJI, Y., 1984, “The Role of an Anaerobic Stage on Biological Phosphorus Removal”, *Water Science and Technology*, v. 17, pp. 69-80.
- FURUMAI, H., RITTMANN, B.E., 1994, “Interpretation of bacterial activities in nitrification filters by a biofilm model considering the kinetics of soluble microbial products”, *Water Science and Technology*, v. 30, pp. 147-156.
- GAO, D., LIU, L., LIANG, H., WU, W.-M., 2011, “Aerobic granular sludge: characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment”, *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 31, pp. 137-152.
- GARCIA MARTIN, H., IVANOVA, N., KUNIN, V., WARNECKE, F., BARRY, K.W., MCHARDY, A.C, YEATES, C., HE, S., SALAMOV, A.A., SZETO, E., DALIN, E., PUTNAM, N.K., SHAPIRO, H.J., PANGILINAN, J.L., RIGOUTSOS, I., KYRPIDES, N.C., BACKALL, L.L., MCMAHON, K.D., HUGENHOLTZ, P., 2006, “Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities”, *Nature Biotechnology*, v. 24, pp. 1263-1269.
- GROTENHUIS, J.T.C., SMITH, M., VAN LAMMERAN, A.A.M., STAMS, A.J.M., ZEHNDER, A.J.B., 1991, “Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 36, pp. 115-119.

- GRUNDITZ, C., DALHAMMAR, G., 2001, "Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*", *Water Research*, v. 35, n. 2, pp. 433-440.
- GUISASOLA, A., QURIE, M., VARGAS, M.M., CASAS, C., BAEZA, J.A., 2009, "Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as electron acceptor", *Process Biochemistry*, v. 44, pp. 689-695.
- HAMAMOTO, Y., TABATA, S., OKUBO, Y., 1997, "Development of intermittent cyclic process for simultaneous nitrogen and phosphorus removal", *Water Science and Technology*, v. 35, pp. 145-152.
- HANAKI, K., WANTAWIN, C., OHGAKI, S., 1990, "Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor", *Water Reseach*, v. 24, pp. 297-302.
- HÄNEL, K., 1988, *Ellis Horwood series in water and wastewater technology biological treatment of sewage by the activated sludge process*. New York: Ellis Horwood Limited.
- HARDMAN, D.J., MCELLOWNEY, S., WAITE, S., 1993, *Pollution: ecology and biotreatment*. UK: Longman Scientific and Technical, pp. 332.
- HARREMOËS, P., 1982, "Criteria for nitrification in fixed film reactors", *Water Science and Technology*, v. 14, pp. 167-185.
- HE, S., GALL, D.L., MCMAHON, K.D., 2007, "'*Candidatus* accumulibacter" population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, pp. 5865-5874.
- HE, S., GU, A.Z., MCMAHON, K.D., 2006, "Fine-scale differences between Accumulibacter-like bacteria in enhanced biological phosphorus removal activated sludge", *Water Science and Technology*, v. 54, pp. 111-117.
- HEIJNEN, J.J., MULDER, A., WELTEVREDE, R., HOLS, P.H., VAN LEEUWEN, H.L.J.M., 1990, "Large-scale anaerobic/aerobic treatment of complex industrial wastewater using immobilized biomass in fluidized bed and air-lift suspension reactors", *Chemical Engineering & Technology*, v. 13, pp. 202-208.
- HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 1998, *Method for Acquiring Grain-shaped Growth of a Microorganism in a Reactor*. US and European patent - WO 98/37027, Technische Universiteit Delft, The Netherlands.
- HELLINGA, C., SCHELLEN, A.A.J.C., MULDER, J.W., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1998, "The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium rich wastewater", *Water Science Technology*, v. 37, pp. 135-142.

- HENZE, M., HARREMOËS, P., LA COUR JANSEN, J., ARVIN, E., 1997, *Biological and Chemical Wastewater Treatment*. 2^a ed., Berlin: Springer.
- HENZE, M., HARREMOËS, P., LA COUR JANSEN, J., ARVIN, E., 2002, *Wastewater Treatment: biological and chemical process*. 3^a ed., Berlin: Springer-Verlag.
- HERBERT, R.A., 1990, "Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments", *Methods in Microbiology*, v. 19, pp. 1-40.
- HOLLER, S., TROSCH, W., 2001, "Treatment of urban wastewater in a membrane bioreactor at high organic loading rates", *Journal of Biotechnology*, v. 92, pp. 95-101.
- HONG, C.C., CHAN, S.-K., SHIM, H., 2007, "Effect of chloride on biological nutrient removal from wastewater", *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, v. 2, pp. 85-92.
- HORNEK, R., POMMERENING-ROSER, A., KOOPS, H.P., FARNLEITNER, A.H., KREUZINGER, N., KIRSCHNER, A., MACH, R.L., 2006, "Primers containing universal bases reduce multiple *amoA* gene specific DGGE band patterns when analysing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment", *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, pp. 147-155.
- HU, X., SHI, Y., WANG, J., 2009, "Characteristics of municipal wastewater treatment by moving-bed biofilm reactor", *International Journal of Environment and Pollution*, v. 37, pp. 177-185.
- HU, Z., CHANDRAN, K., GRASSO, D., Smets, B., 2002b, "Effect of nickel and cadmium speciation on nitrification inhibition", *Environmental Science & Technology*, v. 36, pp. 3074-3078.
- HU, Z.-R., WENTZEL, M.C., EKAMA, G.A., 2002a, "Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems", *Water Research*, v. 36, pp. 4927-4937.
- HUANG, C.S.S., 1986, "Nitrification kinetics and its RBC applications", *Journal of Environmental Engineering*, v. 108, pp. 473-487.
- HULSHOFF POL., L.W., DE ZEEUW, W.J., VEIZEBOER, C.T.M., LETTINGA, G., 1983, "Granulation in UASB reactors", *Water Science and Technology*, v. 15, pp. 291-304.
- IIDA, Y., TERANISHI, A., 1984, "Nitrogen removal from municipal wastewater by a single submerged filter", *Journal of Water Pollution Control Federation*, v. 56, pp. 251-258.
- JAAR, M.A., WILDERER, P.A., 1992, "Granular activated carbon sequencing batch biofilm reactor to treat problematic wastewater", *Water Science and Technology*, v. 26, pp. 1195-1203.

- JIANG, Y., MARANG, L., KLEEREBEZEM, R., MUYZER, G., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2011, "Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor", *The ISME Journal*, v. 5, pp. 896-907.
- JETTEN, M.S.M., STROUS, M., VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T., SCHALK, J., VAN DONGEN, U.G.J.M., VAN DE GRAAF, A.A., LOGEMANN, S., MUYZER, G., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., Kuenen, J.G., 1999, "The anaerobic oxidation of ammonium", *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, pp. 421-437.
- JI, M., YU, J., CHEN, H., YUE, P.L., 2001, "Removal of slowly biodegradable COD in combined thermophilic UASB and MBBR systems", *Environmental Technology*, v. 22, pp. 1069-1079.
- JIANG, H.L., TAY, J.-H., TAY, S.T.L., 2002, "Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol", *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, pp. 439-445.
- JIN, R.-C., ZHENG, P., MAHMOOD, Q., HU, B.-L., 2007, "Osmotic stress on nitrification in an airlift bioreactor", *Journal of Hazardous Materials*, v. 146, pp. 148-154.
- JOHNSON, C.H., PAGE, M.W., BLAHA, L., 2000, "Full scale moving bed biofilm reactor results from refinery and slaughter house treatment facilities", *Water Science and Technology*, v. 41, pp. 401-407.
- JOHNSON, K., JIANG, Y., KLEEREBEZEM, R., MUYZER, G., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2009, "Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity", *Biomacromolecules*, v. 10, pp. 670-676.
- JULIASTUTI, S.R., BAEYENS, J., CREEMERS, C., 2003, "Inhibition of nitrification by heavy metals and organic compounds: the ISO 9509 test", *Environmental Engineering Science*, v. 20, pp. 79-90.
- JURETSCHKO, S., TIMMERMANN, G., SCHMID, M., SCHLEIFER, K.-H., Pommerening-Roser, A., Koops, H.-P., Wagner, M., 1998, "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*, v. 64, pp. 3042-3051.
- KAMPSCHREUR, M.J., PICIOREANU, C., TAN, N., KLEEREBEZEM, R., JETTEN, M.S.M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2007, "Unravelling the source of nitric oxide emission during nitrification", *Water Environment Research*, v. 79, pp. 2499-2509.
- KARGI, F., UYGUR, A., 2004, "Hydraulic residence time effects in biological nutrient removal using five-step sequencing batch reactor", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, pp. 167-172.

- KATO, M.T., FIELD, J.A., VERSTEEG, P., LETTINGA, G., 1994, "Feasibility of expanded granular sludge bed reactors for the anaerobic treatment of low-strength soluble wastewaters", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 469-479.
- KATSOGIANNIS, A., KORNAROS, M., LYBERATOS, G., 2003, "Enhanced nitrogen removal in SBRs by bypassing nitrate generation accomplished by multiple aerobic/anoxic phase pairs", *Water Science and Technology*, v. 44, n. 11, pp. 53-59.
- KELLY, J.J., SIRIPONG, S., MCCORMACK, J., JANUS, L.R., URAKAWA, H., FANTROUSSI, S.E., NOBLE, P.A., SAPPÉLSA, L., RITTMANN, B.E., STAHL, D.A., 2005, "DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples", *Water Research*, v. 39, pp. 3229-3238.
- KENNEDY, A.C., 1999, "Bacterial diversity in agroecosystems", *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 74, pp. 65-76.
- KERMANI, M., BINA, H., MOVAHEDIAN, H., AMIN, M.M., NIKAEIN, M., 2008, "Application of moving bed biofilm process for biological organics and nutrients removal from municipal wastewater", *American Journal of Environmental Sciences*, v. 4, pp. 675-682.
- KERN-JESPERSEN, J.P., HENZE, M., 1993, "Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions", *Water Research*, v. 27, pp. 617-624.
- KISHIDA, N., TSUNEDA, S., KIM, J.H., SUDO, R., 2009, "Simultaneous nitrogen and phosphorus removal from high-strength industrial wastewater using aerobic granular sludge", *Journal of Environmental Engineering*, v. 135, pp. 153-158.
- KONNEKE, M., BERNHARD, A.E., DE LA TORRE, J.R., WALKER, C.B., WATERBURY, J.B., STAHL, D.A., 2005, "Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon", *Nature*, v. 437, pp. 543-546.
- KUBA, T., SMOLDERS, G.J.F., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1993, "Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic and anoxic sequencing batch reactor", *Water Science and Technology*, v. 27, pp. 241-252.
- KUBA, T., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1996, "Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system", *Water Research*, v. 30, pp. 1702-1710.
- LE CLOIREC, P., MARTIN, G., 1984, "The mean residential time application in an aerated immersed biological filter", *Environmental Technology Letters*, v. 5, pp. 275-282.
- LEE, L.Y., ONG, S.L., NG, W.J., 2004, "Biofilm morphology and nitrification activities: recovery of nitrifying biofilm particles covered with heterotrophic outgrowth", *Bioresource Technology*, v. 95, pp. 209-214.

- LETTINGA, G., 1995, "Anaerobic digestion and wastewater treatment", *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 67, pp. 3-28.
- LETTINGA, G., REBAC, S., PARSHINA, S., NOZHEVNIKOVA, A., VAN LIER, J.B., STAMS, A.J.M., 1995, "High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, pp. 1696-1702.
- LETTINGA, G., VAN VELSEN, A.F.M., HOBMA, S.W., DE ZEEUW, W., KLAPWIJK, A., 1980, "Use of upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 22, pp. 699-734.
- LI, A.-J., YANG, S.-F., LI, X.-Y., GU, J.-D., 2008b, "Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates", *Water Research*, v. 42, pp. 3552-3560.
- LI, Z.H., WANG, X.C., 2008, "Effects of Salinity on the Morphological Characteristics of aerobic granules", *Water Science and Technology*, v. 58, pp. 2421-2426.
- LIN, L.H., JIAN, L.W., XIANG, H.W., YI, Q., 2005, "The formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactor (SBR) by seeding anaerobic granules", *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 1-7.
- LIN, Y.M., BASSIN, J.P., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2012, "The contribution of exopolysaccharides induced struvites accumulation to ammonium adsorption in aerobic granular sludge", *Water Research*, v. 46, n. 4, 986-992.
- LIU, Q.S., LIU, Y., SHOW, K.Y., TAY, J.-H., 2009, "Toxicity Effect of Phenol on Aerobic Granules", *Environmental Technology*, v. 30, pp. 69-74.
- LIU, Q.S., LIU, Y., TAY, S.T.L., SHOW, K.Y., IVANOV, V., MOY, B.Y.P., 2005a, "Startup of pilot-scale aerobic granular sludge reactor by stored granules", *Environmental Technology*, v. 26, pp. 1363-1370.
- LIU, W.T., MARSH, T.L., CHENG, H., FORNEY, L., 1997b, "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, pp. 4516-4522.
- LIU, W.T., NAKAMURA, K., MATSUO, T., MINO, T., 1997a, "Internal energy-based competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating bacteria in biological phosphorus removal reactors – effect of P/C feeding ratio", *Water Research*, v. 31, pp. 1430-1438.
- LIU, Y., SHU, F.Y., TAY, J.-H., 2002, "Aerobic granules novel zinc biosorbent", *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, pp. 548-551.
- LIU, Y., TAY, J.-H., 2002, "The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge", *Water Research*, v. 36, pp. 1653-1665.

- LIU, Y., TAY, J.-H., 2004, "State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment", *Biotechnol. Adv.*, v. 22, pp. 533-563.
- LIU, Y., WANG, Z.-W., QIN, L., LIU, Y.-Q., TAY, J.-H., 2005b, "Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, pp. 26-32.
- LIU, Y., XU, H., YANG, S.F., TAY, J.-H., 2003, "A general model for biosorption of Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} by aerobic granules", *Journal of Biotechnology*, v. 102, pp. 233-239.
- LIU, Y., YANG, S.F., TAN, S.F., LIN, Y.M., TAY, J.-H., 2002, "Aerobic granules: a novel zinc biosorbent", *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, pp. 548-551.
- LOPEZ-VAZQUEZ, C.M., HOOIJMANS, C.M., BRDJANOVIC, D., GIJZEN, H.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2009, "Temperature effects on glycogen accumulating organisms", *Water Research*, v. 43, pp. 2852-2864.
- LOPEZ-VAZQUEZ, C.M., SONG, Y.I., HOOIJMANS, C.M., BRDJANOVIC, D., MOUSSA, M.S., GIJZEN, H.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2007, "Short-term temperature effects on the anaerobic metabolism of Glycogen Accumulating Organisms", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, pp. 483-495.
- LOPEZ-VAZQUEZ, C.M., SONG, Y.I., HOOIJMANS, C.M., BRDJANOVIC, D., MOUSSA, M.S., GIJZEN, H.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2008, "Temperature effects on the aerobic metabolism of glycogen accumulating organisms", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, pp. 295-306.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951, "Protein measurement with folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, pp. 265-275.
- LUDZACK, F.J., NORAN, P.K., 1965, "Tolerance of high salinities by conventional wastewater treatment process", *Journal of Water Pollution Control Federation*, v. 37, pp. 1404-1416.
- MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J., 1997, *Brock biology of microorganisms*. 8^a ed., New York: Prentice Hall
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J., 2002, *Brock Biology of Microorganisms*. 9^a ed., New Jersey: Prentice Hall.
- MANSELL, B.O.; SCHROEDER, E.D., 1998, "Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor", *Water Science and Technology*, v. 38, n. 1, pp. 9-14.
- MAURER, M., ABRAMOVICH, D., SIEGRIST, H., GUJER, W., 1999, "Kinetics of biologically induced phosphorus precipitation in wastewater treatment", *Water Research*, v. 33, pp. 484-493.

- MCSWAIN STURM, B.S., IRVINE, R.L., 2008, "Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation", *Water Science and Technology*, v. 58, pp. 781-787.
- MCSWAIN, B.S., IRVINE, R.L., HAUSNER, M., WILDERER, P.A., 2005, "Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, pp. 1051-1057.
- MCSWAIN, B.S., IRVINE, R.L., WILDERER, P.A., 2003, "The effect of intermittent feeding on aerobic granule structure". *5th International Conference on Biofilm Systems by International Water Association*. Cape Town, South Africa.
- MEASURES, J.C., 1975, "Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria", *Nature*, v. 257, pp. 398-400.
- MEINHOLD, J., ARNOLD, E., ISAACS, S., 1999, "Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge", *Water Research*, v. 33, pp. 1871-1883.
- MENDOZA-ESPINOSA, L., STEPHENSON, T., 1999, "A review of biological aerated filters (BAFs) for wastewater treatment", *Environmental Engineering Science*, v. 16, pp. 201-216.
- METCALF & EDDY, 1991, *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse*. 3^a ed., New York: McGraw Hill.
- METCALF & EDDY, 2003, *Wastewater engineering: treatment and reuse*, 4^a ed., New York: McGraw Hill.
- MINO, T., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1998, "Microbiology and biochemistry of the enhanced phosphate removal process", *Water Research*, v. 32, pp. 3193-3297.
- MOBARRY, B.K., WAGNER, M., URBAIN, V., RITTMANN, B.E., STAHL, D.A., 1996, "Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, pp. 2156-2162.
- MOON, B.H., SEO, G.T., LEE, T.S., KIM, S.S., YOON, C.H., 2002, "Effects of salt concentration on floc characteristics and pollutants removal efficiencies in treatment of seafood wastewater by SBR", *Water Science and Technology*, v. 47, pp. 65-70.
- MORGENROTH, E., SHERDEN, T., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., WILDERER, P.A., 1997, "Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor", *Water Research*, v. 31, pp. 3191-3194.
- MOSQUERA-CORRAL, A., DE KREUK, M.K., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2005, "Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor", *Water Research*, v. 39, pp. 2676-2686.

- MOUSSA, M.S., HOOIJMANS, C.M., LUBBERDING, H.J., GIJZEN, H.J., van Loosdrecht M.C.M., 2005, "Modelling nitrification, heterotrophic growth and predation in activated sludge", *Water Research*, v. 39, pp. 5080-5098.
- MOUSSA, M.S., SUMANASEKERA, D.U., IRAHIM, S.H., LUBBERDING, H.J., HOOIJMANS, C.M., GIJZEN, H.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2006, "Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers", *Water Research*, v. 40, pp. 1377-1388.
- MOY, B.Y.P., TAY, J.-H., TOH, S.K., LIU, Y., TAY, S.T.L., 2002, "High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules", *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, pp. 407-412.
- MULLIKEN, S.P., JOLLY, W.L., 1916, *A method for the identification of pure organic compounds*. v. 2, New York: John Wiley & Sons.
- MURNLEITNER, E., KUBA, T., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1997, "An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54, pp. 434-450.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G., 1993, "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, pp. 695-700.
- MUYZER, G., SMALLA, K., 1998, "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology", *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, pp. 127-141.
- NAIR, R.R., DHAMOLE, P.B., LELE, S.S., D'SOUZA, S.F., 2007, "Biological denitrification of high strength nitrate waste using preadapted denitrifying sludge", *Chemosphere*, v. 67, n. 8, pp. 1612-1617.
- NARCIS, N., REBHUN, M., SCHEINDORF, C., 1979, "Denitrification at various carbon to nitrogen ratios", *Water Research*, v. 13, pp. 93-98.
- NG, W.J., SIM, T.S., ONG, S.L., NG, K.Y., RAMASAMY, M., TAN, K.N., 1993, "Efficiency of sequencing batch reactor (SBR) in the removal of selected microorganisms from domestic sewage", *Water Research*, v. 27, pp. 1591-1600.
- ØDEGAARD, H., 2006, "Innovation in wastewater treatment: the moving bed biofilm process", *Water Science and Technology*, v. 53, pp. 17-33.
- ØDEGAARD, H., RUSTEN, B., WESTRUM, T., 1994, "A new moving bed biofilm reactor-applications and results", *Water Science and Technology*, v. 29, pp. 157-165.
- OEHMEN, A., LEMOS, P.C., CARVALHO, G., YUAN, Z., KELLER, J., BLACKALL, L.L., REIS, M.A.M., 2007, "Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale", *Water Research*, v. 41, pp. 2271-2300.

- OEHMEN, A., SAUNDERS, A.M., VIVES, M.T., YUAN, Z., KELLER, J., 2006a, "Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources", *Journal of Biotechnology*, v. 123, pp. 22-32.
- OEHMEN, A., VIVES, M.T., LU, H., YUAN, Z., KELLER, J., 2005a, "The effect of pH on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms", *Water Research*, v. 39, pp. 3727-3737.
- OEHMEN, A., YUAN, Z., BLACKALL, L.L., KELLER, J., 2004, "Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms", *Water Science and Technology*, v. 50, pp. 139-144.
- OEHMEN, A., YUAN, Z., BLACKALL, L.L., KELLER, J., 2005b, "Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 91, pp. 162-168.
- OEHMEN, A., ZENG, R.J., SAUNDERS, A.M., BLACKALL, L.L., KELLER, J., YUAN, Z., 2006b, "Anaerobic and aerobic metabolism of glycogen-accumulating organisms selected with propionate as the sole carbon source", *Microbiology* 152, 2767-2778.
- OKABE, S., SATOH, H., WATANABE, Y., 1999, "In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, pp. 3182-3191.
- PACE, N.R., 1996. "New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology", *ASM News*, v. 62, pp. 463-470.
- PAGGA, U., BACHNER, J., STROTMANN, U., 2006, "Inhibition of nitrification in laboratory test and model wastewater treatment plants", *Chemosphere* 65, 1-8.
- PANSWAD, T., ANAN, C., 1999, "Impact of high chloride wastewater on an anaerobic/anoxic/aerobic process with and without inoculation of chloride acclimated seeds", *Water Research*, v. 33, pp. 1165-1172.
- PARK, S., BAE, W., 2009, "Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid", *Process Biochemistry*, v. 44, pp. 631-640.
- PELADAN, J.G., LEMMEL, H., TARALLO, S., TATTER-SALL, S., PUJOL, R., 1997, "A new generation of upflow biofilters with high water velocities". *Proceedings of the International Conference on Advanced Wastewater Treatment Processes*, Leeds, UK.
- PENG, D., BERNET, N., DELGENES, J.-P., MOLETTA, R., 1999, "Aerobic granular sludge – a case report", *Water Research*, v. 33, pp. 890-893.

- PETERSON, S.B., WARNECKE, F., MADEJSKA, J., MCMAHON, K.D., HUGENHOLTZ, P., 2008, "Environmental distribution and population biology of *Candidatus accumulibacter*, a primary agent of biological phosphorus removal", *Environmental Microbiology*, v. 10, pp. 2692-2703.
- PICHARD, S.L., PAUL, J.H., 1993, "Gene expression per gene dose, a specific measure of gene expression in aquatic microorganisms", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, pp. 451-457.
- PIJUAN, M., YE, L., YUAN, Z., 2011, "Could nitrite/free nitrous acid favour GAOs over PAOs in enhanced biological phosphorus removal systems?", *Water Science and Technology*, v. 63, pp. 345-351.
- PIPES, W.O., 1978, "Microbiology of activated sludge bulking", *Advances in Applied Microbiology*, v. 24, pp. 85-127.
- POULSEN, L.K., BALLARD, G., STAHL, D.A., 1993, "Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, pp. 1354-1360.
- PUJOL, R., HAMON, M., KANDEL, X., LEMMEL, H., 1994, "Biofilters: flexible, reliable biological reactors", *Water Science and Technology*, v. 29, pp. 33-38.
- QIN, L., LIU, Y., 2006, "Aerobic granulation for organic carbon and nitrogen removal in alternating aerobic-anaerobic sequencing batch reactor", *Chemosphere*, v. 63, pp. 926-933.
- QIN, L., TAY, J.-H., LIU, Y., 2004, "Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors", *Process Biochemistry*, v. 39, pp. 579-584.
- RAMALHO, R.S., 1983, *Introduction to wastewater treatment processes*. 2^a ed., San Diego: Academic Press Inc.
- RATCLIFFE, M., ROGERS, C., MERDINGER, M., PRINCE, J., MABUZA, T., JOHNSON, C.H., 2006, "Treatment of high strength chemical industry wastewater using moving bed biofilm reactor (MBBR) and powered activated carbon (PAC) technology". *Proceedings of the Water Environmental Federation, Weftec*, 1677-1694.
- RITTMANN, B.E., 2006, "Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology", *Trends in Biotechnology*, v. 24, pp. 261-266.
- RITTMANN, B.E., BRUNNER, C.W., 1984, "The nonsteady-state process for advanced organics removal", *Journal of Water Pollution Control Federation*, v. 56, pp. 874-880.
- RITTMANN, B.E., LANGELAND, W.E., 1985, "Simultaneous denitrification with nitrification in single channel oxidation ditches", *Journal of Water Pollution Control Federation*, v. 45, pp. 249-260.

- RITTMANN, B.E., MCCARTY, P.L., 2001, *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. New York: McGraw-Hill Book Co.
- RITTMANN, B.E., REGAN, J.M., STAHL, D.A., 1994, "Nitrification as source of soluble organic substrate in biological treatment", *Water Science and Technology*, v. 30, pp. 1-8.
- ROGALLA, F., BOURBIGOT, M.-M., 1990, "New developments in complete nitrogen removal with biological aerated filters", *Water Science and Technology*, v. 22, pp. 273-280.
- ROS, M., MEJAC, B., 1991, "Treatment of wastewater in an upflow packed-bed reactor", *Water Science and Technology*, v. 24, pp. 81-88.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F., 2002, *Utilização da eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradientes de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana*. In: MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. Recursos genéticos e melhoramento – microrganismos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R., 2003, "Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration", *Water Research*, v. 37, pp. 1371-1377.
- RUSTEN, B., EIKEBROKK, B., ULGENES, Y., LYGREN, E., 2006, "Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors", *Aquacultural Engineering*, v. 34, pp. 322-331.
- RUSTEN, B., HEM, L., ØDEGAARD, H., 1995, "Nitrification of municipal wastewater in moving-bed biofilm reactors", *Water Environment Research*, v. 67, pp. 75-86.
- RUSTEN, B., MCCOY, M., PROCTOR, R., SILJUDALEN, J.G., 1998, "The innovative moving bed biofilm reactor/solids contact reaeration process for secondary treatment of municipal wastewater", *Water Environment Research*, v. 70, pp. 1083-1089.
- SAITO, T., BRDJANOVIC, D., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2004, "Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms", *Water Research*, v. 38, pp. 3760-3768.
- SALVADÓ, H., MAS, M., MENÉNDEZ, S., GRACIA, M.P., 2001, "Effects of shock loads of salt on protozoan communities of activated sludge", *Acta Protozoologica*, v. 40, pp. 177-185.
- SALVETTI, R., AZZELLINO, A., CANZIANI, R., BONOMO, L., 2006, "Effects of temperature on tertiary nitrification in moving-bed biofilm reactors", *Water Research*, v. 40, pp. 2981-2993.

- SÁNCHEZ, O., ASPÉ, E., MARTÍ, M.C., ROECKEL, M., 2004, "The Effect of Sodium Chloride on the Two-Step Kinetics of the Nitrifying Process", *Water Environment Research*, v. 76, pp. 73-80.
- SANZ, J. L.; KÖCHLING, T., 2007, "Molecular biology techniques used in wastewater treatment : An overview", *Process Biochemistry*, v. 42, pp. 119-133.
- SAUNDERS, A.M., OEHMEN, A., BLACKALL, L.L., YUAN, Z., KELLER, J., 2003, "The effect of GAOs (glycogen accumulating organisms) on aerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR (enhanced biological phosphorus removal) plants", *Water Science and Technology*, v. 47, pp. 37-43.
- SCHÄFER, H., MUYZER, G., 2001, "Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology", *Methods in Microbiology*, v. 30, pp. 425-468.
- SCHENK, H., HEGEMANN, W., 1995, "Nitrification inhibition by high salt concentrations in the aerobic biological treatment of tannery wastewater", *GWF-Wasser/Abwasser*, v. 136, pp. 465-470.
- SCHMID, M., TWACHTMANN, U., KLEIN, M., STROUS, M., JURETSCHKO, S., JETTEN, M., METZGER, J.W., SCHLEIFER, K.H., WAGNER, M., 2000, "Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalysing anaerobic ammonium oxidation", *Systematic and Applied Microbiology*, v. 23, pp. 93-106.
- SCHMID, M., WALSH, K., WEBB, R., RIJPSRA, W.I., VAN DE PAS-SCHOONEN, K., VERBRUGGEN, M.J., HILL, T., MOFFETT, B., FUERST, J., SCHOUTEN, S., DAMSTÉ, J.S., HARRIS, J., SHAW, P., JETTEN, M., STROUS, M., 2003, "Candidatus "Scalindua brodae", sp., nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp., nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria", *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, pp. 529-538.
- SCHRAMM, A., DE BEER, D., WAGNER, M., AMANN, R., 1998, "Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, pp. 3480-3485.
- SCHWARZENBECK, N., BORGES, J.M., WILDERER, P.A., 2005, "Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, pp. 711-718.
- SEDLAK, R., 1991, *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater*. 2^a ed., New York: Lewis Publishers.
- SEVIOUR, R.J., BLACKALL, L.L., 1999, *Introduction to the microorganisms found in activated sludge processes*. In: The microbiology of activated sludge. Seviour, R.J., Blackall, L.L. (eds.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2-5.
- SHI, X.Y., YU, H.Q., SUN, Y.J., HUANG, X., 2009, "Characteristics of aerobic granules rich in autotrophic ammonium-oxidizing bacteria in a sequencing batch reactor", *Chemical Engineering Journal*, v. 147, pp. 102-109.

- SHIN, D.H., SHIN, W.S., KIM, Y.H., HAN, M.H., CHOI, S.J., 2006, "Application of a combined process of moving-bed biofilm reactor (MBBR) and chemical coagulation for dyeing wastewater treatment", *Water Science and Technology*, v. 54, pp. 181-189.
- SKINDE, J.R., BHAGAT, S.K., 1982, "Industrial wastes as carbon sources in biological denitrification", *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 54, pp. 370-377.
- SLAWOMIR, C., KULIKOWSKA, D., KACZOWKA, E., KOWAL, P., 2010, "Characterization of bacterial structures in a two-stage moving-bed biofilm reactor (MBBR) during nitrification of the landfill leachate", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, pp. 1140-1151.
- SMOLDERS, G.J.G., VAN DER MEIJ, J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1994a, "Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, pp. 461-470.
- SMOLDERS, G.J.G., VAN DER MEIJ, J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1994b, "Stoichiometry model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 837-848.
- SØRENSEN, B.H., JØRGENSEN, S.E., 1993, *The removal of nitrogen compounds from wastewater*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- SORIA, F.L., CHAVARRIA, J.M., 1978, *Técnicas de defensa del medio ambiente*. v. 2, Editorial Labor S/A, pp. 235-239.
- STENSEL, H.D., BRENNER, R.C., LEE, K.M., MELCER, H., RAKNESS, K., 1988, "Biological aerated filter evaluation", *Journal of Environmental Engineering*, v. 114, pp. 655-671.
- STROUS, M., FUERST, J.A., KRAMER, E.H.M, LOGEMANN, S., MUYZER, G., VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T., WEBB, R., KUENEN, G., JETTEN, M.S.M., 1999a, "Missing lithotroph identified as new Planctomycete", *Nature*, v. 400, pp. 446-449.
- STROUS, M., KUENEN, J.G., FUERST, J.A., WAGNER, M., JETTEN, M.S.M., 2002, "The Anammox case - A new experimental manifesto for microbiological eco-physiology", *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, pp. 693-702.
- STROUS, M., KUENEN, J.G., JETTEN, M.S.M., 1999b, "Key physiology of anaerobic ammonium oxidation", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, pp. 3248-3250.
- STROUS, M., PELLETIER, E., MANGENOT, S., RATTEI, T., LEHNER, A., TAYLOR, M.W., HORN, M., DAIMS, H., BARTOL-MAVEL, D., WINCKER, P., BARBE, V., FONKNECHTEN, N., VALLENET, D., SEGURENS, B., SCHENOWITZ-TRUONG, C., MEDIGUE, C., COLLINGRO, A., SNEL, B., DUTILH, B.E., OP DEN CAMP, H.J.M., VAN DER DRIFT, C., CIRPUS, I., VAN DE

- PAS-SCHOONEN, K.T., HARHANGI, H.R., VAN NIFTRIK, L., SCHMID, M., KELTJENS, J., VAN DE VOSSENBERG, J., KARTAL, B., MEIER, H., FRISHMAN, D., HUYNEN, M.A., MEWES, H.W., WEISSENBACH, J., JETTEN, M.S.M., WAGNER, M., and LE PASLIER, D., 2006, "Deciphering the evolution and metabolism of an Anammox bacterium from a community genome", *Nature*, v. 440, pp. 790-794.
- STRYER, L., 1996, *Explorando os genes*. In: Bioquímica (4^a ed.), New York: FREEMAN, W.H. & Company.
- SUN, X.F., WANG, S.G., LIU, X.W., GONG, W.X., BAO, N., ZHANG, H.Y., 2008, "Biosorption of Malachite Green from Aqueous Solutions onto Aerobic Granules: Kinetic and Equilibrium Studies", *Bioresource Technology*, v. 99, pp. 3475-3483.
- SURAMPALLI, R.Y., TYAGI, R.D., SCHEIBLE, O.K., HEIDMAN, J.A., 1997, "Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors", *Bioresource Technology*, v. 61, pp. 151-157.
- TAM, N.F.T.; WONG, Y.S.; LEUNG, G., 1992, "Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrient by the nitrification-denitrification process", *Water Research*, v. 26, pp. 1229-1236.
- TAY, J.-H., JIANG, H.L., TAY, S.T.L., 2004, "High-rate biodegradation of phenol by aerobically grown microbial granules", *Journal of Environmental Engineering*, v. 130, pp. 1415-1423.
- TAY, J.-H., LIU, Q.S., LIU, Y., 2001, "Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor", *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, pp. 168-75.
- TAY, J.-H., LIU, Q.S., LIU, Y., 2002, "Aerobic granulation in sequential sludge blanket reactor", *Water Science and Technology*, v. 46, pp. 13-18.
- THIRD, K.A., SLIEKERS, A.O., KUENEN, J.G., JETTEN, M.S.M., 2001, "The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria", *Systematic and Applied Microbiology*, v. 24, pp. 588-596.
- TIJHUIS, L., REKSWINKEL, E., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1994a, "Dynamics of population of biofilm structure in the biofilm airlift reactor for carbon and nitrogen removal", *Water Science and Technology*, v. 29, pp. 337-384.
- TIJHUIS, L., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1994b, "Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms in small suspended particles in airlift reactors", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 595-608.
- TOH, S.K., TAY, J.-H., MOY, B.Y.P., TAY, S.T.L., 2003, "Size-effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, pp. 687-695.

- TSUNEDA, S., NAGANO, T., HOSHINO, T., EJIRI, Y., NODA, N., HIRATA, A., 2003, "Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor", *Water Research*, v. 37, pp. 4965-4973.
- TSUNEDA, S., PARK, S., HAYASHI, H., JUNG, J., HIRATA, A., 2001, "Enhancement of nitrifying biofilm using selected EPS produced by heterotrophic bacteria", *Water Science and Technology*, v. 43, pp. 197-204.
- UEMOTO, H.; SAIKI, H., 2000, "Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, pp. 4224-4228.
- URBAIN, V., BLOCK, J.C., MANEN, J., 1993, "Bioflocculation of activated sludge: an analytical approach", *Water Research*, v. 27, pp. 829-838.
- URBAIN, V., MOBARRY, B., DE SILVA, V., STAHL, D.A., RITTMANN, B.E., MANEM, J., 1998, "Integration of performance, molecular biology and modeling to describe the activated sludge process", *Water Science and Technology*, v. 37, pp. 223-229.
- UYGUR, A., KARGI, F., 2004, "Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor", *Enzyme Microbial Technology*, v. 34, pp. 313-318.
- VADIVELU, V.M., KELLER, J., YUAN, Z., 2006, "Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 95, pp. 830-839.
- VAN BENTHUM, W.A.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1997, "Process design for nitrogen removal using nitrifying biofilm and denitrifying suspended growth in a biofilm airlift suspension reactor", *Water Science and Technology*, v. 36, pp. 119-128.
- VAN DER LAST, A.R.M.; LETTINGA, G., 1992, "Anaerobic treatment of domestic sewage under moderate climatic (Dutch) conditions using upflow at increased superficial velocities", *Water Science and Technology*, v. 25, pp. 167-178.
- VAN DONGEN, U., JETTEN, M.S.M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2001, "The SHARON-ANAMMOX process for treatment of ammonium rich wastewater", *Water Science and Technology*, v. 44, pp. 153-160.
- VAN ELSAS, J. D., DUARTE, G. F., ROSADO, A. S., SMALLA, K., 1998, "Microbial and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment", *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, pp. 133-154.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., BRANDSE, F.A.M., DE VRIES, A.C., 1998, "Upgrading of wastewater treatment processes for integrated nutrient removal - The BCFS process", *Water Science and Technology*, v. 37, pp. 209-217.

- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HOOIJMANS, C.M., BRDJANOVIC, D., HEIJNEN, J.J., 1997a, "Biological phosphate removal processes", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, pp. 289-296.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., POT, M.A., HEIJNEN, J.J., 1997b, "Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses", *Water Science and Technology*, v. 35, pp. 41-47.
- VAN RIJN, J.; TAL, Y.; SCHREIER, H. J., 2006, "Denitrification in recirculating systems: Theory and applications", *Aquacultural Engineering*, v. 34, pp. 364-376.
- VAN'T RIET, K., TRAMPER, J., 1991, *Basic Bioreactor Design*. New York: Marcel Dekker.
- VEDRY, B., PAFFONI, C., GOUSAILLES, M., BERNARD, C., 1994, "First months operation of two biofilter prototypes in the waste water plant of Acheres", *Water Science and Technology*, v. 29, pp. 39-46.
- VERSTRAETE, W., ALEXANDER, M., 1972, "Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp.", *Journal of Bacteriology*, v. 110, pp. 955-961.
- VILLASEÑOR, J.C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., PICIOREANU, C., HEIJNEN, J.J., 2000, "Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor", *Water Science and Technology*, v. 41, pp. 323-330.
- VISHNIAC, W., SANTER, M., 1957, "The thiobacilli", *Bacteriological Reviews*, v. 21, pp. 195-213.
- VISVANATHAN, C., BEN AIM, R., PARAMESHWARAN, K., 2000, "Membrane separation bioreactors for wastewater treatment", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 30, pp. 1-48.
- VOLTERRA, L., BOUALAM, M., MENESGHEN, A., DUGHET, J.-P., DUCHEMIN, J., BONNEFOY, X., 2002, *Eutrophication and health*. World Health Organization Regional Office for Europe. Luxembourg: Office for official publication for the European Communities.
- VON SPERLING, M., Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos, 1996, *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias*. 2ª ed., v. 1, Belo Horizonte: Editora UFMG.
- WAGNER, M., AMANN, R., LEMMER, H., SCHLEIFER, K.-H., 1993, "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, pp. 1520-1525.
- WAGNER, M., LOY, A., 2002, "Bacterial community composition and function in sewage treatment system", *Environmental Biotechnology*, v. 13, pp. 218-227.

WAGNER, M., RATH, G., AMANN, R., KOOPS, H.-P., SCHLEIFER, K.-H., 1995, "In-situ identification of ammonia-oxidizing bacteria", *Systematic and Applied Microbiology*, v. 18, pp. 251-264.

WAGNER, M., RATH, G., KOOPS, H.-P., FLOOD, J., AMANN, R., 1996, "In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants", *Water Science and Technology*, v. 34, pp. 237-244.

WALTERS, E., HILLE, A., HE, M., OCHMANN, C., HORN, H., 2009, "Simultaneous nitrification/denitrification in biofilm airlift suspension (BAS) reactor with biodegradable carrier material", *Water Research*, v. 43, pp. 4461-4468.

WHANG, L.M., PARK, J.K., 2006, "Competition between polyphosphate- and glycogen- accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems: effect of temperature and sludge age", *Water Environment Research*, v. 78, pp. 4-11.

WHEALE, G., WILLIAMSON, D.J., 1980, "Unusual behaviour of ciliated protozoa in a secondary settlement tank", *Water Pollution Control*, v. 80, pp. 496-500.

WIESMANN, U., CHOI, I.S., DOMBROWSKI, E.M., 2007, *Fundamentals of biological wastewater treatment*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

WIESMANN, U., LIBRA, J., 1999, *Special aerobic wastewater and sludge treatment processes*. In: Winter, J. Biotechnology: Environmental Processes I, Weinheim: Wiley-VCH, v. 11a.

WILDERER, P.A., CUNNINGHAM, A., SCHLINDLER, U., 1995, "Hydrodynamics and shear stress: report from the discussion session", *Water Science and Technology*, v. 32, pp. 271-271

WILDERER, P.A.; DOELLERER, J.; IRVINE, R.L., 1997, *Sequencing batch reactor technology*. London: IWA Publishing.

WILDERER, P.A., MCSWAIN, B.S., 2004, "The SBR and its biofilm application potentials", *Water Science and Technology*, v. 50, pp. 1-10.

WILSON, W.J., STROUT, C.L., DESANTIS, T.Z., STILWELL, J.L., CARRANO, A.V., ANDERSON, G.L., 2002, "Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology", *Molecular and Cellular Probes*, v. 16, pp. 119-127.

WINKLER, M.-K.H., BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, R., DE BRUIN, L.M.M., VAN DEN BRAND, T.P.H., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2011a, "Selective sludge removal in a segregated aerobic granular biomass system as a strategy to control PAO-GAO competition at high temperatures", *Water Research*, v. 45, pp. 3291-3299.

WINKLER, M.-K.H., KLEEREBEZEM, R., KUENEN, J.G., YANG, J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2011b, "Segregation of biomass in cyclic anaerobic/aerobic

granular sludge allows the enrichment of anaerobic ammonium oxidizing bacteria at low temperatures”, *Environmental Science and Technology*, v. 45, pp. 7330-7337.

WINKLER, M.-K.H., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2012, “Integration of anammox into the granular sludge process for main stream wastewater treatment at ambient temperatures”, *Water Research*, v. 46, pp. 136-144.

WITZIG, R., MANZ, W., ROSENBERGER, S., KRÜGER, U., KRAUME, M., SZEWZYK, U., 2002, “Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater”, *Water Research*, v. 36, pp. 394-402.

WOESE, C., 1987, “Bacterial evolution”, *Microbiological Reviews*, v. 51, pp. 221-271.

WOOLARD, C.R., 1993, *Biological treatment of hypersaline wastewaters*, Tese de Doutorado, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, USA.

WOOLARD, C.R., IRVINE, R.L., 1994, “Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria”, *Water Environment Research*, v. 66, pp. 230-235.

WU, G., GUAN, Y., ZHAN, X., 2008, “Effect of salinity on the activity, settling and microbial community of activated sludge in sequencing batch reactors treating synthetic saline wastewater”, *Water Science and Technology*, v. 58, pp. 351-358.

XIAO, F., YANG, S.F., LI, X.Y., 2008, “Physical and hydrodynamic properties of aerobic granules produced in sequencing batch reactors”, *Separation and Purification Technology*, v. 63, pp. 634-641.

XIAO, Y., ROBERTS, D. J., ZUO, G., Badruzzaman, M., Lehman, G.S., 2010, “Characterization of microbial populations in pilot-scale fluidized-bed reactors treating perchlorate- and nitrate-laden brine”, *Water Research*, v. 44, pp. 4029-4036.

XU, H., LIU, Y., 2008, “Mechanisms of Cd²⁺, Cu²⁺ and Ni²⁺ biosorption by Aerobic Granules”, *Separation and Purification Technology*, v. 58, pp. 400-411.

YAO, L., YE, Z.F., WANG, Z.Y., NI, J.R., 2008, “Characteristics of Pb²⁺ Biosorption with Aerobic Granular Biomass”, *Chinese Science Bulletin*, v. 53, pp. 948-953.

YE, L., PENG, C.-Y., TANG, B., WANG, S.-Y., ZHAO, K.-F., PENG, Y.-Z., 2009, “Determination effect of influent salinity and inhibition time on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating saline sewage”, *Desalination*, v. 246, pp. 556-566.

YE, R. W.; THOMAS, S. M., 2001, “Microbiol nitrogen cycles: physiology, genomics and application”, *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, pp.307-312.

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

- YOU, S.-J., TSAI, Y.-P., HUANG, R.-Y., 2009, "Effect of heavy metals on nitrification performance in different activated sludge processes", *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, pp. 987-994.
- YU, H.-B., QUAN, X., DING, Y.-Z., 2007, "Medium-strength ammonium removal using a two-stage moving bed biofilm reactor system", *Environmental Engineering Science*, v. 24, pp. 595-601.
- YILMAZ, G., LEMAIRE, R., KELLER, J., YUAN, Z., 2008, "Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, pp. 529-541.
- ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G., 1994, "Functional diversity of bacterial communities: a quantitative approach", *Soil Biology & Biochemistry*, v. 26, pp. 1101-1108.
- ZENG, R.J., LEMAIRE, R., YUAN, Z., KELLER, J., 2003a, "Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 84, pp. 170-178.
- ZENG, R.J., SAUNDERS, A.M., YUAN, Z., BLACKALL, L.L., KELLER, J., 2003b, "Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 83, pp. 140-148.
- ZENG, R.J., YUAN, Z., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., KELLER, J., 2002, "Proposed modifications to metabolic model for glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, pp. 277-279.
- ZHAO, Y., CAO, D., LIU, L., JIN, W., 2006, "Municipal wastewater treatment by moving-bed biofilm reactor with diatomaceous Earth as carriers", *Water Environment Research*, v. 78, pp. 392-396.
- ZHENG, Y.M., YU, H.Q., LIU, S.J., 2006, "Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions", *Chemosphere*, v. 63, pp. 1791-1800.
- ZHENG, Y.M., YU, H.Q., SHENG, G.P., 2005, "Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor", *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 645-650.
- ZHOU, P., HE, J., QIAN, Y., 2003, "Biofilm airlift suspension reactor treatment of domestic wastewater", *Water, Air & Soil Pollution*, v. 144, pp. 81-100.
- ZHU, L., XU, X.Y., LUO, W.G., TIAN, Z. J., LIN, H.Z., ZHANG, N.N., 2008, "A Comparative Study on the Formation and Characterization of Aerobic 4-Chloroaniline-Degrading Granules in SBR and SABR", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, pp. 867-874.