



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRELIZA CAROLINA DEL GROSSI OLIVEIRA

**BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS E AUTOTRÓFICAS
ENVOLVIDAS NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE
LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO EM REATOR DE
LEITO MÓVEL**

LONDRINA
2013

ANDRELIZA CAROLINA DEL GROSSI OLIVEIRA

**BACTERIAS HETEROTROFICAS E AUTOTROFICAS
ENVOLVIDAS NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE
LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO EM REATOR DE
LEITO MOVEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento.

Orientadora: Prof. Dr^a. Deize Dias Lopes

LONDRINA

2013

ANDRELIZA CAROLINA DEL GROSSI OLIVEIRA

**BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS E AUTOTRÓFICAS ENVOLVIDAS
NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE LIXIVIADO DE ATERRO
SANITÁRIO EM REATOR DE LEITO MÓVEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Deize Dias Lopes
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Orientadora

Prof^a Dr^a Kátia Valéria Marques Cardoso Prates
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof^a Dr^a Sandra Márcia Cesário Pereira Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Eloisa Pozzi
Escola de Engenharia de São Carlos

Londrina, 16 de janeiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente por me dar vida e possibilitar que eu concretize mais esta etapa.

Agradeço aos meus pais, Edy Simone Del Grossi, e Marcelo Teixeira de Oliveira, que me deram todo o suporte que precisei, e por acreditarem no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À orientadora, Prof. Dra. Deize Dias Lopes, por compartilhar seu conhecimento, pela amizade e pelo todos os momentos de convívio.

Ao Miguel, e amigos que me ajudaram nas análises em laboratório e deixarem os meus dias sempre mais agradáveis.

À Prof. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates, e Prof. Dra. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic/ SHS/EESC/USP pelas importantes contribuições ao longo deste trabalho.

Aos colegas do mestrado. Anelise Passerini, Simone Vasconcelos, Caio Rodrigues, Charles Moreto, Adriano Quadros, especialmente ao Talisson Bianchini, pela amizade e pela grande colaboração na montagem e operação dos experimentos.

Ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa de auxílio.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma, meu muito obrigado de coração!!!

OLIVEIRA, Andreliza Carolina Del Grossi. **Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel**, 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O presente trabalho buscou avaliar o desempenho de um reator aeróbio de leito móvel na remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos, bem como avaliar o desenvolvimento da população bacteriana oxi-redutora de nitrogênio. O sistema foi operado em regime contínuo por 157 dias, distribuídos em 2 fases. O tempo de detenção hidráulica foi mantido em 13 dias e a temperatura controlada em aproximadamente 25°C. Na Fase I o reator foi operado sem recirculação, enquanto que na Fase II foi incluída a recirculação do efluente nitrificado, igual três vezes a vazão do lixiviado afluente ao reator. Como material suporte foi utilizado suporte plásticos ou biomédias (425 unidades) sem marca definida. O volume de biomédias foi de cerca de 25% do volume útil do reator. A vazão de ar aplicada no interior do reator foi suficiente para manter o nível de OD adequado, além de manter os suportes em suspensão. Durante o monitoramento do sistema foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, alcalinidade, temperatura, sólidos em suspensão, nitrogênio Kjeldhal total (NKT), Nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, DQO, DBO. Foram feitas análises microbiológicas, como Unidades formadoras de colônia (UFC), Número mais provável de bactérias nitrificantes e desnitrificantes (NMP). Nos resultados, o pH do afluente variou entre 7,2 e 8,7 nas Fases I e II, o que influenciou positivamente a ocorrência da nitrificação. A eficiência de remoção de DQO na Fase I foi de 18% e na Fase II de 21%. A remoção média de DBO foi de 23% durante a Fase I, diminuindo, na Fase II, para 9%. O reator de Leito Móvel apresentou baixo desempenho para remoção média de matéria orgânica devido às altas concentrações de compostos recalcitrantes ou lentamente biodegradável presentes no lixiviado, que não foram removidos pelo processo biológico. Em termos de NKT, houve pouca diferença em relação à eficiência de remoção nas Fases I e II de operação. A eficiência de remoção de N-amoniaco nas Fases I e II foram similares, foi de 82% e 86% respectivamente. O reator de Leito Móvel estudado apresentou eficiência de remoção N-amoniaco satisfatório. Foi observado o acúmulo de nitrito no início da Fase II, devido à queda de pH (abaixo de 5,4). Que como, consequência, interferiu nas condições de crescimento e manutenção das bactérias oxidadoras de nitrito (10^6 NMP/mL no meio líquido e 10^1 NMP/mL nas biomédias), inferior às oxidadoras de amônia (10^8 no meio líquido e 10^5 NMP/mL nas biomédias). Durante a Fase I, a estimativa de bactérias heterotróficas foi da ordem de 10^{10} à 10^{13} e na Fase II, foi de 10^{10} à 10^{13} NMP/mL para o meio líquido e 10^8 à 10^{13} NMP/mL para as biomédias. Pode-se concluir que apesar da baixa concentração de matéria orgânica facilmente biodegradável as condições do meio influenciaram o desenvolvimento destas bactérias tanto no meio líquido como nos biofilmes. Portanto a aplicação do reator de Leito Móvel como sistema biológico de tratamento para remoção de nitrogênio de lixiviados é viável, mesmo quando o afluente possui elevadas concentrações de N-amoniaco (~890 mg N-NH₃/L).

Palavras-chave: Nitrificação. Reator de Leito Móvel. Lixiviado. Aterro Sanitário. BOA. BON. Desnitrificantes. NMP.

OLIVEIRA, Andreliza Carolina Del Grossi. **Heterotrophic and autotrophic bacteria involved in the removal of nitrogen of landfill leachate in moving biofilm bed reactor, 2013.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

This study evaluated the performance of biological treatment system in Moving Biofilm Bed Reactor for nitrogen removal through nitrification-denitrification landfill leachate from municipal solid waste and evaluate the development of the bacterial population oxy-reducing nitrogen. The system was operated in continuous for 157 days, distributed in two stages. The hydraulic retention time was 13 days and maintained in temperature controlled at 25 ° C. In Phase I, the reactor operated in aerobic mode while the phase II was added the recirculation of the effluent being three times the input flow of raw leachate. Was added 425 biomédias unbranded defined, occupying about 25% of total volume of the reactor. The air flow to the inside of the reactor was sufficient to maintain the DO level appropriate, while maintaining the support in suspension. During the monitoring system were analyzed for physico-chemical parameters: pH, alkalinity, temperature, suspended solids, total Kjeldahl nitrogen (TKN), ammonia nitrogen, nitrite, nitrate, COD, BOD. Microbiological analyzes were performed as colony forming units (CFU), most likely number of nitrifying and denitrifying bacteria (MPN). In the results, the pH of the effluent varied between 7.2 and 9.4 in Phases I and II, which positively influenced the occurrence of nitrification. The COD removal efficiency in Phase I was 18% and 21% of phase II. His performance as the average BOD removal from the reactor was 23% during Phase I, decreasing efficiency in Phase II, to 9%. The mobile bed reactor showed little average performance for removal of organic matter owing to high concentrations of recalcitrant compounds or slowly biodegradable material, which was not removed by a biological process. In terms of NKT, there was little difference in the removal efficiency in the two phases of operation of the mobile bed reactor, which is higher in Phase II (82%) due to recirculation of the nitrified leachate. The efficiency of removal of N-ammonia in Phase I and II were similar, 82% and 86% respectively. The Moving Bed reactor studied showed a removal efficiency of ammonia-N satisfactory. Accumulation was observed at concentrations of nitrite in the early Phase II, due to lower pH (below 5.4). Which had the effect, the interference conditions of growth and maintenance of oxidizing bacteria nitrite (10^6 and 10^1 in the liquid medium in support) lower than the oxidizing ammonia (10^8 and 10^5 in the liquid medium in support). During Phase I, the estimate of heterotrophic bacteria was around 10^{10} to 10^{13} and Phase II was from 10^{10} to 10^{13} for the liquid medium and 10^8 for the 10^{13} support. It can be concluded that the reactor and the substrate affect both the development of these bacteria in the liquid medium as attached in biofilms. Therefore the application of the mobile bed reactor as a biological treatment system for removing nitrogen leachate is feasible, even when the influent has high concentrations of ammonia-N (~ 890 mg N-NH₃ / L).

Keywords: Nitrification. Moving Bed reactor. Leachate. Landfill. AOB. NOB. Denitrifying. MNP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 -	Enzimas da conversão do nitrato ao nitrogênio gasoso, no processo de desnitrificação- Nar: nitrato redutase; Nir: nitrito redutase, Nor: óxido nítrico redutase, Nos: oxido nitroso redutase (adaptado de BITTON, 1994)	29
Figura 3.2 -	Etapas de formação do biofilme no meio suporte (adaptado de XAVIER, <i>et al.</i> 2003).....	34
Figura 3.3 -	Microscopias eletrônica de varredura dos biofilmes no 2º dia (início do biofilme), 12º dia (prevalência de bactérias dos morfotipos, cocos e bastonetes) 24º dia (grande quantidade de exopolímeros), 34º dia (grande quantidade de filamentosas e biofilme espesso) (adaptado de OLIVEIRA, K.V.V, 2010)	36
Figura 4.1 -	Reator em batelada alimentado com lixiviado para desenvolvimento do inóculo	40
Figura 4.2 -	Estruturas e medidas do Reator de Leito Móvel.....	41
Figura 4.3 -	A. Instalação do reator em câmara BOD, bombas de alimentação e recirculação e locais da entrada e saída do efluente. B. Biomédias se movimentando no interior do reator	42
Figura 4.4 -	Meio suporte para adesão do biofilme.....	42
Figura 4.5 -	Fluxograma das análises microbiológicas	45
Figura 4.6 -	Pontos (A,B e,C) de coleta para análises microbiológicas	46
Figura 5.1 -	Valores de pH do afluente e do efluente durante a Fase I e II.....	57
Figura 5.2 -	Variação da alcalinidade do afluente e do efluente durante a Fase I e II.....	59
Figura 5.3 -	Variação da DQO do afluente e do efluente durante a Fase I e II	61
Figura 5.4 -	Variação da DBO do afluente e do efluente durante a Fase I e II	62
Figura 5.5 -	Variação do NKT do afluente e do efluente durante a Fase I e II	64
Figura 5.6 -	Variação do N-amoniaco do afluente e do efluente durante a Fase I e Fase II.....	67
Figura 5.7 -	Variação das concentrações de nitrito do efluente da Fase I e II.....	70
Figura 5.8 -	Variação das concentrações de Amônia Livre do afluente e do efluente da Fase I e II	70
Figura 5.9 -	Variação das concentrações de nitrato do efluente da Fase I e II	74
Figura 5.10 -	Balanco de nitrogênio do reator de Leito Móvel durante a Fase I (A) e II (B)	76
Figura 5.11 -	Variação dos sólidos em suspensão das amostras coletadas do efluente durante a Fase I e II.....	77

Figura 5.12-	Microscopia a fresco de uma amostra coletada do meio líquido durante o monitoramento da Fase I (50X). As setas indicam os microrganismos " <i>tecamebas</i> "	79
Figura 5.13 -	Método da Contagem em Placa com amostras diluídas à 10^{-10} do 15º dia e 10^{-5} do 31º dia de operação da Fase I	80
Figura 5.14 -	Placas de contagem com amostras diluídas à 10^{-6} das biomédias e 10^{-6} do meio líquido coletadas no 59º dia de operação da Fase II.....	80
Figura 5.15 -	Contagem de bactérias heterotróficas durante a operação da Fase I	81
Figura 5.16 -	Unidades Formadoras de colônias de bactérias heterotróficas realizadas durante o monitoramento da Fase II	83
Figura 5.17 -	Placas da técnica de Contagem do 31º dia da Fase I. a) diluição de 10^{-6} ; b) diluição de 10^{-8} . Placas do 15º dia da Fase I. c) diluição de 10^{-4} ; d) diluição de 10^{-10}	84
Figura 5.18 -	Placas de crescimento de culturas referentes às placas de contagem do 15º dia da Fase I	85
Figura 5.19 -	Placas de crescimento de culturas referentes às placas de contagem do 31º dia da Fase I	86
Figura 5.20 -	Placas de isolamento de culturas referentes às placas de contagem do 56º dia da Fase I	86
Figura 5.21 -	Placas da técnica de Contagem em placa do 75º dia do meio líquido durante a Fase II. A) diluição de 10^{-1} ; B) diluição de 10^{-6} , C) diluição de 10^{-9}	88
Figura 5.22 -	Placas da técnica de Contagem em placa do 125º dia do meio líquido durante a Fase II. A) diluição de 10^{-1} ; B) diluição de 10^{-3} , C) diluição de 10^{-6}	88
Figura 5.23 -	Placas da técnica de Contagem em placa do 153º dia do meio líquido durante a Fase II. A) diluição de 10^{-10}	88
Figura 5.24 -	Placas da técnica de Contagem em placa do 153º dia do meio suporte durante a Fase II. A) diluição de 10^{-3} , B) diluição de 10^{-6} , C) diluição de 10^{-10}	89
Figura 5.25 -	Placas das culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio líquido do 75º dia da Fase II.....	90
Figura 5.26 -	Placas de culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio líquido do 91º dia da Fase II.....	90
Figura 5.27 -	Placas de culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio suporte do 91º dia da Fase II	91
Figura 5.28 -	Placas de culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio líquido do 125º dia da Fase II.....	92

Figura 5.29 - Placas de isolamento de culturas referentes às placas de contagem do meio suporte do 125º dia da Fase II	93
Figura 5.30 - Placas de isolamento de culturas referentes às placas de contagem do meio líquido do 153º dia da Fase II.....	94
Figura 5.31 - Número mais provável de bactérias nitrificantes e desnitrificantes realizados no início e fim de operação da Fase 1.....	95
Figura 5.32 - Número mais provável de bactérias oxidadoras de amônia realizado no início, meio e fim da operação da Fase II.....	97
Figura 5.33 - Número mais provável de bactérias oxidadoras de nitrito realizado no início, meio e fim da operação da Fase II.....	99
Figura 5.34 - Número mais provável de bactérias desnitrificantes realizado no início, meio e fim da operação da Fase II.....	102
Figura 5.35 - Fotografias realizadas por em Lupa. A) Material suporte (1,0X); B) Corte do material suporte (1,5 x); C) interior do suporte antes da lavagem (2,5x); D) Interior do suporte depois da lavagem (1,5x)	106
Figura 5.36 - Fotografias realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Parte externa do material suporte; B) Superfície externa do material suporte; C) Rugosidade da superfície externa do material suporte; D) Bactérias aderidas às rugosidades.....	108
Figura 5.37 - Fotografias realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Parte interna do material suporte; B) Superfície externa do material suporte; C) Rugosidade da superfície externa do material suporte; D) Bactérias aderidas às rugosidades.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Processos biológicos de nitrificação e desnitrificação.....	21
Tabela 4.1 -	Parâmetros físico-químicos do lixiviado bruto do Aterro de Rolândia em 2004 e 2011	39
Tabela 4.2 -	Fases de operação do sistema, e suas características operacionais como tempo de detenção hidráulica (TDH), recirculação externa (Re) e tempo de operação	43
Tabela 4.3 -	Parâmetros físico-químicos analisados semanalmente para o afluente e o efluente final, frequência de análise e métodos utilizados	44
Tabela 4.4 -	Análises microbiológicas realizadas durante o monitoramento do reator de Leito Móvel.....	45
Tabela 4.5 -	Compostos e concentrações dos meios de cultura utilizados para a estimativa de bactérias nitrificantes.....	51
Tabela 5.1 -	Resumo estatístico das análises de pH realizadas durante as Fases I e II.....	56
Tabela 5.2 -	Resumo estatístico das análises de alcalinidade realizadas durante as Fases I e II	58
Tabela 5.3 -	Resumo estatístico das análises de DQO realizadas durante as Fases I e II.....	60
Tabela 5.4 -	Resumo estatístico das análises de DBO realizadas durante as Fases I e II.....	62
Tabela 5.5 -	Resumo estatístico das análises de NKT realizadas durante as Fases I e II	64
Tabela 5.6 -	Resumo estatístico dos resultados de N-amoniaco para as Fases I e II	66
Tabela 5.7 -	Resumo estatístico das análises de Nitrito e Nitrato realizadas durante as Fases I e II.....	69
Tabela 5.8 -	Concentrações de Amônia Livre durante as Fases I e II	72
Tabela 5.9 -	Resumo estatístico das análises dos Sólidos em Suspensão realizadas durante as Fases I e II	77
Tabela 5.2.1 -	Unidades Formadoras de colônias de bactérias heterotróficas realizadas durante o monitoramento da Fase 1.....	80
Tabela 5.2.2 -	Unidades Formadoras de colônias de bactérias heterotróficas realizadas durante o monitoramento da Fase II.....	82
Tabela 5.2.3 -	Número mais provável de bactérias nitrificantes (BOA e BON) e desnitrificantes no início (5º dia) e final (38º dia) de operação, realizados durante o monitoramento da Fase I	94
Tabela 5.2.4 -	Número mais provável de bactérias nitrificantes (BOA e BON) e desnitrificantes no início (74º dia), meio (125º dia) e final (153º dia) de operação, realizados durante o monitoramento da Fase II.....	96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	LIXIVIADO DE ATERRO DE RESÍDUOS SÓLIDOS	18
3.2	REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO	20
3.2.1	Nitrificação.....	21
3.2.1.1	Ecologia das bactérias oxidadoras de nitrogênio em sistemas de tratamento de efluentes.....	24
3.2.1.2	Técnicas empregadas para caracterização das bactérias nitrificantes	27
3.2.2	Desnitrificação.....	28
3.4	SISTEMA DE TRATAMIENTO EM CRESCIMENTO FIXO (BIOFILME).....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	LOCALIZAÇÃO DO ATERRO SANITÁRIO DE ROLÂNDIA	38
4.2	CARACTERÍSTICAS DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO	38
4.3	O INOCULO	39
4.4	INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL.....	40
4.5	MATERIAL SUPORTE.....	41
4.6	FASES DE OPERAÇÃO	43
4.7	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	43
4.8	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	44
4.8.1	Microscopia a Fresco.....	46
4.8.2	Método da Contagem em Placa.....	47
4.8.3	Crescimento e Manutenção das Bactérias Heterotróficas	48
4.8.4	Coloração de Gram, Modificado do Método de Hücker (Jenkinseí <i>al.</i> , 1993 & WEF, 1995)	48
4.8.5	NMP de Bactérias Nitrificantes.....	49

4.8.6	NMP de Bactérias Desnitrificantes	52
4.8.7	Quantificação da Biomassa	53
4.8.8	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	56
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	77
5.2.1	Resultados e Discussão da Técnica Contagem em Placa.....	79
5.2.2	Resultados das Bactérias Heterotróficas Seleccionadas	83
5.2.3	Resultados e Discussão da Técnica de NMP.....	95
5.4	RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	104
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
7	REFERÊNCIAS	115
	ANEXOS	111

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços tecnológicos, que propiciaram o desenvolvimento de diversas técnicas para o tratamento dos resíduos sólidos, a disposição no solo ainda é a prática mais utilizada no Brasil. A opção pela disposição dos resíduos sólidos em aterros sanitários deve-se basicamente à simplicidade e ao menor custo comparado com outras tecnologias de tratamento ou disposição de resíduos.

A disposição no solo dos resíduos sólidos tem como consequência a geração de subprodutos, como o gás e o lixiviado. O lixiviado gerado em aterros sanitários bem operados e que seguem rigorosamente a legislação, quanto ao não recebimento de resíduos não domiciliares, têm como principais poluentes a remover a matéria orgânica e o nitrogênio, pois nessas condições, em geral, as concentrações de micropoluentes orgânicos e metais pesados estão abaixo dos limites máximos exigidos para atender aos padrões de lançamento de efluentes e o padrão de qualidade da água do corpo receptor.

O lixiviado produzido por resíduos acondicionados em aterros mais antigos, já na fase metanogênica de decomposição, apresenta elevada alcalinidade e, conseqüentemente, altos valores de pH, que favorecem a precipitação de metais e por isso a concentração destes tende a ser baixa no líquido efluente (KJEDSEN et al., 2002).

Ao contrário da matéria orgânica, a concentração de nitrogênio, em lixiviado de aterro sanitário, não depende da fase de decomposição dos resíduos, pois ao longo da vida do aterro o que muda é a forma como esse elemento se apresenta. Dessa forma não ocorre decréscimo significativo deste, com o tempo, no lixiviado, uma vez que não há mecanismos de remoção efetiva de nitrogênio sob condição exclusivamente anaeróbia, que é a condição predominante na massa de resíduos em decomposição. Assim, ocorre a amonificação do nitrogênio orgânico, mas sem que seja possível, na seqüência, sua oxidação. Por isso o N-amoniacal é citado por diversos pesquisadores como o componente mais significativo em longo prazo no lixiviado (KJELDSEN *et al.*, 2002).

O nitrogênio, quando presente juntamente com fósforo, no meio aquático, pode estimular o crescimento exagerado de algas e outras plantas aquáticas. Quando na forma de N-amoniacal, exerce demanda de oxigênio no ambiente aquoso e nas estações de tratamento de água combina-se com o cloro durante a desinfecção, ainda, dependendo da sua

concentração no meio e do pH, pode ser tóxico para os peixes e a outros organismos aquáticos quando na forma de amônia livre (NH_3). O nitrato, nitrogênio na forma oxidada, pode ser reduzido para nitrito, que pode causar a metahemoglobinemia (Síndrome do bebê azul), além de ser suspeito de ser o precursor de alguns tipos de câncer gástricos (SEDLAK, 1991).

Nos processos de tratamento biológicos, a remoção de nitrogênio acontece por meio de sistemas aeróbios, promovendo a nitrificação, seguido por processos anaeróbios (ou ausência de oxigênio e presença de nitrito e/ou nitrato, chamado de ambiente anóxico), para propiciar a desnitrificação. Nesses processos são utilizadas as transformações que ocorrem com o nitrogênio na natureza, partindo principalmente do N-amoniacal até a liberação do nitrogênio gasoso. As principais etapas no processo biológico de remoção de nitrogênio são: a amonificação, a assimilação, a nitrificação (nitritação e nitratação) e a desnitrificação.

Entretanto, no tratamento do lixiviado de resíduos sólidos, a obtenção de elevada eficiência de remoção de nitrogênio e matéria orgânica recalcitrante unicamente pelo processo biológico representa ainda um desafio. Por isso é fundamental o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a investigação e a otimização dos processos de tratamento de lixiviados, por meio da adequação dos parâmetros operacionais e ambientais, bem como do conhecimento dos microrganismos envolvidos.

Visando obter maior eficiência no tratamento dessas águas residuárias, passou-se a utilizar combinações de diferentes tipos de reatores. O reator de leito móvel é um sistema desenvolvido recentemente, e vem sendo utilizado para a remoção de nutrientes de esgoto sanitário. Este reator, como os outros sistemas de tratamento biológicos, apresenta como vantagens alta eficiência de remoção de matéria orgânica e de nitrogênio. Somado a isso, necessita de menor tempo para recuperação quando submetido a condições extremas, favorece a retenção da biomassa com conseqüente aumento do tempo de retenção celular (TRC), além de apresentar facilidade e flexibilidade de operação e menor consumo de energia comparado aos outros sistemas, como o de lodo ativado (RUSTEN, *et al.* 2006).

Dessa forma, um dos aspectos importantes que deve ser levado em conta, na operação deste tipo de reator, bem como em todos os outros sistemas biológicos, é o comportamento dos microrganismos. O conhecimento a respeito dos microrganismos envolvidos na oxidação e redução do nitrogênio, bem como na biodegradação da matéria orgânica durante o processo de tratamento, pode ser empregado no controle e na solução de problemas operacionais. Além disso, a investigação microbiológica, pode auxiliar na

avaliação do desempenho do processo de tratamento e na otimização de parâmetros para futuros projetos.

Como o reator de leito móvel no tratamento de águas residuárias com altas concentrações de nitrogênio, tem sido ainda pouco pesquisado, há escassez de dados sobre o comportamento dos microrganismos presentes neste sistema e nestas condições. Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho de um reator de leito móvel e monitorar os microrganismos envolvidos na remoção da matéria carbonácea e nitrogenada de lixiviado de aterro de resíduos sólidos sem prévio tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar as principais comunidades bacterianas relacionadas a remoção de nitrogênio, em reator de leito móvel tratando águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio, no caso específico lixiviado de aterro sanitário, utilizando técnicas convencionais de cultivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a remoção de matéria orgânica e nitrogenada no reator de leito móvel;
- ✓ Quantificar as bactérias nitrificantes, nitratantes e desnitrificantes pela técnica do Número mais provável (NMP).
- ✓ Quantificar as bactérias heterotróficas utilizando a técnica da contagem em placa.
- ✓ Comparar os resultados das técnicas de microbiologia com os parâmetros físico-químicos e as condições de operação do sistema de leito móvel.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIXIVIADO DE ATERRO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

O método de disposição final de resíduos sólidos em aterros sanitários continua a ser amplamente aceito e utilizado. O aterro sanitário minimiza os impactos ambientais, e permite a decomposição dos resíduos sob condições controladas até a sua transformação em material inerte e estabilizado (RENOU, *et al.*, 2007).

Os resíduos sólidos dispostos em um aterro sanitário são degradados biologicamente em quatro fases: fase aeróbia, anaeróbia acidogênica, metanogênica inicial e estabilização metanogênica. (RENOU, *et al.*, 2007).

A decomposição dos resíduos, somado a umidade destes e associado a precipitação pluviométrica, que infiltra e percola pela a massa de resíduos aterrados, formam o lixiviado.

As características do lixiviado de aterro sanitário é influenciada por aspectos peculiares de cada local, como a idade do aterro, formas de operação, composição dos resíduos aterrados, bem como pelas condições sazonais, como por exemplo, a precipitação. Entretanto, de modo geral o lixiviado pode conter metais pesados, compostos orgânicos, microcomponentes inorgânicos, compostos orgânicos xenobióticos, ácidos graxos e substância húmicas e, também, nutrientes como nitrogênio (CHRISTESEN, *et al.* 2001, KJELDSSEN, *et al.*, 2002).

De acordo com o estado de degradação dos resíduos o aterro pode ser classificado como novo, intermediário e estabilizado – velho ou maduro (RENOU, *et al.*, 2007).

Em lixiviados de aterros novos, existem compostos orgânicos facilmente biodegradáveis, como os ácidos voláteis. Entre suas características, verifica-se baixo pH, alta concentração de Demanda química de oxigênio (DQO) e Demanda bioquímica de oxigênio (DBO), elevada relação DBO/DQO, além da elevada concentração de nitrogênio orgânico e amoniacal (WANG *et al.*, 2006). Enquanto que nos lixiviados provenientes dos aterros mais antigos, na fase metanogênica de decomposição dos resíduos, a concentração de matéria orgânica biodegradável diminui significativamente (KJELDSSEN, *et al.*, 2002).

A relação DBO/DQO é menor em lixiviados de aterros antigos, caso essa relação seja maior que 0,5 a biodegradabilidade do lixiviado é considerada boa, ou seja, de fácil degradação e, provavelmente, proveniente de aterro em fase acidogênica. Entre 0,1 e 0,5 é classificado como mediano. Já quando o valor se encontra inferior a 0,1 (fase metanogênica),

trata-se de um efluente de difícil biodegradação, indicando dificuldade para seu tratamento por processos biológicos (CETESB, 1995, KJELSEN, *et al.* 2002).

A concentração de nitrogênio no lixiviado de aterro não segue a mesma tendência da matéria orgânica, por isso este constitui-se como um dos principais poluentes no lixiviado a longo prazo (KJELDSEN, *et al.*, 2002).

A concentração de nitrogênio total kjeldahl (NKT) no lixiviado não é dependente da fase na qual o aterro se encontra, por isso, em geral, sua concentração é elevada tanto na fase acidogênica quanto na metanogênica (AKERMAN, 2005). Já as concentrações de nitrato e nitrito são desprezíveis nos lixiviados, devido às condições anaeróbias do aterro, que não permitem a oxidação do nitrogênio amoniacal e, por outro lado, caso houvesse nitrogênio oxidado no lixiviado o mesmo seria removido via a desnitrificação, que poderia ocorrer na ausência de oxigênio (CLÉMENT, 1995).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da sua Resolução nº 357 de 2005, por meio do padrão de emissão de efluentes, limita as concentrações de N-amoniacal, nitrato e nitrito, respectivamente, em 20mg/L, 10,0mg/L e 1,0 mg/L. Essa resolução também estabelece as concentrações máximas de N-amoniacal em corpos hídricos em função da classe do rio e do pH da água (BRASIL, 2005).

A Resolução CONAMA N°397 de 2008, que complementa a Resolução 357/05, desobriga as estações de tratamento de esgotos sanitários a atingir a concentração de 20mgN/L para o nitrogênio amoniacal total. No entanto, para os sistemas de tratamento dos demais tipos de efluentes, inclusive lixiviados de aterro, a resolução 357/05 continua restritiva no tocante as concentrações de N-amoniacal.

O lançamento no meio ambiente de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio sem prévia remoção, pode acarretar prejuízos para os seres vivos. Na conversão da amônia a nitratos há consumo de oxigênio, 4,6 mg O₂/mg N_{oxidado}, do meio aquático. Os nitratos no trato gastrointestinal causam metahemoglobina ou síndrome do bebe azul. Nos corpos receptores as altas concentrações de nitrogênio causam a eutrofização, ou seja, estimulam o crescimento de plantas aquáticas. Além disso, as algas acarretam problemas nas estações de tratamento de águas (EPA, 1975).

As concentrações de nitrogênio amoniacal aumentam continuamente enquanto o aterro encontra-se em operação. Uma vez encerrado, as concentrações de nitrogênio tendem a decrescer, porém de forma lenta (CLÉMENT, 1995). A maior parte do nitrogênio em lixiviados está na forma de nitrogênio amoniacal e orgânico, no entanto a forma orgânica é convertida a N-amoniacal (amonificação) durante a degradação da matéria orgânica.

O nitrogênio pode existir em diferentes formas de oxidação: Amino nitrogênio: -NH₂, Íon amônio: NH₄⁺, Amônia livre: NH₃, nitrogênio gasoso: N₂, íon nitrito: NO₂⁻, íon nitrato: NO₃⁻. A conversão do nitrogênio na natureza é realizada por microrganismos, Por meio das etapas de fixação do nitrogênio atmosférico, assimilação do nitrogênio fixado, amonificação, nitrificação, desnitrificação, e redução dissimilativa de compostos de nitrogênio oxidados. As etapas de nitrificação e desnitrificação são as mais relevantes no tratamento de efluentes com altas concentrações de N-amoniacal.

A redução do N-amoniacal a gás nitrogênio (Nitrificação e Desnitrificação) é o mecanismo mais utilizado na remoção de nitrogênio de efluentes.

3.2 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

Os processos biológicos de tratamento são os mais empregados na remoção de nitrogênio de águas residuárias devido ao seu menor custo de operação. De maneira geral, o tratamento biológico tem por objetivo potencializar os processos que ocorrem na natureza, visando à remoção da matéria orgânica e de nutrientes, como o nitrogênio e o fósforo.

Os processos biológicos são eficientes na remoção de compostos orgânicos e nitrogenados em lixiviados de aterros novos. No caso de lixiviado de aterros antigos, devido ao fato da maior parcela de matéria orgânica presente ser de difícil biodegradação, principalmente os ácidos húmicos e fúlvicos, há limitações na eficácia do processo biológico (TATSI *et al.*, 2003).

Além disso, o sistema de tratamento biológico de lixiviado de resíduos sólidos pode apresentar ainda problemas operacionais como vazão muito variável, carga orgânica elevada e variável, necessidade de área para implantação, baixa eficiência de remoção de matéria orgânica e presença de compostos orgânicos recalcitrantes (ROCHA, 2008).

A remoção biológica de nitrogênio pode ser conseguida por meio da associação de três processos convencionais: amonificação, nitrificação e desnitrificação.

Na remoção biológica de nitrogênio, participam dois grupos de bactérias: heterotrófica e autotrófica, o processo biológico ocorre em duas etapas, a nitrificação e em seguida a desnitrificação, sendo realizadas por bactérias dos grupos **α** , **β** , e **γ -proteobacteria** não relacionadas entre si (KOOPS, *et al.*, 2001). Na Tabela 3.1 é apresentado um resumo das principais características dos processos de nitrificação e desnitrificação.

Como a nitrificação e a desnitrificação ocorrem sob diferentes condições com microrganismos distintos, o sistema de tratamento biológico deve propiciar as condições

necessárias para que os dois processos ocorram, envolvendo os mecanismos necessários para proporcionar zonas aeróbias, anaeróbias e/ou anóxicas.

Tabela 3.1 - Processos biológicos de nitrificação e desnitrificação

BACTÉRIAS	Processo	
	NITRIFICAÇÃO	DESNITRIFICAÇÃO
Autotróficas	-Fonte de energia: N-amoniaco e/ou nitrito	-Fonte de energia: compostos reduzidos de enxofre e/ou hidrogênio
	-Fonte de carbono: carbono inorgânico -Receptor de elétrons: oxigênio (ambiente aeróbio)	-Fonte de Carbono: carbono inorgânico -Receptor de elétrons: nitrito e/ou nitrato (ambiente anóxico)
Heterotróficas	-Fonte de energia: N- amoniaco e/ou nitrito -Fonte de Carbono: carbono orgânico -Receptor de elétrons: oxigênio	-Fonte de energia: carbono orgânico -Fonte de carbono: carbono orgânico. -Receptor de elétrons: nitrito e/ou nitrato.

Fonte: adaptado de Yamasaki, 2009

3.2.1 Nitrificação

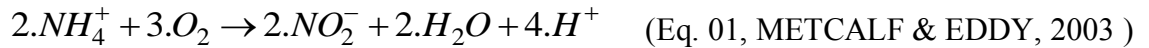
Em geral, nos sistemas convencionais de tratamento biológicos de águas residuárias para remoção de matéria orgânica somente parte do nitrogênio presente é incorporado na biomassa e removido pela atividade heterotrófica convencional. O nitrogênio residual pode ser oxidado pelas bactérias autotróficas que o utilizam para a geração de energia e síntese de novas células (van HAANDEL E MARAIS, 1999). Essas bactérias são denominadas de bactérias oxidadoras de amônia e bactérias oxidadoras de nitrito.

As bactérias oxidadoras de amônia (BOA) são responsáveis pela primeira etapa da nitrificação. Na nitrificação, as bactérias oxidam o nitrogênio amoniaco em nitrito (NO_2^-) e, em seguida, na nitratação as bactérias oxidadoras de nitrito (BON) oxidam-o em nitrato (NO_3^-). Nesse processo ocorre a conversão de amônia a nitrato, mas não há remoção de nitrogênio, que é alcançada apenas na ausência de oxigênio no processo de desnitrificação.

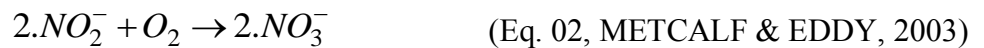
O processo de nitrificação é realizado por dois grupos filogenéticos não relacionados de bactérias quimiolitotróficas, que utilizam o dióxido de carbono como fonte de carbono para síntese celular (via *Ciclo de Calvin*) e obtêm energia para o crescimento a partir da oxidação do N-amoniaco ou nitrito e utilizam o oxigênio molecular como receptor final de elétrons (SINHÁ & ANNACHHATRE, 2007). Essas bactérias, em geral são consideradas

bactérias Gram-negativas, pertencentes à família *Nitrobacteraceae* (tanto as nitritadoras como as nitradoras), e se apresentam nas formas de bastonetes, espirilos e cocos (PELCZAR, et al., 1996).

A oxidação da amônia em nitrito é efetivada por bactérias como as do gênero *Nitrosomonas*, entre outros, e pode ser expressa pela Equação 01.



A oxidação do nitrito a nitrato dá-se principalmente pela atuação de bactérias como as do gênero *Nitrobacter*, entre outros, sendo expressa pela Equação 02.



Na oxidação de amônia a nitrato participam três enzimas, a amônio monooxygenase, que é codificada pelo gene AMO A (monooxygenase amônia), a qual oxida a amônia para hidroxilamina, em seguida esta é oxidada para nitrito pela enzima HAO (oxireductase hidroxilamina) na etapa de nitrificação (JETTEN *et al.*, 1999, TARTAKOVSKY, *et al.* 1996). Na nitrificação, o nitrito é oxidado a nitrato pelas bactérias oxidadoras de nitrito por meio da enzima NOR (nitrito oxireductase).

Para que ocorra a nitrificação em um sistema de tratamento biológico, são importantes os parâmetros de projeto e de operação como: tempo de retenção celular, tempo de detenção hidráulica, relação A/M, e a configuração do sistema, além das condições operacionais que devem ser monitoradas para que o processo se desenvolva. Entre as condições ambientais que devem ser controladas para a nitrificação pode-se citar: temperatura, pH, OD, alcalinidade, concentrações de amônia livre, relação C/N, toxicidade, entre outras. Estes fatores são descritos mais detalhadamente a seguir:

- **Temperatura:** A temperatura ótima para promover a nitrificação, deve estar entre 25 a 36°C. As bactérias oxidadoras de amônia crescem mais rapidamente em temperatura acima de 15°C, e em temperaturas próximas à 25°C. As BOAs competem fortemente com as bactérias oxidadoras de nitrito (PAREDES, *et al.*, 2007). Com o aumento da temperatura o crescimento das bactérias do gênero *Nitrosomonas* pode ser alterado, excedendo ao crescimento das *Nitrobacter*, que são as principais oxidadoras de nitrito e conseqüentemente acumulando-o no sistema (VERSTRAETE E PHILIPS, 1998).

- **pH:** Para favorecer o crescimento das bactérias nitrificantes, o pH deve estar entre 6,5 a 7,5. A faixa ideal para as bactérias oxidadoras de amônia é de 7,30 a 8,0 e para as

oxidadoras de nitrito é de 7,2 a 7,6 (SPINOLA, 2009). Esta faixa de pH não influencia na formação de amônia livre e ácido nitroso livre, que podem causar inibição no processo de nitrificação. Abaixo de 7,0 há ocorrência de ácido nitroso e acima de 8,5 há predominância da amônia livre.

- **Alcalinidade:** Durante a nitrificação, para cada 1g de N-NH₃ oxidado a N-NO₃⁻ são consumidos: 4,6 g de oxigênio e 7,15 g de alcalinidade (CaCO₃) e 0,08g de carbono inorgânico (VON SPERLING, 1997). Caso a alcalinidade a bicarbonato do meio seja totalmente consumida, os valores de pH podem decrescer para valores inadequados (inferiores à 5,5) para a nitrificação. Escassez de alcalinidade no sistema impede a síntese de microrganismos nitrificantes por déficit de carbono inorgânico. Dessa forma, quando necessário, deve ser adicionada alcalinidade por fontes externas, como por exemplo, bicarbonato de sódio, ou ser provenientes de outros processos biológicos, como da amonificação e da desnitrificação (METCALF, EDDY, 2003).

- **Concentração de OD:** a concentração de oxigênio dissolvido no meio afeta a velocidade específica de crescimento das nitrificantes, por isso deve estar acima de 2 mg.L⁻¹ (VON SPERLING, 1997). Nogueira *et al.* (1998) observaram limitações no processo de nitrificação quando a relação O₂/N-NH₄⁺ no meio líquido era inferior a 2,0. Sistemas biológicos de tratamento tendem a demandar grandes quantidades de oxigênio, pois o oxigênio dissolvido disponível é utilizado concomitantemente pelos organismos heterótrofos, responsáveis pela remoção da matéria carbonácea e pelos organismos autótrofos nitrificantes. Ao se considerar a quantidade de bactérias nitrificantes presentes no sistema em relação às bactérias heterotróficas, na maioria dos casos as últimas predominam, competindo assim pelo oxigênio disponível.

- **Relação Carbono/Nitrogênio:** A taxa de nitrificação diminui proporcionalmente ao aumento da relação C/N, uma vez que as altas concentrações de matéria orgânica proporcionam condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias heterotróficas que competem por oxigênio e nutrientes com as bactérias nitrificantes, que são autótrofas (BEG *et al.*, 1997).

- **Acúmulo de Amônia Livre:** Um fator importante a considerar na nitrificação de águas residuárias com alta concentração de nitrogênio é a inibição das bactérias nitrificantes ocasionada pela concentração de amônia livre (NH₃), que é função da concentração de N-amoniaco, do pH e da temperatura do meio, portanto é importante manter as condições operacionais do sistema para que o nível de amônia livre seja mantido baixo (DONG-JIN KIM *et al.*, 2005). Em concentrações acima de 0,1 mg NH₃/L tem início a inibição da

atividade das *Nitrobacter*, dessa forma, durante o processo de nitrificação, poderá ocorrer o acúmulo de nitrito.

- **Toxicidade:** Substâncias como metais pesados, também podem causar inibição da nitrificação. Em geral estes elementos são mais tóxicos para as *Nitrosomonas* do que para as *Nitrobacter* (BITTON, 2005)

3.2.1.1 Ecologia das bactérias oxidadoras de nitrogênio em sistemas de tratamento de efluentes

Quanto à microbiologia do processo, podem ser monitoradas a quantidade de bactérias nitrificantes ativas (biofilme ou floco) e a velocidade de crescimento de determinados gêneros. Em sistemas de tratamento devem ser dadas as condições mais favoráveis aos microrganismos que apresentam desenvolvimento mais lento, garantindo a eficiência do processo de nitrificação e nitratação (JETTEN *et al.*, 1999).

As bactérias nitrificantes, bem como as desnitrificantes, têm requisitos específicos, relacionados ao tipo e a taxa de utilização do substrato, velocidade de crescimento e adaptação às condições ambientais, que diferem de um gênero para outro.

Os gêneros de bactérias nitrificantes mais encontrados em tratamento de águas residuárias são *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* e *Nitrobacter*. Do gênero *Nitrosomonas*, as espécies mais comuns são *N. europaea*, *N. eutropha*, *N. halophila*, *N. mobilis*, e *N. nitrosae*, esta última mais encontrada em águas eutrofizadas. Todas as bactérias nitrificantes descritas são pertencentes aos grupos β e γ **proteobacterias** (CABEZAS, 2005) e são encontradas em diferentes estágios da nitrificação.

As bactérias oxidadoras de amônia mais frequentes são as do gênero *Nitrosomonas*, e as espécies *N. europaea*, *N. monocella*. Outros gêneros como *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* também são encontrados. Na segunda etapa, na nitratação, bactérias oxidadoras de nitrito, como as do gênero *Nitrobacter* são as mais citadas estando, seguidas pelas do gênero *Nitrocystis*, *Nitrococcus*, *Nitrospirae*, *Nitrospina*, *Nitrospira* (VAN LOOSDRECHT E JETTEN, 1998, KIELING, D., 2004). A predominância de um gênero ou de outro depende das condições ambientais e nutricionais do meio.

Até o momento foram descritas vinte e cinco (25) espécies de bactérias oxidadoras de amônia e oito de bactérias oxidadoras de nitrito, grande parte destas foram identificadas somente por investigações utilizando ferramentas como Fluorescência Híbrida *in situ*

(FISH). Os padrões de distribuição das variadas espécies nitrificantes dependem de diversos parâmetros ambientais, de extrema complexidade (KOOPS *et al.*, 2001).

As condições de desenvolvimento específico dos organismos nitrificantes afetam as taxas de nitrificação devido à combinação de enzimas, obtenção de energia e taxas de crescimento, categorizando-se os nitrificantes como estratégias de otimização energética (K e R). As estrategistas “R”, como as *Nitrosomonas* (BOA) e as *Nitrobacter* (BON) exploram nichos ecológicos onde não há competição por outras bactérias, e produzem um elevado número de descendentes a cada ciclo reprodutivo (HASEBORG, *et al.*, 2009).

Já as espécies com estratégia “K”, como as *Nitrospira* (BON) e *Nitrosospira* (BOA) são competidoras com outras espécies, em nichos já bem preenchidos, investindo numa descendência com uma maior probabilidade de sobrevivência. A abundância de espécies como as *Nitrobacter* ou *Nitrosospira* é influenciada pelas diferentes condições ambientais. As espécies do gênero *Nitrospira* são principalmente envolvidas na oxidação de nitrito em nitrato, sendo mais ativas do que as do gênero *Nitrobacter* (HASEBORG, *et al.*, 2009).

Embora na literatura seja descrito que alguns gêneros são mais ou menos eficientes na oxidação de N-amoniaco e utilizam este como única fonte de energia, Koops, *et al.*, (2001) demonstram que a afinidade de substrato (K_s) difere significativamente entre as espécies, e que algumas espécies de oxidadoras de amônia utilizam a ureia.

As bactérias nitrificantes possuem baixo rendimento energético associado à energia necessária para a fixação de CO_2 (Ciclo de Carvin) - 0,15Kg biomassa/kg N- NH_4^+ oxidado na fase de nitrificação e 0,02 kg biomassa/kg de N- NO_2^- oxidado na nitratação, cerca de cinco vezes menor quando comparadas a dos microrganismos heterotróficos (BITTON, 2005). A velocidades de crescimento médio das nitrificantes é de 0,76 e 0,84 dia^{-1} , respectivamente, para oxidantes de amônia e nitrito, e de 4,8 dia^{-1} para os organismos heterotróficos (WATANABE, *et al.*, 1992). Entretanto, o rendimento celular das *Nitrobacter* (0,042mg/mg N) é menor em comparação ao das *Nitrosomonas* (0,142mg/mg N) (ROSTRON, 2001).

Do ponto de vista do tratamento de efluentes para a remoção de compostos inorgânicos de nitrogênio, o baixo rendimento celular representa uma vantagem, já que a produção do lodo é baixa. Todavia, a baixa velocidade gera uma competição desfavorável pelo oxigênio e nutrientes com as bactérias heterotróficas aeróbias, se o meio contiver matéria orgânica. Logo, as bactérias nitrificantes seriam eliminadas devido a competição com as bactérias heterotróficas por OD e substrato (OKABE, *et al.*, 1996a).

O crescimento do gênero *Nitrobacter* como de outras bactérias oxidadoras de nitrito é mais rápido que o crescimento das BOA e por isso, conseqüentemente, convertem mais

rapidamente o nitrito a nitrato, o que impede o acúmulo de nitrito no sistema. O nitrito somente se acumulará se o processo estiver no início (período de adaptação), ou motivado por variação de cargas, partida e arraste de biomassa ou então por outros problemas operacionais e/ou ambientais (IAMAMOTO, 2006).

Segundo Jetten, *et al.*, (2001), que estudaram a velocidade de crescimento das BOA e BON, em um reator com baixo Tempo de detenção hidráulica (TDH) em temperatura de 35°C, a máxima velocidade de crescimento das oxidadoras de nitrito é aproximadamente duas vezes menor que a das oxidadoras de amônia. Observa-se que o resultado deve-se a temperatura em que o estudo foi desenvolvido, pois, de acordo com Pambrun *et al.* (2007), em temperaturas acima de 25°C a taxa de crescimento específico das BOAs é maior que das BONs.

Algumas espécies de bactérias oxidadoras de amônia (BOA), como é o caso das *Nitrosomonas* ocorrem exclusivamente em flocos ou biofilmes (KOOPS *et al.*, 2001). O mesmo tem sido observado com a *Nitrospira*, em lodos ativados, com base em resultados usando a técnica FISH. Schimidt, *et al.*, (2003), em análises de NMP observou que o gênero *Nitrobacter* aparece nas maiores diluições, ocorrendo como células de vida livre, apresentando-se mais dispersas no meio líquido.

Foi desenvolvido um modelo para explicar o papel do NOx no metabolismo das bactérias oxidadoras de amônia, como é o exemplo da *N. eutropha*. Sob condições de oxigênio abaixo de 0,8 mg de O₂, as bactérias oxidadoras de amônia utilizam pequenas quantidades de nitrito produzindo N₂O e N₂, e até 15% da amônia pode ser convertida diretamente à N₂. Porém, não há como mensurar o consumo da amônia pelas bactérias oxidadoras, mas é obvio que os óxidos de nitrogênio têm uma função reguladora no metabolismo dos nitrificantes sob condições aeróbias, e que estimulam a atividade de desnitrificação (SCHIMIDT *et al.* 2003).

Estudos mostram que as bactérias oxidadoras de amônia do gênero *Nitrosomonas* também podem realizar a desnitrificação em condições de oxigênio limitante. Shrestha *et al.* (2001) demonstraram que a espécie *N. europaeae*, *N. eutropha* assimilam o carbono inorgânico com determinados receptores de elétrons em condições anaeróbias, transformando o nitrito em N₂O e N₂.

Outro processo, que pode ocorrer em um sistema biológico de remoção de nitrogênio, é a nitrificação heterotrófica. Entretanto, esse processo pode causar competição pelo oxigênio dissolvido com as bactérias nitrificantes, o que pode resultar no baixo

rendimento e crescimento destas, conseqüentemente numa baixa eficiência no sistema de tratamento de águas residuárias com alta concentração de amônia (SCHIMIDT *et al.*, 2003).

Em vista disso, um sistema de tratamento que visa à remoção de nitrogênio deve ser projetado de tal forma que ofereça condições necessárias para favorecer o desenvolvimento das bactérias de crescimento lento, garantindo a eficiência do processo de nitrificação, levando-se em conta também o tempo de residência celular, já que a biomassa nitrificante é mais sensível às mudanças ambientais e sua recuperação pode ser demorada.

Para isso o isolamento e caracterização de todo desenvolvimento e evolução dessas bactérias dentro de um reator parecem ser um passo importante para avançar na otimização dos processos de remoção de nitrogênio de águas residuárias com altas concentrações deste, como os lixiviados de aterros sanitários.

3.2.1.2 Técnicas empregadas para caracterização das bactérias nitrificantes

As técnicas moleculares em paralelo com o NMP (Número Mais Provável) e isolamento de culturas, são indicados para a identificação das bactérias autotróficas nitrificantes. Porém, a caracterização das espécies em ambientes como o solo e água, devido a sua heterogeneidade, torna difícil a seleção de “primers”, que possam abranger suficientemente uma determinada amostra nas respectivas análises moleculares. Além disso, o “primer” utilizado para uma determinada espécie pode dar um resultado incerto, uma vez que as espécies de bactérias podem se adaptar as condições ambientais em que se encontram, por isso nem sempre são encontradas as espécies esperadas.

É difícil ainda obter características sobre ecofisiologia para a diferenciação entre as espécies através de abordagens moleculares, devido a relação muito estreita entre as espécies da família *Protobacteracea*. Em muitos casos, não pode ser afirmado com certeza, quantas espécies distintas são representadas pelas sequências obtidas ou a presença ou ausência de uma espécie. Isso acontece também com as análises de Reação em cadeia polimerase (PCR), no qual pode haver uma subestimação da presença *Nitrosomonas*, causado pela insuficiência de cobertura dos *primers* utilizados (KOOPS *et al.*, 2001).

No entanto o uso destas técnicas parece ser inevitável na definição da diversidade real das espécies envolvidas, principalmente, na definição das suas propriedades ecofisiológicas. A existência de espécies não cultiváveis pode ser provada somente utilizando técnicas moleculares e comparando-as com a literatura, mesmo que esses *primers* sejam limitados.

O método mais utilizado para quantificar as bactérias nitrificantes tem sido o Número Mais Provável (NMP), que estima a população de microrganismos. Nesta técnica, as bactérias podem ser isoladas a partir dos tubos que deram resultados positivos e em seguida serem identificadas por técnicas moleculares.

Os *primers* em métodos moleculares estão sendo muito utilizados na identificação das bactérias nitrificantes e desnitrificantes em sistemas de tratamento de águas residuárias. O gene 16S do rRNA (RNA ribossômico) é uma ferramenta comumente usada na identificação de bactérias, pois é uma unidade evolutivamente conservada e contém regiões que são comuns para organismos filogeneticamente similares (BELSER *et al.* 1982).

O método FISH revelou que geralmente as bactérias oxidadoras de amônia ocorrem em microcolônias formadas por milhares de células individuais. Estas colônias não podem ser facilmente dispersas utilizando tratamento de ultra-som ou homogeneizadores (BELSER *et al.* 1982). Estudos tem avaliado a diversidade de BOA analisando a sequência do gene funcional AMO A pelos métodos de PCR em tempo real, PCR quantitativo, DGGE, T-RFLP.

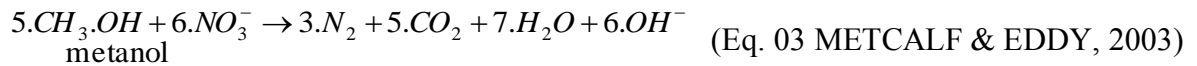
CABEZAS (2005) estudando a estabilidade da comunidade microbiana de um reator em batelada seqüencial, como pós-tratamento de efluente de frigorífico, operando em condições de oxigênio limitante, não conseguiu detectar no início do processo o gênero *Nitrospira spp*, pois o FISH não é tão sensível para identificá-lo. As concentrações limitantes de O₂ fizeram com que as BON fossem removidas do reator, persistindo somente as BOA. As *Nitrosomonas* são mais facilmente detectadas já que são menos afetadas por condições limitantes de oxigênio, ao contrário das *Nitrospira*.

A técnica FISH além de ter um limite de sensibilidade e ausência de sondas mais específicas, pode detectar também células inativas e por isso apresentar erro. Como vantagem a técnica FISH, dentre outras técnicas de biologia molecular, pode detectar organismos que não podem ser isolados em um meio de cultura, como no caso das bactérias autotróficas (CABEZAS, 2005).

3.2.2 Desnitrificação

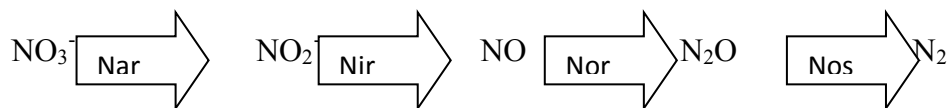
As maiorias das bactérias desnitrificantes são bactérias heterotróficas, por isso necessitam de uma fonte de carbono orgânico, e facultativas, isto é, em ambiente aeróbio utilizam o oxigênio como receptor final de elétrons e em ambiente anaeróbio utilizam o nitrato e/ou nitrito como receptor de elétrons, conforme descrito na Tabela 1. Conforme mostra a Equação 3, essas bactérias utilizam NO₃⁻ na ausência de oxigênio, mediante um

doador de elétrons, que podem ser compostos orgânicos (metanol, acetato, etanol, lactato e glicose). Semelhante à respiração aeróbia, a desnitrificação permite completa oxidação do substrato orgânico a CO_2 e H_2O (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998). Portanto, o processo de desnitrificação requer um substrato oxidável e uma concentração adequada de nitrito ou de nitrato.



O processo de redução do nitrito ou do nitrato depende das enzimas contidas nas bactérias, que são ativadas ao contato de substâncias específicas e são inibidas na presença de oxigênio (VAN LOOSDRECHT; JETTEN, 1998). Em um sistema onde o oxigênio estiver presente, as bactérias não promoverão a desnitrificação, e sim a respiração aeróbia. As enzimas envolvidas, na conversão do nitrato ou nitrito e seus intermediários a nitrogênio gasoso, podem ser visualizadas na Figura 3.1.

Figura 3.1: Enzimas da conversão do nitrato ao nitrogênio gasoso, no processo de desnitrificação - Nar: nitrato redutase; Nir: nitrito redutase, Nor: óxido nítrico redutase, Nos: óxido nitroso redutase (adaptado de BITTON, 2005).



No processo de desnitrificação, os elétrons da decomposição da matéria orgânica, dos compostos sulfurosos reduzidos ou do hidrogênio molecular são transferidos a compostos oxidados de nitrogênio, em vez de oxigênio, gerando energia para regeneração de ATP. Os elétrons de substratos orgânicos e inorgânicos fluem em cadeia do NAD^+ ao citocromo – B e pelos sistemas redutases, citados na Figura 3.1, para as formas de nitrogênio com diferentes estágios de oxidação, ocorrendo então a redução a N_2 (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Na desnitrificação intencional o oxigênio é liberado pela redução dos nitratos, o que é uma vantagem, podendo tornar-se imediatamente disponível para a oxidação biológica da matéria orgânica, no próprio reator, economizando no consumo de energia do sistema de tratamento. Além disso, há a economia da alcalinidade preservando o pH dentro da faixa adequada para a nitrificação (BITTON, 2005).

Alguns fatores físico-químicos e biológicos do meio têm influência sobre a desnitrificação, dentre eles pode-se citar:

-A concentração de nitratos pode influenciar a taxa de crescimento das bactérias desnitrificantes, já que estas utilizam o nitrato como receptor de elétrons (BITTON, 2005);

-A ausência de oxigênio dissolvido é um fator fundamental para que ocorra a desnitrificação. A presença de oxigênio pode inibir a desnitrificação, porém esta pode ocorrer dentro de biofilmes e flocos (BITTON, 1994). Diferentes concentrações de oxigênio podem desencadear mudanças das espécies predominantes, pois as espécies heterotróficas podem ter diferentes afinidades com o oxigênio. O OD pode variar entre 0,10 e 0,50 mg O₂ /L, sendo que valores de OD acima desta faixa podem gerar inibição da desnitrificação (CABEZAS, 2005);

- O pH do meio deve estar entre 7,0 e 8,5. O pH tende a aumentar como resultado do consumo de íons H⁺ do meio com o decorrer da desnitrificação, visto que a cada 1mg de NO₃⁻ que é reduzido a N₂ produz-se 3,57 mg de alcalinidade como CaCO₃. Organismos desnitrificantes podem tolerar uma faixa de pH entre 6,0 e 9,0 (DINÇER E KARGI, 2000);

- A temperatura influencia o crescimento bacteriano, sendo assim a desnitrificação pode ocorrer na faixa entre 0°C à 32°C, porém a faixa ótima de temperatura é 32° à 40°C, decrescendo até zero quando atinge temperaturas acima de 45°C (HENZE, 1995);

- Na desnitrificação heterotrófica há necessidade de carbono orgânico que é utilizado como fonte de carbono e de energia pelas bactérias que realizam a redução do nitrogênio oxidado a N₂. O carbono orgânico poderá ser proveniente de fonte interna, ou seja, da própria água residuária, ou externa pela adição de compostos orgânicos como glicose, acetato ou etanol (METCALF & EDDY, 2003), dessa forma, em efluentes com altas concentrações de nitrogênio amoniacal e baixas concentrações de compostos orgânicos biodegradáveis, deverá ser adicionado uma fonte de carbono.

Os gêneros de bactérias desnitrificantes mais encontrados são *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*, *Micrococcus*, *Archromobacter*, *Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Spirillum*, *Bacillus*, entre outros, porém a diversidade dos microrganismos varia com o tipo de água residuária e a operação do sistema.

As bactérias desnitrificantes são mais fáceis de serem cultivadas do que as nitrificantes, mesmo que sua diversidade varie com o tipo de reator usado no sistema de remoção de nitrogênio (ETCHEBEHERE, 2001). Isto facilita o estudo da sua diversidade, sua fisiologia e seu potencial de biodegradação em águas residuárias. Entretanto, em algumas técnicas moleculares, como o FISH, é necessária a utilização de *primers* que empregam as sequências de genes funcionais como NIRs, NIR K e Nos Z (BRAKER *et al.*; 1998)

Etchebehere (2001) estudou a diversidade desses microrganismos em reator anóxico UASB (*Upflow anaerobic sludge blanket*), utilizando FISH, no qual pôde concluir que as bactérias presentes nessa operação eram dos grupos α e β **Protobacterias** e os gêneros encontrados foram *Thauera*, *Comamonas*, *Brachymonas*, *Alcaligenes*, *Acidovarase*, *Paracoccus*, e ainda afirmou a ausência do gênero *Pseudomonas*.

Na literatura, autores relatam que algumas bactérias nitrificantes autotróficas podem atuar como bactérias desnitrificantes, produzindo N_2O , NO ou N_2 . Na desnitrificação autotrófica, espécies específicas de bactérias autotróficas podem realizar a desnitrificação em condições anaeróbias utilizando como fonte de energia compostos do enxofre (SHRESTHA, *et al.*, 2001). O estudo das bactérias autotróficas, que realizam a desnitrificação, pode ser aplicado em sistemas de tratamento que visam tratar efluente com altas concentrações de matéria orgânica e nitrogênio amoniacal. Entretanto, a velocidade de conversão por essa via é extremamente baixa, não tendo ainda papel significativo nos processos de tratamento de águas residuárias (SPRINGER *et al.*, 1998).

3.4 SISTEMA DE TRATAMENTO EM CRESCIMENTO FIXO (BIOFILME)

Os processos biológicos utilizados para o tratamento de águas residuárias podem ser de crescimento em suspensão ou de crescimento fixo. No processo de crescimento em suspensão, os microrganismos responsáveis pelo tratamento são mantidos no meio líquido, em suspensão por meio de agitação. Nos processos com crescimento fixo os microrganismos se aderem ao material suporte contido no reator.

O reator de crescimento fixo com leito móvel (“Moving bed biofilm reactor” - MBBR) reúne as melhores características dos processos com crescimento fixo (biofilme) e dos crescimentos em suspensão (RUSTEN, *et al.*, 2006). Nesse sistema, a biomassa cresce aderida ao meio suporte, formando um biofilme no meio suporte, que se move livremente no interior do reator.

Para os sistemas de tratamento que visam a remoção do nitrogênio os processos com biofilme apresentam vantagens, pois a retenção da biomassa por meio de biofilmes favorece o desenvolvimento das bactérias nitrificantes, que apresentam baixa taxa de crescimento, impedindo o arraste destes microrganismos do reator (ROUSE, *et al.*, 2007).

Os sistemas de tratamento biológico de efluentes como os Lodos Ativados, são os mais utilizados e conhecidos, entretanto os sistemas de biomassa aderida vêm conquistando cada vez mais espaço por apresentarem maior eficiência.

Dentre as vantagens dos sistemas de crescimento fixo com leito móvel pode-se citar:

- não há necessidade de recircular o lodo para manter a biomassa necessária ao tratamento, propiciando facilidade de operação. O sistema com biomassa fixa permite que se opere com um tempo de detenção hidráulica independentemente da taxa específica de crescimento dos microrganismos. A intensa aeração do reator com biofilme aderido possibilita a nitrificação de elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, e também a remoção de DQO e DBO (NICOTELLA, *et al.*, 2000, RUSTEN, *et al.*, 2006).

- maior eficiência no tratamento, pois possibilita a operação com maior carga, redução de dimensões das instalações de tratamento, tempos de detenção hidráulica mais baixos e a eliminação da etapa de separação dos sólidos (SALVETTI *et al.*, 2006b).

- maior flexibilidade de operação, pois podem operar de forma aeróbia, anóxica ou anaeróbia em um mesmo reator.

- maior rendimento celular, pois a aderência dos microrganismos nos materiais suporte evita que a biomassa seja removida com o efluente final do reator, resultando maior retenção celular (ROSTRON, *et al.* 2001).

- favorece o aumento da concentração de biomassa nitrificante e desnitrificantes aderidas ao meio suporte, conseqüentemente, aumenta a eficiência do sistema e propicia maior eficiência na remoção do nitrogênio (NICOTELLA, *et al.*, 2000).

- o meio fluidizado aumenta a área superficial para a transferência de massa e de oxigênio, pelo aumento da concentração microbológica no biofilme, resultando em uma alta capacidade de conversão da matéria orgânica (NICOTELLA, *et al.*, 2000, RUSTEN, *et al.*, 2006).

- Os microrganismos localizados no interior do biofilme são menos afetados por alterações nas condições ambientais - pH, temperatura, concentração de nutrientes, substâncias inibitórias, (SPEECE, 1996).

Dentre as desvantagens do reator de leito móvel pode-se apresentar o aparecimento de zonas estagnadas devido à má oxigenação e movimentação dos suportes móveis.

Segundo Rusten *et al.* (2006) o material suporte deve ser constantemente agitado de tal forma que não fiquem imóveis em apenas um local do reator, nem aglomerados junto às telas de retenção. Para isso recomenda-se que o volume dos suportes esteja entre 30 a 70% do volume total do reator. Entretanto, os pesquisadores não entraram em consenso sobre qual parcela do volume do reator deve ser ocupado pelo material suporte, sendo este, também, dependente da configuração de cada reator e de sua hidrodinâmica.

A turbulência realizada pela oxigenação e a movimentação do material suporte é de extrema importância para a transferência de oxigênio dissolvido e de nutrientes até os microrganismos, além de manter a espessura do biofilme baixa, já que com a movimentação deste ocorre o desprendimento natural do biofilme, no entanto com uma turbulência acima do necessário ocorrerá maior desprendimento, aumentando a concentração de sólidos em suspensão no reator (RUSTEN *et al.* 2006).

Deverá ser observada também a espessura do biofilme, pois quanto mais espesso maior a chance dos microrganismos realizarem atividade endógena para seu crescimento e, por consequência, perderem a capacidade de adesão à superfície. A vazão do ar injetado no reator também influencia a formação do biofilme nos suportes. Portanto a aeração deve ser uniforme para que não ocorram zonas mortas, como também, a agitação não deve ser muito intensa, pois os biofilmes nos materiais suportes podem sofrer cisalhamento, ocorrendo então o desprendimento do biofilme (RUSTEN *et al.* 2006).

A eficiência e o sucesso do tratamento estão diretamente relacionados às características do material suporte. Quanto maior a área da superfície de cada meio suporte, maior será a comunidade de microrganismos e a eficiência de depuração do efluente. Um biofilme deve apresentar espaços vazios e porosos para influenciar a circulação dos líquidos e do ar e, assim, manter o ambiente nas condições aeróbias favoráveis ao equilíbrio do mesmo, uma vez que no seu exterior poucas bactérias ficam aderidas devido às forças de cisalhamento. Em um reator projetado para realizar a nitrificação, poderá ser adicionado como meio suporte peças pequenas, uma vez que o rendimento e crescimento das bactérias nitrificantes é baixo (XAVIER, *et al.* 2003).

Os biofilmes são constituídos por uma grande diversidade de microrganismos, como pode ser observado na Figura 3.2. Em reatores de biomassa aderida, os processos metabólicos de conversão do nitrogênio acontecem também no interior do biofilme. O biofilme formado em uma superfície apresenta camadas mais externas (aeróbia) e internas (anaeróbia) onde são gerados subprodutos de oxidação. Nas camadas aeróbias, o oxigênio propicia uma zona para as bactérias nitrificantes, que geram como subprodutos nitrito, nitrato e gás carbônico (CO₂). Já nas camadas anaeróbias ou anóxicas, bactérias realizam a desnitrificação (FLEMMING E WINGLINDER, 2001).

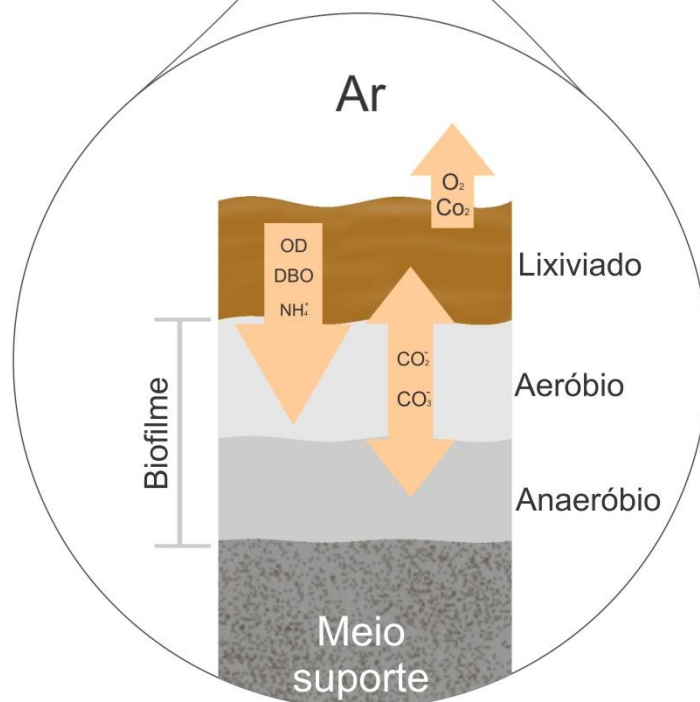
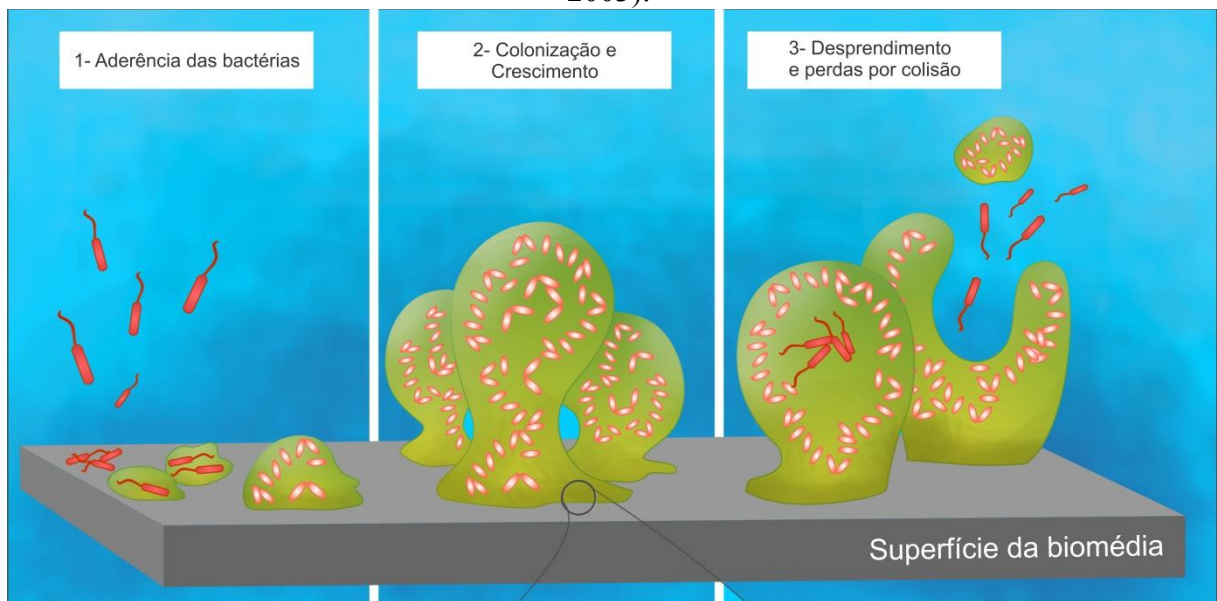
A formação do biofilme nas paredes dos meios suportes pode ser dividida em três etapas descritas a seguir (XAVIER, *et al.*, 2003):

- a) adesão das células de bactérias na superfície;

b) as células fixadas produzem exopolímeros, que são substâncias que auxiliam na fixação junto a superfície, e por isso favorecem o crescimento e aumento do biofilme no local. Algumas células dispersas e o material particulado também se aderem ao biofilme;

c) desprendimento das células e dos agregados maiores por erosão e/ou por forças de cisalhamento devido à movimentação do meio suporte no líquido, e também pela competição com uma grande densidade de microrganismos aderidos.

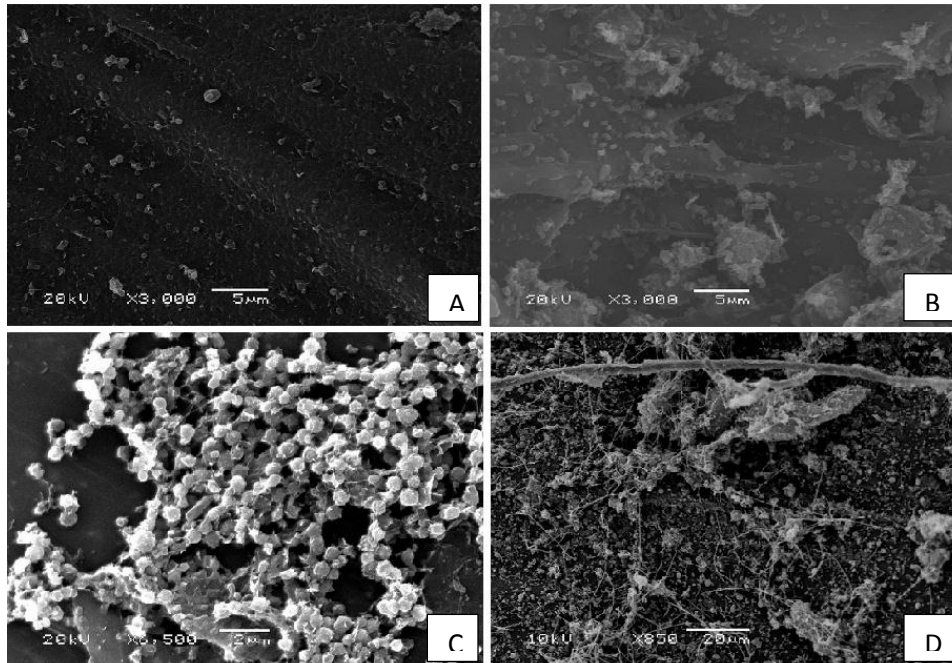
Figura 3.2: Etapas de formação do biofilme no meio suporte (adaptado de XAVIER, *et al.* 2003).



Gonzalez (2009) realizou ensaios para a estimativa do desenvolvimento dos biofilmes aderidos ao suporte em células de fluxo realizando a nitrificação. Para isso foram utilizados microsensores detectores de OD, pH, íon nitrato, íon amônio e H₂S. O microsensor de OD era inserido no biofilme na zona mais profunda do mesmo e foi monitorada a sua formação por sete dias. Nos ensaios foi estimado que o desenvolvimento e a espessura do biofilme depende da taxa de carregamento de nitrogênio. Uma taxa muito alta (1,5gN/m².biofilme.dia) em um tempo diminuto, faz com que diminua a concentração de OD, impedindo também o desenvolvimento e atividade de assimilação das bactérias nitrificantes, o que resultou em insuficiência de remoção do nitrogênio. Foi evidenciado também que as concentrações de OD no interior do biofilme decresceram do 1° ao 7° dia. O OD chegou a zero no 6° dia, para uma taxa de carregamento de 1,5 gN/m².biofilme.dia, e no 9° dia para uma taxa de carregamento de 0,5 gN/m².biofilme.dia. Ao contrário da concentração de OD a espessura do biofilme cresceu do 1° para o 7° dia, se tornando cada vez mais densa. Entre o 7° e 9° dia teve início a presença de bolhas de gases, indicando anaerobiose no interior do biofilme. Após esse tempo ocorreu o desprendimento do biofilme ocasionado pelo estresse por cisalhamento ou devido as bolhas de gases.

As micrografias da Figura 3.3 mostram a formação do biofilme e seu desenvolvimento em dias. Oliveira (2010) utilizou um sistema experimental com filtro biológico de leito flutuante e fluxo ascendente, com aeração e recirculação do efluente, tratando efluente de aquicultura com altas concentrações de nitrogênio. Na Figura 3.3 pode-se observar a formação do biofilme no meio suporte, que por meio de exopolímeros se fixam e protegem suas células. Foi evidenciado também a presença de bactérias filamentosas aderidas no biofilme, além da presença de outras bactérias em formato de bastonetes. Neste mesmo estudo foram realizadas análises usando FISH, onde foi observada a presença de *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, todas oxidantes de amônia, *Nitrococcus mobilis* e *Nitrobacter*, bactérias oxidadoras de nitrito, e também foi constatada a presença de desnitrificantes, no caso a *Pseudomonas fluorescens*.

Figura 3.3: A) Microscopias eletrônica de varredura dos biofilmes no 2º dia (início do biofilme), B) 12º dia (prevalência de bactérias dos morfotipos, cocos e bastonetes) C) 24º dia (grande quantidade de exopolímeros), D) 34º dia (grande quantidade de filamentosas e biofilme espesso) (adaptado de OLIVEIRA, 2010)



Observa-se que para obter eficiência em um sistema de remoção biológica de nitrogênio deve-se estar atento aos problemas com o arraste das bactérias nitrificantes para fora do reator, seja devido ao cisalhamento resultante da agitação, no caso de crescimento aderido, ao crescimento de bactérias heterotróficas e de outros microrganismos que podem competir com as bactérias nitrificantes dentro do biofilme.

Em sistemas de tratamento biológico de águas residuárias, além das bactérias há o crescimento e desenvolvimento de outros microrganismos, como fungos, protozoários e rotíferos que reagem aos fatores tróficos ou físico-químicos do meio, portando a maioria da microfauna é indicadora dos parâmetros operacionais e ambientais do sistema.

Com base na literatura, nota-se que muitos indicadores têm sido estudados, porém em geral são relacionados aos sistemas de tratamento de crescimento em suspensão, como é o caso de lodos ativados, por outro lado, poucos estudos abordam as comunidades microbiológicas em sistemas de tratamento de crescimento fixo, obtendo-se poucos dados conclusivos sobre a ecologia dos microrganismos neste tipo de tratamento.

A presença de microrganismos como os: do gênero *Arcella*, dos Filos *Rotífera*, *Nemátoda* e *Tardígrados*, que podem também serem indicadores de sistemas que apresentam estabilidade na operação e boa eficiência de nitrificação, além de indicarem que o reator

apresenta baixa carga orgânica, elevada concentração de oxigênio, elevada idade do lodo e boa qualidade do efluente tratado (MADONI, 1994 *apud* BRITES, 2008). Brites (2008), utilizando um reator em bateladas sequenciais, tratando lixiviado de aterro novo, descreveu a predominância de certos microrganismos desde o primeiro dia de funcionamento do reator. Foi observado o predomínio de *Aspidisca*, *Euplotes*, *Vorticella*, *Uronema*, *Paramecium*, *Arcella*, *Epistyllis*, *Thichocerca*, *Philadina*, *Trachelophyllum*, *Litonotus*, dentre outros protozoários, ciliados móveis, todos eles indicadores de eficiência do tratamento.

Os fungos podem ser encontrados no meio líquido, e podem ser devido a decréscimos do pH ou insuficiência de nitrogênio o que, conseqüentemente, também pode ocasionar intumescimento do lodo, se predominarem no sistema. Já os protozoários como *Paramecium*, *Vorticella*, *Aspidisca*, *Amoeba* e Tecamebas, atuam como bons indicadores do processo, pois além de atuarem como polidores dos efluentes consomem bactérias e matéria orgânica particulada, participam ainda da formação do biofilme (CETESB, 1989)

Em relação à biomassa aderida aos suportes, Salvetti, *et al.* (2006), explica que os rotíferos presentes na biomassa provocam o desprendimento das células bacterianas. Do mesmo modo, o biofilme oferece condições de adaptação para o desenvolvimento destes rotíferos, como outros microrganismos, que podem consumir as bactérias presentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO DO ATERRO SANITÁRIO DE ROLÂNDIA

O aterro sanitário está localizado no município de Rolândia, nas proximidades do distrito de São Martinho, a 7 km do centro da cidade. Está em operação desde o ano de 2001, e recebe diariamente cerca de 30 toneladas de resíduos sólidos provenientes da cidade de Rolândia.

O lixiviado utilizado neste estudo foi proveniente do poço de sucção, onde o lixiviado drenado do aterro é acumulado para posterior recalque para o sistema de tratamento. Ao longo do período de estudo foram feitas quatro coletas de lixiviado. As coletas foram realizadas em datas cujos cinco dias antecedentes não havia ocorrido eventos pluviométricos.

4.2 CARACTERÍSTICAS DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

Na Tabela 4.1 são mostrados os valores das principais características físico-químicas do lixiviado do Aterro Sanitário de Rolândia, após três anos de operação do mesmo (MARIGONDA E LOPES, 2004) e, atualmente, no início do presente estudo. Pode-se observar que houve aumento nos valores da maioria dos parâmetros determinados, com exceção da DBO que decresceu após sete anos. No entanto, a DQO se manteve em elevadas concentrações.

As concentrações de metais obtidas por Marigonda e Lopes (2004) para lixiviado deste aterro foram: Ca=103,20; Mg=47,76; Na=313,29; K=256,13; Cu<0,01; Cr total < 0,05; Fe=5,46; N=2,15; Ni<0,05; Zn=0,07; Cd<0,005 e Pb<0,05 mg/L.

Tabela 4.1– Parâmetros físico-químicos do lixiviado bruto do Aterro de Rolândia em 2004 e 2011

PARÂMETROS	Valores (3 anos de operação - 2004)*	Valores Médios (10 anos de operação - 2011)
pH	7,6 a 8,2	8,4
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	> 600	4209
NKT (mg NNH ₄ /L)	69,0 a 396,0	1013
N-amoniaco (mg NNH ₄ /L)	57,0 a 288,0	926
Condutividade (µS/cm)	3370 a 6490	-
Sólidos Totais (mg/L)	2528 a 4675	-
DQO (mg O ₂ /L)	351 a 2340	1120
DBO (mg O ₂ /L)	34 a 1547	135
DBO/DQO	0,1 a 0,65	0,12

*MARIGONDA e LOPES, 2004.

4.3 O INÓCULO

O inóculo, utilizado para “partida” do reator contínuo de leito móvel, foi obtido a partir da aeração do lixiviado em um reator em batelada, com capacidade de 3 L, mostrado na Figura 4.1. Este reator foi operado durante 70 dias, em temperatura ambiente, que era monitorada diariamente com um termômetro submerso no líquido. Para a aeração do lixiviado no reator em escala de bancada foi utilizada uma bomba de aquário (BIG ALFA A230).

O reator era realimentado manualmente com lixiviado bruto, sempre que as concentrações de N-amoniaco decresciam para valores próximos a zero. Não era feito descarte do sobrenadante, devido ao pequeno volume do sistema e a frequente retirada de amostras. Portanto apenas completava-se o volume com lixiviado, aproximadamente 2 L.

Os resultados do monitoramento semanal desse sistema indicaram que no período até aproximadamente o 25º dia ocorreu o desenvolvimento e a adaptação dos microrganismos ao lixiviado. A partir de então, os resultados indicaram o início da nitrificação e após o 30º dia foi constatada a nitrificação. Os resultados de N-amoniaco, nitrito e nitrato do sobrenadante demonstraram que estava ocorrendo a nitrificação (OLIVEIRA et al., 2012).

Ao final de 70 dias de operação o conteúdo do reator em batelada foi usado como inóculo para o reator de leito móvel e fluxo contínuo.

Figura 4.1. Reator em batelada alimentado com lixiviado para desenvolvimento do inóculo



4.4 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL

A instalação experimental era composta por um reator de leito móvel, com volume útil de 3,4 L, medindo 77,0 cm de altura e 8,0 cm de diâmetro, como pode ser observado na Figura 4.2. O reator era mantido em uma câmara de BOD, para manter a temperatura controlada em $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, como é mostrado na Figura 4.3.

O lixiviado usado era coletado no aterro, armazenado em bombonas de 2 a 5 litros e levado para o Laboratório de Hidráulica e Saneamento da Universidade Estadual de Londrina.

O lixiviado *in natura* armazenado em bombonas foi mantido em refrigerador de onde era retirado e descongelado em temperatura ambiente, antes de ser colocado no reservatório de alimentação do reator ($Q_{\text{afluente}} = 265\text{mL}/\text{dia}$, reservatório com aproximadamente 2L). Cada bombona (2 à 6 litros) era descongelada, de acordo com a quantidade utilizada para encher o reservatório de lixiviado, aproximadamente 6 litros por semana.

O reator era alimentado por uma bomba magnética da marca ProMinent modelo GALA 1000PPB200UA012100. Para a aeração do sistema foi instalada uma bomba de aquário da marca BIG ALFA A230, com uma vazão de ar de aproximadamente 90L/h.

Para ‘partida’ do reator de leito móvel com fluxo contínuo, o conteúdo do reator em batelada (inóculo) e materiais suporte foram transferido para o mesmo e mantidos durante 3 dias apenas sob aeração para então ter início a alimentação contínua de lixiviado.

4.5 MATERIAL SUPORTE

Como meio suporte para a aderência da biomassa foram usadas suportes plásticos (biomédias) mostrado na Figura 4.4, sem marca definida.. Foram adicionadas ao reator 425 biomédias, que ocuparam cerca de 25% do volume útil do reator. Estes materiais suportes permaneceram em suspensão devido ao menor peso específico que o do líquido e foram mantidas em movimento pela aeração do meio (Figura 4.3 B).

Antes de serem adicionadas ao reator uma amostra das biomédias (40 unidades) foi retirada e pesada em balança analítica de precisão.

Figura 4.2 Estruturas e medidas do reator de leito móvel.

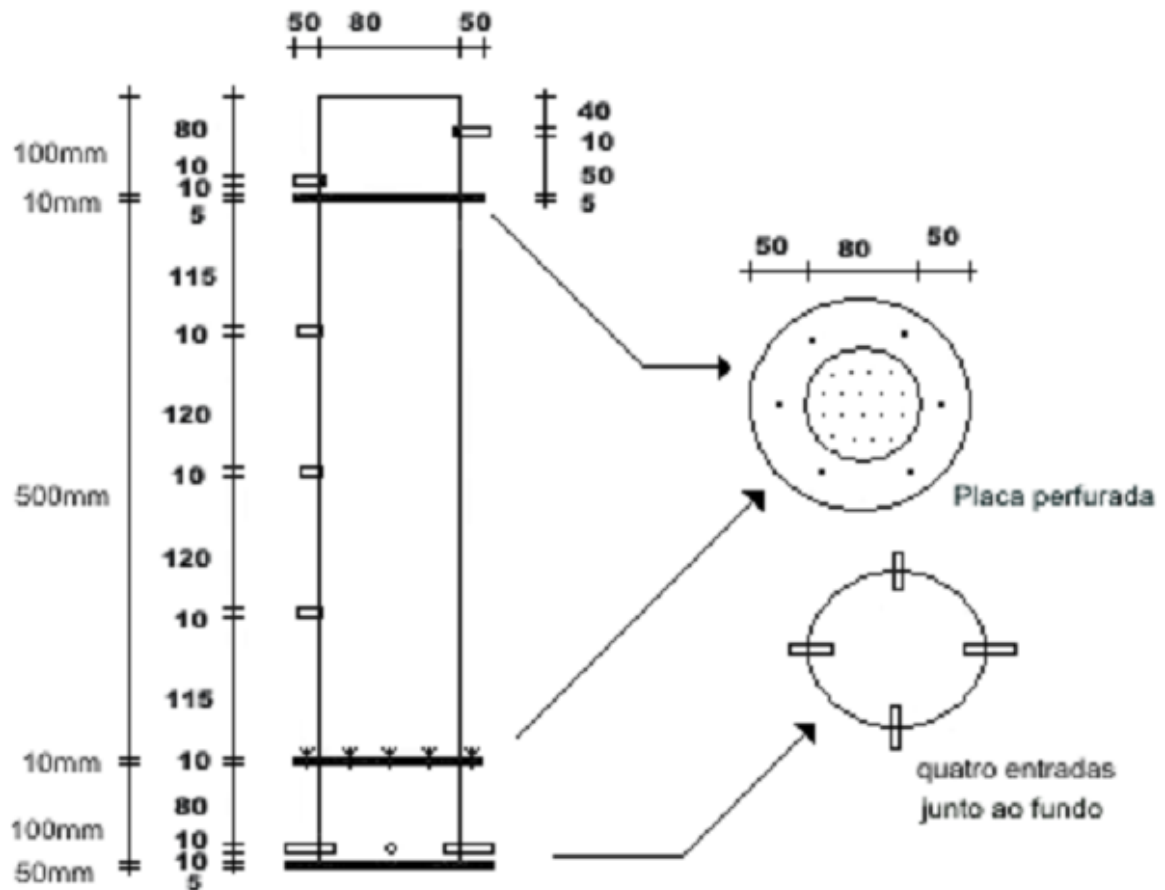


Figura 4.3 - Instalação do reator em câmara BOD, bombas de alimentação e recirculação, locais da entrada e saída do efluente (A). Biomédias se movimentando no interior do reator (B).

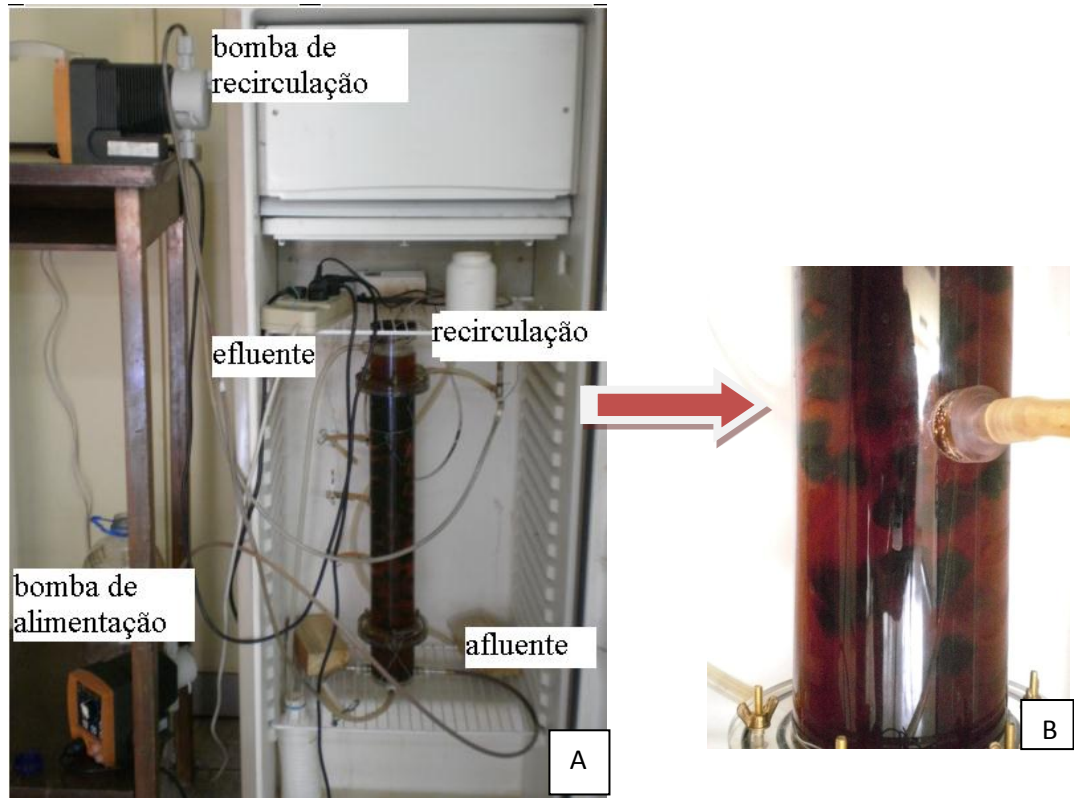


Figura 4.4 Meios suportes para adesão do biofilme (biomédia).



4.6 FASES DE OPERAÇÃO

Na Tabela 4.2 são apresentadas as duas fases de operação do reator de leito móvel e seus parâmetros operacionais.

Tabela 4.2– Fases de operação do sistema, e respectivas características operacionais de tempo de detenção hidráulica (TDH), recirculação externa (Re) e tempo de operação.

FASE	TDH (dias)	Re	Período anóxico	Tempo de operação
I	~13	Não	Não	66 dias
II	~13	Sim ($Q_{re}/Q= 3$)*	Não	91 dias
Total				157 dias

* Re: razão de recirculação

Nas duas fases o TDH médio foi de 13 dias. Na Fase I, com duração de 66 dias, o sistema foi operado sem recirculação do efluente, enquanto que na Fase II, com 91 dias de duração, foi introduzida a recirculação do efluente nitrificado ($Q_{Re}= 3Q$). O objetivo da recirculação era propiciar a diluição do afluente entrando no reator .

A recirculação foi realizada por meio de uma bomba de marca Prominent tipo GALA 1005PPE200UA110000.

4.7 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICAS

Durante o monitoramento do sistema foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, alcalinidade, temperatura, sólidos em suspensão totais e voláteis, nitrogênio Kjeldhal total (NKT), nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, DQO e DBO. Os métodos utilizados e a frequência de monitoramento são apresentados na Tabela 4.3. Neste estudo foram caracterizados o afluente, ou lixiviado bruto, e o efluente final.

Durante o monitoramento do reator, as análises de DQO e DBO foram distintas, ou seja, na Fase I foram feitas somente análises de DQO_{Total} e DBO_{Total} , e na Fase II as amostras foram filtradas, portanto denominou-se de $DQO_{Filtrada}$ e $DBO_{Filtrada}$.

Tabela 4.3– Parâmetros físico-químicos analisados semanalmente para o afluente e o efluente final, frequência de análise e métodos utilizados.

Parâmetro	Frequência Semanal		Método - Standard Methods
	Afluente	Efluente	
pH	3	3	Potenciométrico (45-H+B)
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	3	3	Titulação potenciométrica (2320B)
NKT (mg N-NH ₄ .L ⁻¹)	1	1	Kjeldhl (4500 – N _{org} /4500- NH ₃ C)
N-amoniaco (mg N-NH ₄ .L ⁻¹)	2	3	Titulométrico (4500-NH ₃ B/C)
Nitrito (mg N-NO ₂ .L ⁻¹)	-	3	Colorimétrico (4500-NO ₂ – B)
Nitrato (mg N-NO ₃ .L ⁻¹)	-	3	Cataldo (1975) *
DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	1	1	Refluxo Fechado (5220 D)
DBO (mg O ₂ .L ⁻¹)	1	1	Potenciométrico (5210 B / 4500 – OG)
Sólidos em Suspensão	-	1	Gravimétrico (2540 D/2540 E)

* Método do ácido salicílico (CATALDO *et al.*, 1975). Demais metodologias seguem procedimentos descritos em APHA (2005).

4.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas das amostras retiradas nas Fases I e II de operação do reator foram realizadas no Laboratório de Hidráulica e Saneamento da Universidade de Londrina. As análises microbiológicas realizadas, os pontos de coleta, bem como sua frequência de amostragem estão dispostas na Tabela 4.4. A Figura 4.5 mostra o fluxograma das análises microbiológicas realizadas durante as duas fases de operação do reator. Os métodos das análises microbiológicas descritas foram baseados em Vermelho, *et al.*, 2006 e em Mendonça, 2002.

Para realizar a contagem em placa e o NMP do meio líquido foram retiradas amostras do líquido no ponto de coleta A e biomédias na parte superior do reator, no local indicado na Figura 4.6. Foram retirados 5 suportes (biomédias) a fim de realizar a contagem em placas e Número Mais Provável (NMP).

Tabela 4.4 - Análises microbiológicas realizadas durante o monitoramento do reator de leito móvel.

ANÁLISES	PONTOS DE COLETA	FREQUÊNCIA
Microscopias ópticas	Local A (Fig. 4.5)	Semanal
Método da contagem em placa	Local A (Fig. 4.5) – próximos aos meios suportes	Quinzenal
	Coleta de 5 meios suportes da parte superior do reator	Início e fim de cada fase
NMP (Número Mais Provável)	Local A(Fig. 4.5) – próximos aos meios suportes	Início e fim de cada fase
	Coleta de 5 meios suportes da parte superior do reator	Início e fim de cada fase
Microscopia eletrônica de varredura	1 meio suporte	Final de operação do reator

Figura 4.5 Fluxograma das análises microbiológicas

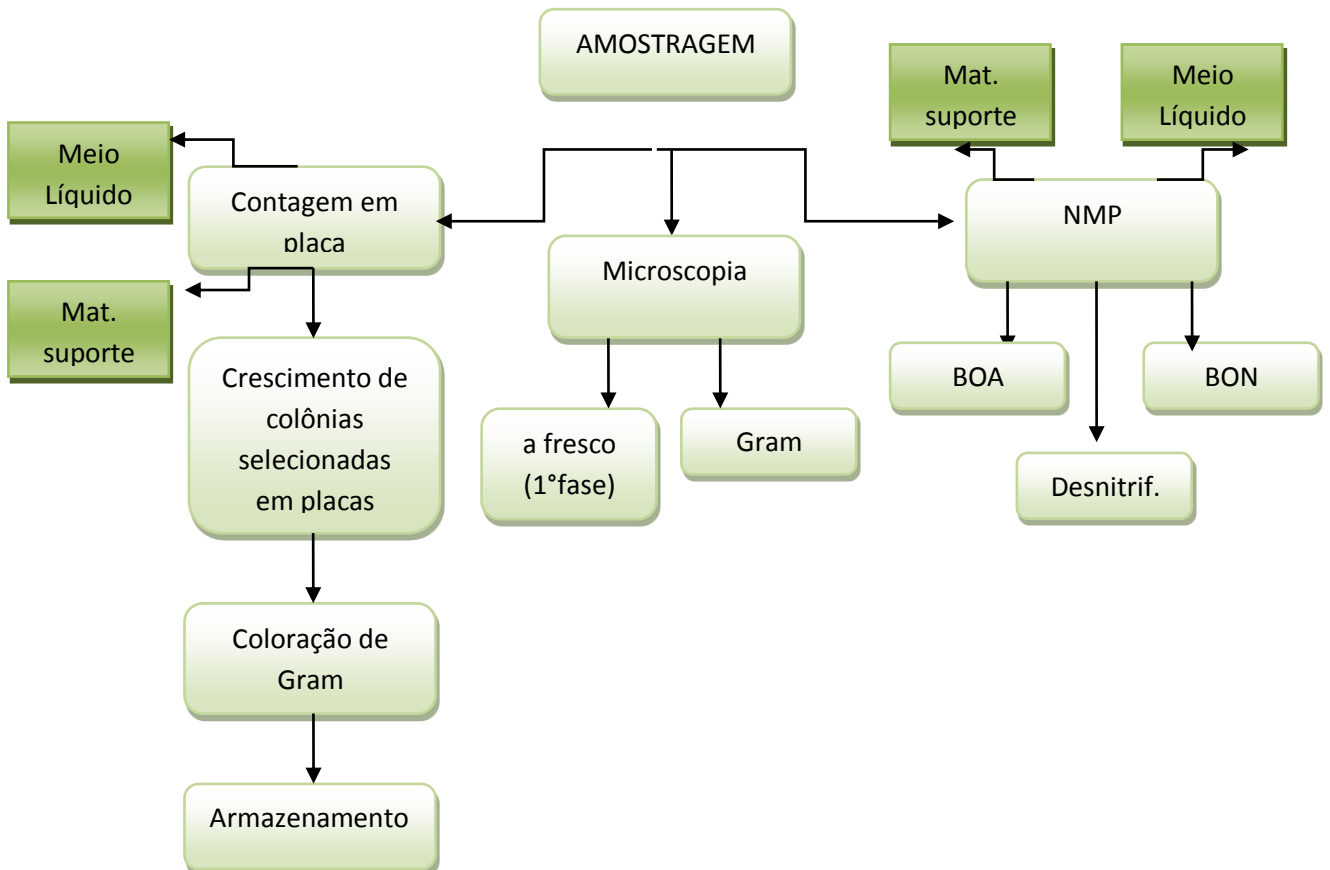
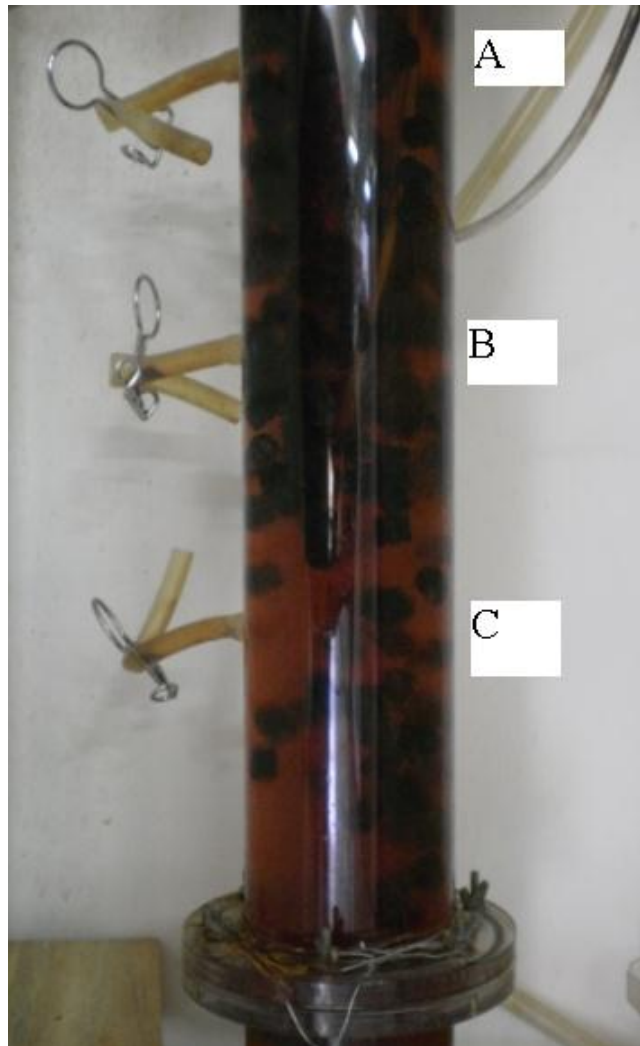


Figura 4.6 Ponto (A,B,C) de coleta para análises microbiológicas



4.8.1 Microscopia a Fresco

Este método consiste na observação ao microscópio de células de pequenos organismos vivos ou fragmentos de tecidos vivos, num meio líquido o mais próximo possível do meio natural desses organismos. Pode-se observar manifestações funcionais, e reações a estímulos. Este método foi realizado apenas na Fase I, com frequência semanal.

Para a observação dos microrganismos presentes no meio líquido contido no interior do reator, foi feita a microscopia a fresco. Coletou-se em um bequer uma alíquota de 50 mL do líquido pelo ponto de coleta A, como mostrado na Figura 4.6. Agitou-se a amostra por alguns segundos, em seguida com auxílio de um conta gotas, adicionou-se 1 à 3 gotas na superfície de uma lâmina, que em seguida foi levada ao microscópio (Olympus CH20) e visualizada em objetivas de 40 e 75X.

4.8.2 Método da Contagem em Placa

A quantificação de bactérias heterotróficas foi feita pelo método da contagem em placa, que é utilizado para avaliar a quantidade de células viáveis presentes numa determinada amostra. Não é possível quantificar todas as bactérias heterotróficas presentes, apenas aquelas que crescem nas condições de nutrientes e pH oferecidas pelo meio de cultura usado e na temperatura e tempo de incubação considerados. Para promover o crescimento do maior número possível de organismos, optou-se por utilizar o ágar padrão para contagem, o meio Plate Count Agar (PCA). O meio de cultura utilizado é indicado para o crescimento de bactérias aeróbias mesófilas. É um meio extremamente rico em nutrientes com pH em torno de 7,0, não seletivo.

Este método foi realizado nas duas fases, porém na Fase I foi feita apenas do meio líquido, coletado no ponto A (Fig. 4.6), e na Fase II, foram feitos do meio líquido e do material suporte. A frequência das análises na segunda fase foi aproximadamente quinzenal (para o meio líquido) e início, meio e final (para os materiais suporte e líquido). Os passos para o desenvolvimento do ensaio são descritos a seguir:

- Foram dissolvidos em um bequer, 23,5 g de PCA e em seguida o volume foi completado para 1L, conforme recomendação do fabricante (Merck);
- Após autoclavado, o meio foi vertido em placa de Petri, para completa solidificação;
- Foi coletado 1 mL de amostra do meio líquido e diluído pelo método das diluições seriadas, de 10^{-1} à 10^{-10} ;
- Para a contagem em placa das bactérias aderidas às biomédias, foram utilizados os mesmos meio suportes coletados para o ensaio de NMP (descrito também no item 4.8.5). Foram retiradas 5 unidades ao acaso de dentro do reator. Estas 5 biomédias foram agitadas manualmente por 20 min com micropérolas e 50 mL de água ultrapura estéril. Após foram retirados 2 mL do líquido para realização da diluição em série;
- Foram colocados 0,1 mL de amostra diluída em cada placa solidificada, para isto foi usado o método de espalhamento em superfície com o auxílio da alça de Drigalsky;
- As placas foram deixadas à temperatura ambiente (que variou entre 28°C e 32°C);
- Após 36 horas era feita a contagem do número de unidades formadoras de colônias, (UFC) nas placas cujas diluições apresentavam entre 30 a 300 colônias;
- O resultado era obtido pelo cálculo da média aritmética dos valores verificados nas diferentes diluições, sendo expressos em UFC/mL.

4.8.3 Crescimento e Manutenção das Bactérias Heterotróficas

O crescimento em meio de cultura tem por objetivo favorecer a multiplicação dos microrganismos de interesse, quando estes estão presentes em pequeno número em relação à microbiota de acompanhamento, que se encontra em maior número, como é o resultado do método da contagem em placa. As colônias foram selecionadas levando-se em consideração a característica de coloração e textura. A manutenção das colônias selecionadas foi feita a fim de armazená-las para posterior identificação do gênero.

- Era retirada uma pequena alíquota de cada colônia das placas de UFC, com a ajuda de uma *Alça de inoculação* pelo método de esgotamento;
- Após era feito a seleção das bactérias em placas contendo meio PCA para crescimento;
- Após 36 horas de crescimento em temperatura ambiente, era coletado 2 ou 3 alíquotas da bactéria isolada, utilizando *Alça de inoculação*, e colocadas em *ependorf* contendo *nutriente broth* (preparado conforme recomendação do fabricante) e então eram deixadas por mais 36 horas para crescimento no meio, e em seguida levados ao refrigerador para manutenção.

4.8.4 Coloração de Gram, Modificado do Método de Hücker (Jenkins et al., 1993; WEF, 1995)

Esse método de coloração separa as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e as Gram-negativas. Esse método deve ser utilizado em bactérias em fase de crescimento. O princípio da técnica está baseado na diferença de composição da parede de diferentes bactérias e na capacidade destas paredes em reterem os corantes utilizados.

O método de coloração era realizado quinzenalmente em todas as lâminas a fresco (Fase I) e nas lâminas preparadas com material proveniente das placas do método de contagem (“selecionadas”).

Procedimento:

- Para a realização da coloração das bactérias selecionadas, foi colocada uma pequena alíquota da colônia isolada, proveniente da placa de Petri, pelo método de esfregação em lâmina e deixada secar por 15 minutos, próximo ao *bico de Bunsen*;

- Posteriormente, recobria-se a lâmina com o reagente 1 (item 4.8.4.a) por um minuto e lavava-se rapidamente com água;
- Na sequência recobria-se a lâmina com o reagente 2 por um minuto e lavava-se com água.
- Aplica-se a solução descolorizante gota a gota até eliminar o excesso de reagente;
- Após cobria-se a lâmina com o reagente 3, por um minuto, lavava-se com água corrente e secava-se com papel;
- Ao final a lâmina, corada com Coloração de Gram, era examinada, para a observação dos microrganismos presentes, em objetiva de 100X com óleo de imersão, utilizando microscópio óptico com iluminação direta (microscopia óptica comum).

Reagentes:

- Reagente 1: A solução A e B foram preparadas separadamente e, em seguida misturadas;
Solução A: foram dissolvidos 2g de violeta cristal em 20mL de etanol 95%;
Solução B: foram dissolvidos 0.8g de oxalato de amônio em 80mL de água destilada;
- Reagente 2: foram dissolvidos 1g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 300mL de água destilada;
- Solução descolorizante: etanol 95%;
- Reagente 3: foram misturados 10mL de safranina (2,5% peso/volume em etanol 95%) em 100mL de água destilada.

Resultado: Se a coloração ficar azul-violeta significa que o microrganismo é gram-positivo e coloração vermelha, indica a presença de bactérias gram-negativas.

4.8.5 NMP de Bactérias Nitrificantes (Schmidt & Belser, 1984, Adaptado para Amostras de Esgoto Sanitário, Visto que o Método foi Desenvolvido Para Amostras de Solo).

É uma técnica bastante útil para estimar a contagem de microrganismos que apresentam uma determinada característica metabólica, como a atividade nitrificante. Foi realizado no início e final da Fase I, início, meio e fim da Fase II. Apenas na Fase II, a técnica foi aplicada também nos meios suportes.

A estimativa do NMP é obtida a partir da combinação dos resultados de tubos positivos com a tabela padrão de probabilidade (APHA, 2005).

Água de diluição:

- Foram dissolvidos 0,85 g de NaCl em água ultrapura e completado o volume para 100mL (depende de quantas diluições eram necessárias)
- Foram adicionados 18 mL da água de diluição nos tubos de ensaio;
- Os tubos foram tampados com tampão de algodão envolto em gaze;
- Foi feita a esterilização dos tubos em autoclave, por 20 min sobre pressão de 1atm e temperatura de 120°C;
- Para o NMP do líquido do reator, foi retirado 2 mL da mistura completa localizada próximo às biomédias e próximo a saída do efluente (ponto de coleta A).
- Para o NMP das biomédias, foram retiradas 5 unidades ao acaso de dentro do reator. Estas 5 biomédias foram agitadas por 20 min com micropérolas e 50 mL de água ultrapura estéril e, após, foram retirados 2 mL para realização da diluição em série;
- Sob ambiente de assepsia, foram feitas diluições seriadas em 10^{-1} à 10^{-10} . Adicionando-se primeiramente 2 mL de amostra no primeiro tubo (10^{-1}), em seguida retirava-se deste 2mL e adicionava-se no segundo tubo (10^{-2}) e assim por diante.

Meios de culturas:

- Os meios de cultura, para as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e para as oxidadoras de nitrito (BON), foram preparados em bequeres separados com as soluções listadas na Tabela 4.5, completando-se o volume para 500mL com água ultra pura;
- O pH dos dois meios foi corrigido com gotas do sobrenadante da solução supersaturada de Na_2CO_3 para valor aproximadamente igual a 7,8 para o meio das BOA e 7,6 para o meio das BON
- Foram adicionados 9 mL do meio de cultura em cada tubo de ensaio, sendo utilizados 5 tubos para cada diluição. Portanto para cada tipo de meio foram utilizados 35 tubos de ensaio (10^{-1} à 10^{-6}), contando com 5 tubos para o Branco (controle negativo).
- Os tubos com os meios foram esterilizados, por 10 minutos sob a pressão de 1atm e temperatura de 120°C;

Inoculação:

- Foi adicionado 1 mL da amostra previamente diluída com a solução de NaCl sob condição de assepsia, em cada tubo de ensaio contendo o meio de cultura, ou seja, da diluição 10^{-1} foi retirado 1 mL que foi colocado em um tubo contendo meio de cultura e repetiu-se o procedimento para os outros quatro tubos (mesma série de diluição), portanto estes foram os tubos com diluição 10^{-2} . Nota-se que cada meio de cultura, BON e BOA, foram formados com 5 tubos para cada diluição, começando com 10^{-2} , este procedimento foi repetido até chegar no 10^{-6} .

- Os tubos foram incubados a 30°C, durante 30 dias.

Tabela 4.5– Compostos e concentrações dos meios de cultura utilizados para a estimativa de bactérias nitrificantes

Composto químico		Meio de Cultivo (mL da solução estoque)	
Solução Estoque (g/100mL)		BOA	BON
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,00	10	-
KNO ₂ ou (NaNO ₂)	0,85 ou 0,69	-	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,34	1,0	1,0
MgSO ₄ .2H ₂ O	4,00	1,0	5,00
Azul de bromotimol	0,04	5,0	-
K ₂ HPO ₄ (0,2M)	3,48	-	4
KH ₂ PO ₄ (0,2M)	2,72	7,5	1,0
Ferro quelado:			
EDTA.2Na	0,331	1,0	1,0
FeSO ₄ .2H ₂ O	0,246		
Micronutrientes			
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,01	1,0 (Ajustar pH a 7,8 com Na ₂ CO ₃ ou K ₂ CO ₃ 3%)	1,0 (ajustar pH a 7,6 com HCl 1N)
MnCl ₂	0,02		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0002		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,002		

Soluções-teste:

- **Solução A:** Foi dissolvido 0,5g de sulfanilamida em 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 2,4N. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração.

- **Solução B:** foi dissolvido 0,3g de N-naftil-etilenodiaminahidrocloreto em 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,12N. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração.

- **Solução C:** foi dissolvido 0,2g de difenilamina em 100mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração.

Determinação e resultado:

- Após 15 dias, foram testados 5 tubos separadamente.
- BOA → Foi retirado uma alíquota de 0,5mL de cada tubo em ambiente asséptico e colocada em um pequeno tubo. Adicionou-se 2 a 3 gotas da Solução A e em seguida a Solução B. Após a adição das soluções, a coloração rosa a vermelho significa presença de nitrito, e, portanto pode haver a presença de bactérias oxidadoras de amônia (resultado positivo). A coloração incolor dos tubos pode indicar que o nitrito já foi convertido para nitrato, portanto deve ser acrescentada a solução C, e o resultado positivo se dá quando este se torna azul, e negativo quando continua incolor. Nota-se que os tubos “brancos” devem estar com ausência de coloração, ou seja, incolor.
- BON → Após a adição das soluções A e B, ausência de coloração significa que o nitrito foi consumido, e, portanto, pode haver a presença de bactérias oxidadoras de nitrito (resultado positivo) e a coloração rosa significa presença de nitrito e portanto, o resultado é negativo para presença dessas bactérias. Nota-se que os tubos “brancos” devem estar com a coloração rosa, indicando resultado negativo.
- Para a determinação do NMP foi utilizada a Tabela Padrão de Probabilidade por combinação das respostas positivas (APHA, 2005).

4.8.6 NMP de Bactérias Desnitrificantes (Tiedje, 1984, Adaptado para Amostras de Esgoto Sanitário, Visto Que o Método Foi Desenvolvido para Amostras de Solo)

Meio de cultura: Foram dissolvidos em um bequer 4 g de meio nutriente genérico (nutriente broth – Acumedia) e 0,214g NaNO_3 e o volume completado para 500 mL com água ultra pura e seguiu-se a preparação do meio conforme recomendação do fabricante.

Procedimento:

- Foram colocados 4,5mL do meio de cultura autoclavado em cada tubo de plástico, do tipo usado para coleta de sangue com tampas, sendo utilizados 5 tubos para cada diluição, como eram 9 diluições, de 10^{-2} à 10^{-10} , foram utilizados 50 tubos, incluindo 5 tubos para o branco.
- Foi adicionado 0,5mL de amostra diluída (10^{-1} à 10^{-10}), sob ambiente de assepsia, em cada tubo contendo meio de cultura, conforme foi citado na metodologia das nitrificantes.
- Os tubos foram incubados à 30°C , variando de 3 dias à 5 dias.

Testes e resultados:

- Para verificar se o nitrato tinha sido consumido, foi retirada pequena alíquota de cada tubo de ensaio e colocado em outro tubo menor.
- Adicionou-se 2 a 3 gotas da solução C. A reação rapidamente acontece. Após a adição, a ausência de coloração indica consumo de nitrato e possível presença de bactérias desnitrificantes (resultado positivo) e coloração azul significa que há nitrato remanescente e, portanto não houve desnitrificação (resultado negativo).
- Para a determinação do NMP foi utilizada a Tabela Padrão de Probabilidade por combinação das respostas positivas (APHA, 2005).

4.8.7 Quantificação da Biomassa

Para quantificar a biomassa aderida ao meio suporte foi utilizado o método descrito por Ribeiro *et al.* (2005)¹(apud ABREU, *et al.*, 2008) e adaptado para os materiais suportes utilizados. Para avaliar a melhor metodologia foram feitos dois ensaios em períodos diferentes, que serão descritos a seguir;

Ensaio I:

- Cinco unidades de material suporte foram retiradas do reator e transferidas para um frasco de 100 mL (Ensaio I);
- Foram adicionadas pérolas de vidro numa quantidade quatro vezes maior em relação à massa de material suporte.
- Agitou-se o frasco por vinte minutos.
- Separou-se da mistura as pérolas e o material suporte e, em seguida, filtrou-se o conteúdo da mistura em membrana (0.45µm) previamente pesada (P0);
- os materiais suportes foram transferidos para uma capsula;
- A membrana foi mantida na estufa (105°C) por 2 horas e a cápsula com os suportes foi mantida por 24horas.
- Após seca e esfriada, a membrana foi pesada (P1) e levada à mufla por 20 min à 550°C.
- Pesou-se a membrana (P2) e os suportes secos (Pmédio dos suportes);

¹RIBEIRO, R.; et al. *Influence of the Carbon Source on the Anaerobic Biomass Adhesion on Polyurethane Foam Matrices*. Journal of environmental Management, v. 74, n. 2, p. 187-194, 2005.

Ensaio II:

- Cinco unidades de material suporte foram retirados do reator e transferidos para um bequer de 250 mL (Ensaio II);
- O bequer foi mantido no Equipamento de ultrasson (Maxiclean 800, com aquecimento, Unique Ultrasonic Clean) por vinte minutos;
- Após seguiu-se o método conforme descrito para o Ensaio I.

4.8.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

A utilização de microscopia eletrônica de varredura tem por objetivo a observação e análise microestrutural de um determinado objeto, alcançando alta resolução, de 0,2 a 5 ηm e grande profundidade de foco (topografia).

Os exames microbiológicos dos biofilmes aderidos ao material suporte, pela microscopia eletrônica de varredura, foram realizados no aparelho da marca ZEISS, modelo DSM-960 em 10 a 20 keV e fotografadas com um vídeo processador de cópias (Mitsubishi), com chapa fotográfica (Fuji) CK 100-S.

As micrografias do material suporte (biomédias) têm por objetivo avaliar as condições dos biofilmes aderidos e caracterizar morfologicamente a biomassa existente.

As amostras foram submetidas a tratamento prévio à observação microscópica, que constou nas seguintes fases: fixação, desidratação e secagem.

Procedimento:

- foi retirada uma unidade de material suporte do interior do reator;
- com auxílio de um estilete, foram feitos cortes transversais, dividindo o material suporte em cinco partes, e prosseguiu-se a fixação;
- após o corte, foram realizadas imagens dos biofilmes aderidos utilizando um Estereomicroscópio, da marca Leica MZ6;
- utilizou-se 0,2% de Glutaraldeído e 0,2M de Tampão Fosfato para fixação do material. O material (partes) ficou submerso no fixador por um período de 12 horas, sob temperatura de 4°C;
- após a fixação, as amostras foram submetidas a três lavagens com tampão fosfato 0,1M por 15 minutos;
- o tampão fosfato foi retirado e as amostras foram recobertas com ósmio e tampão fosfato 0,2M. As amostras foram guardadas em lugar escuro por 1 hora;

- após, prosseguiu-se a lavagem para retirada do ósmio, com três repetições de tampão fosfato 0,1M por 15 minutos cada;
- foram feitas as desidratações em série gradativa de alcoóis de diversas concentrações, 70; 80, 90 e 100% - volume/volume, por 10 minutos;
- as amostras foram secas ao ponto crítico em CO₂ (Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer) à 31°C, pressão 70 bar;
- as amostras secas ao ponto crítico foram coladas em suportes de alumínio, “stubs”, com fita de carbono;
- prosseguiu-se a metalização com ouro por duas horas (Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater) em camada de 30 nm de espessura para a obtenção das eletromicrografias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação e discussão dos resultados foram subdivididos em três itens.

- 5.1 Apresentação e análise dos resultados físico-químicos das Fases I e II;
- 5.2 Apresentação e análise dos resultados microbiológicos das Fases I e II;
- 5.3 Resultados da quantificação da biomassa e microscopia eletrônica de varredura.

5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Na Tabela 5.1 é apresentado o resumo estatístico, valores máximo e mínimo, dos resultados obtidos referentes aos valores das análises de pH durante as Fases I e II.

Tabela 5.1. Resumo estatístico das análises de pH realizadas durante as Fases I e II.

	pH			
	<i>Fase I</i>		<i>Fase II</i>	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Mínimo	7,6	5,7	7,2	4,9
Máximo	8,7	8,7	9,4	7,8
Amostras	10	27	24	33

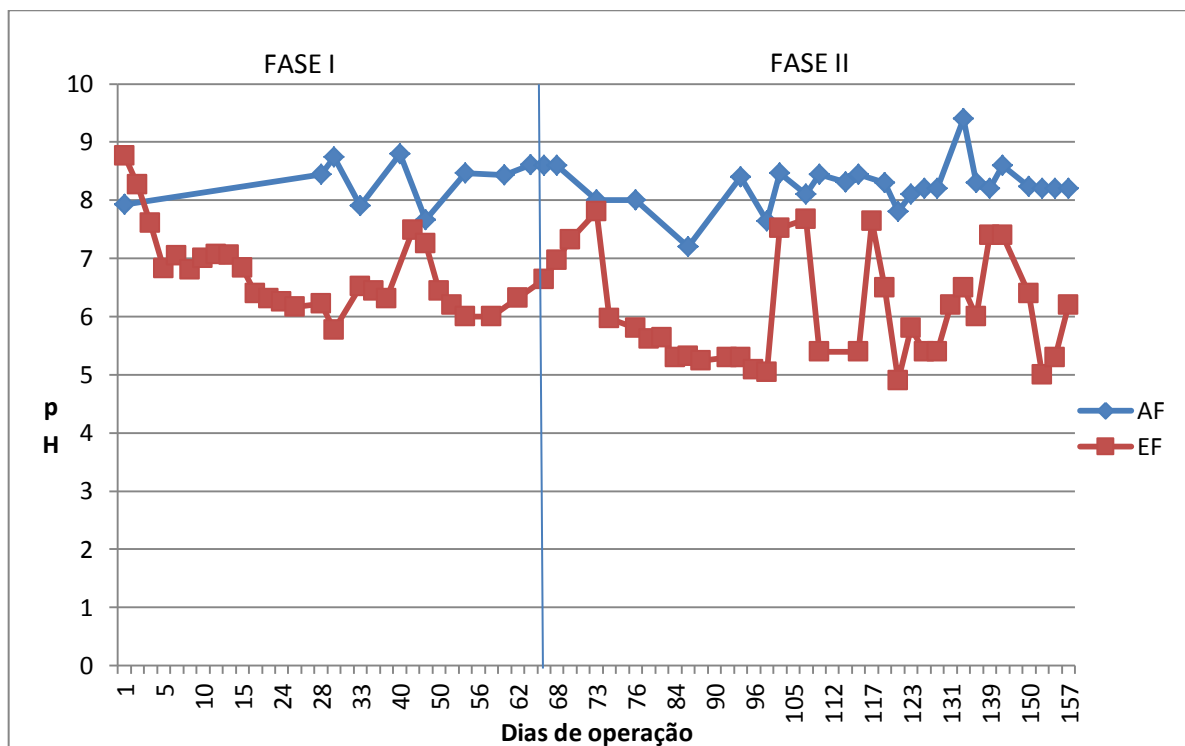
Os dados apresentados na Figura 5.1, mostram a variação do pH durante as Fases I e II. O pH do lixiviado afluente manteve-se com valores próximos de 8,0, variando entre 7,6 e 8,7 na Fase I. Valores de pH acima de 8,0 indicam que o lixiviado é proveniente de aterro cujos resíduos estão na fase metanogênica de decomposição (PHILIPS, *et al.*, 1994).

Os valores de pH do efluente na Fase I, apresentaram valores entre 5,7 à 8,7. Os valores mais altos de pH (7,6 à 8,7) foram encontrados no início da operação do reator, durante o período de adaptação da biomassa às características hidrodinâmicas do reator, cujo inóculo foi proveniente de um sistema de batelada. Após o 9º dia de operação o pH do efluente decresceu para valores abaixo de 7,0, e foi necessário a adição de fonte externa de alcalinidade.

Na Fase II ocorreram valores de pH ainda mais baixos, variando entre 4,9 à 7,8, que os da Fase I. como mostrado na Figura 5.1. O pH do lixiviado afluente manteve-se elevado, entre 7,2 a 9,4. Em ambas as fases, o pH influenciou positivamente para a desenvolvimento da

nitrificação, pois de acordo com Dinçer e Kargi, (2000), o pH ótimo para a ocorrência da nitrificação deve estar entre 7,5 e 8,5, enquanto que em valores inferiores à 6,5, a nitrificação praticamente cessa por falta da amônia livre e elevação da concentração de ácido nitroso. Estudos, realizados por Pambrun et al. (2008), constataram que em pH menor que 7,5 a taxa de nitrificação decresce progressivamente quando a amônia livre torna-se limitante, enquanto em pH acima de 8,5 a taxa de nitrificação decresce rapidamente pelo aumento das concentrações de amônia livre. Os autores observam que o decréscimo da nitrificação com a redução das concentrações de amônia livre está de acordo com a suposição de que essa forma de N-amoniacal é o principal substrato das bactérias oxidadoras de amônia.

Figura 5.1 – Valores de pH do afluente e do efluente durante a Fase I e II.



Na Tabela 5.2 pode-se observar o resumo estatístico (média, desvio padrão, valor máximo e mínimo e contagem de amostras) dos resultados obtidos referentes aos valores das análises de alcalinidade durante as Fases I e II.

Tabela 5.2. Resumo estatístico das análises de alcalinidade realizadas durante as Fases I e II.

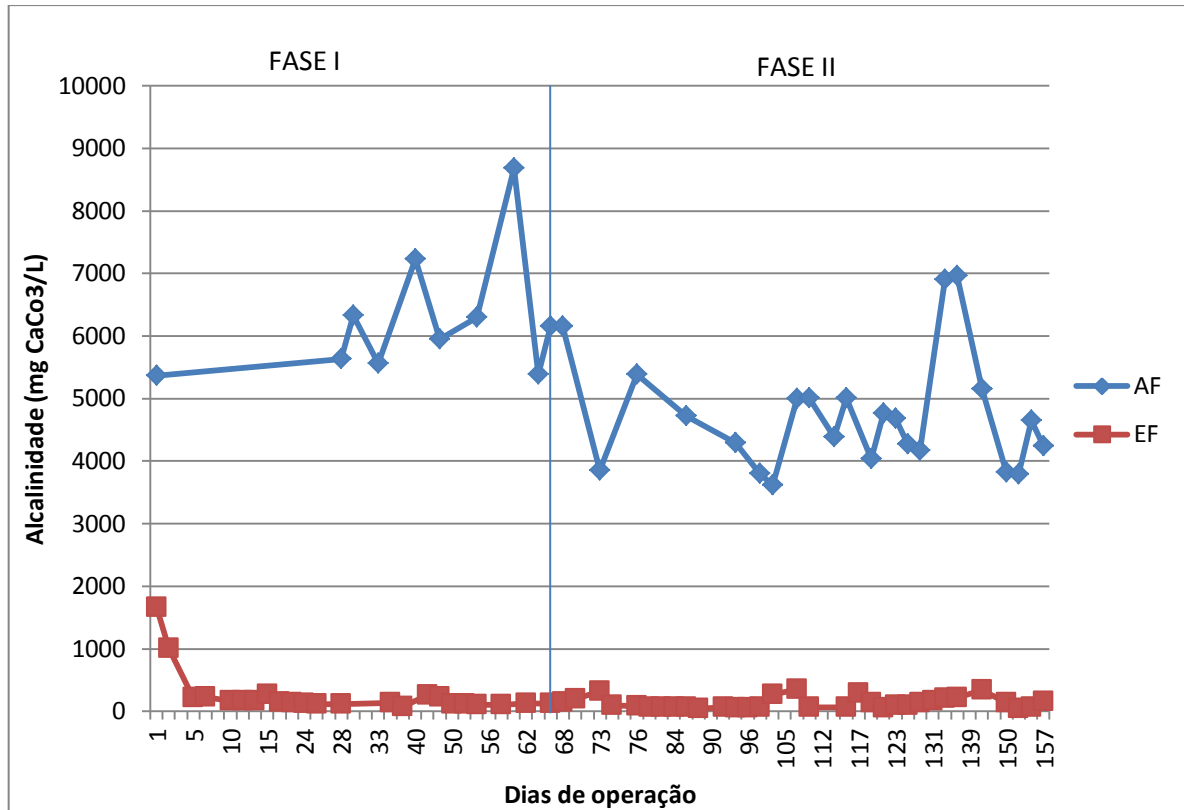
	Alcalinidade (mg CaCO₃/L)			
	<i>Fase I</i>		<i>Fase II</i>	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Média	6256	256	4722	132
Desvio padrão	1019	357	922	93
Mínimo	5362	78	3617	47
Máximo	8679	1664	6962	349
Amostras	10	23	23	32

A concentração de alcalinidade do afluente e do efluente final na Fase II foram ligeiramente inferiores aos da Fase I. Os valores de alcalinidade do afluente na Fase I foram em média de 6256 mg CaCO₃/L (5362 à 8679 mg CaCO₃/L). A oscilação dos valores foi devido às diferentes coletas de lixiviado em períodos distintos, como também a influência da adição do bicarbonato de sódio no reservatório de lixiviado bruto.

No efluente, na Fase I, a alcalinidade foi em média de 256 mg CaCO₃/L variando entre 78 à 1664 mg CaCO₃/L. Os valores mais altos foram observados no início de operação do reator, no período de adaptação.

Observa-se na Tabela 5.2, que os valores de alcalinidade do afluente na Fase I, foram superiores a 6000mg CaCO₃/L, enquanto que 75% dos valores de alcalinidade no efluente foram menores que 275 mg CaCO₃/L e 95% menores que 300 mg CaCO₃/L.

Figura 5.2 – Variação da alcalinidade do afluente e do efluente durante a Fase I e II.



Na Fase II, a alcalinidade do afluente foi em média de 4722 mg CaCO₃/L, com valores de 3617 a 6962 mg CaCO₃/L. No efluente, a alcalinidade foi em média de 132 mg CaCO₃/L, variando entre 47 à 349mg CaCO₃/L. De forma a manter o pH do afluente na faixa adequada à atividade biológica (6,3 à 7,3), foi adicionado bicarbonato de sódio ao lixiviado afluente.

No processo de nitrificação uma alta quantidade de alcalinidade é consumida, devida a liberação do íon H⁺. Assim para a oxidação de 1,0 g de N-NH₄⁺, são consumidos 7,14g de CaCO₃ ou 8,64g de HCO₃⁻. Portanto, no caso de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio se não for fornecida alcalinidade suficiente, poderá haver comprometimento do processo de nitrificação (SEDLAK, 1991).

Nota-se que o consumo de alcalinidade no processo durante a Fase I, foi elevado, em média da ordem de 6099,0 mg/l, conseqüentemente isso resultou em alguns períodos com baixos valores de pH. Na Fase II, a alcalinidade do afluente foi em média de 4722 mg CaCO₃/L e do efluente, foi em média de 132 mg CaCO₃/L. Esse elevado consumo de alcalinidade no reator deve-se a oxidação do N-amoniaco. Na Fase II, o consumo de alcalinidade foi em média de 4589, valor menor ao encontrado na Fase I, o que pode ser devido à influência da recirculação do efluente, que economiza a alcalinidade do meio líquido, além da diluição do efluente nitrificado.

Os valores de pH do efluente na segunda fase, apresentaram maior variação. Observa-se na Figura 5.1, que do 96° ao 122° dia houve um aumento do pH do efluente, podendo ser devido ao excesso de alcalinidade adicionada ao afluente, o que pode ser observado também na Figura 5.2. De maneira geral, a variação do valor do pH no efluente, em ambas as Fases, manteve-se dentro da faixa ideal para a nitrificação, entre 7,0 a 7,5 (VENDRAMEL, 2009), exceto nos dias que foi maior que 8,0 e outros em que foi menor que 5,0, como pode ser observado na Figura 5.1.

Vale ressaltar que em ambas as fases, foram adicionadas 3g NaHCO₃/L no reservatório do lixiviado in natura, para complementar a alcalinidade do lixiviado quando o consumo no reator era elevado e esta encontrava-se em concentrações abaixo de 200mg no efluente e, conseqüentemente, poderia ocorrer decréscimo do pH.

Na Tabela 5.3 pode-se observar o resumo estatístico (média, coeficiente de variação, desvio padrão, valores máximo e mínimo e número de amostras) dos resultados obtidos referentes aos valores das análises de DQO durante a Fase I e II.

Tabela 5.3. Resumo estatístico das análises de DQO realizadas durante as Fases I e II.

	DQO (mg/L)			
	Fase I		Fase II	
	DQO_{Total}		DQO_{Filtrada}	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Média	1117	1081	1228	981
Cv	11	24	14	31
Desvio padrão	122	258	174	304
Mínimo	958	687	932	863
Máximo	1291	1481	1513	1156
Amostras	6	10	14	14

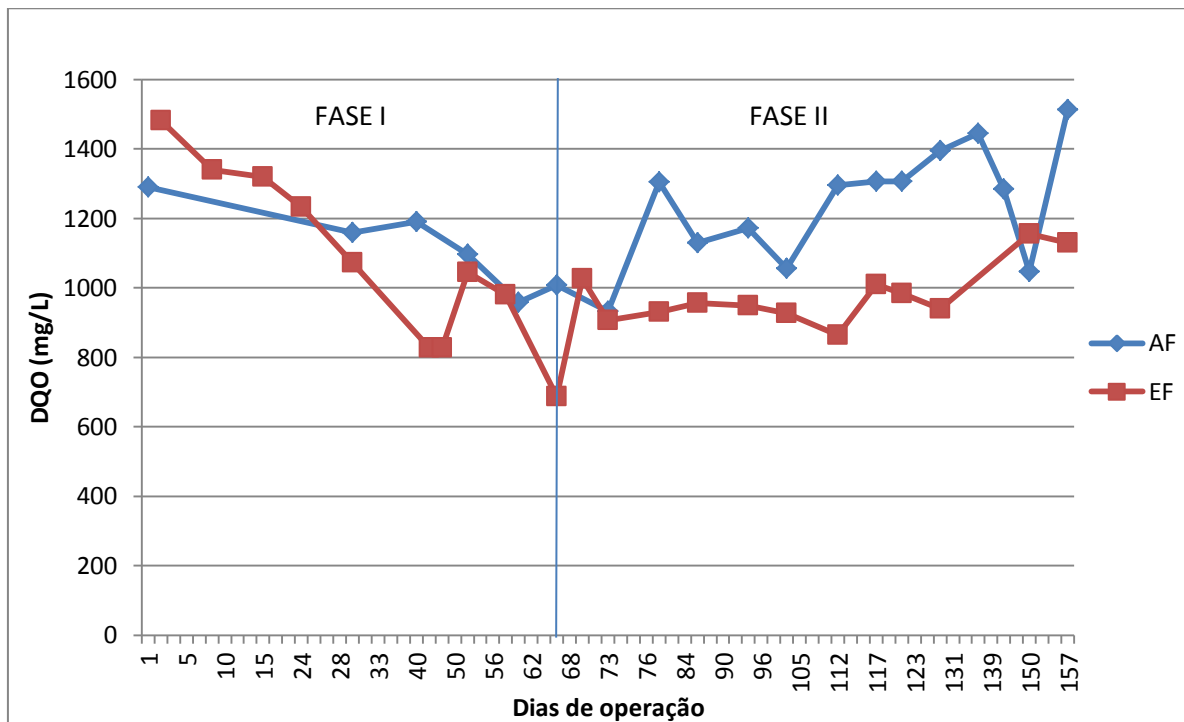
Na Figura 5.3, são apresentadas as concentrações de DQO_{Total} das amostras coletadas do afluente e do efluente durante a Fase I, cujos valores, foram em média de 1117 mg/L e 1081mg/L, respectivamente para afluente e efluente. O sistema apresentou remoção média de DQO, na Fase I, de 18%.

Na Fase II, como pode ser observado na Figura 5.3, as concentrações de DQO_{Filtrada} do afluente foram semelhantes as concentrações de DQO_{Total} da Fase I. Os valores de DQO do afluente e do efluente, foram em média de 1228 mg/L e 981mg/L, respectivamente. A remoção média de DQO na Fase II foi de 21%.

O elevado tempo de detenção hidráulica (TDH) pode interferir na avaliação da remoção de DQO, pois o decréscimo ou aumento repentino da DQO do afluente não se reflete imediatamente no efluente (SPAGNI, MARSILI-LIBERLLI, 2008), mesmo no caso de reatores de mistura completa como neste trabalho.

Como foram observadas, em ambas as Fases a eficiência de remoção de DQO foi muito baixa, provavelmente, porque o substrato contém compostos recalcitrantes ou matéria lentamente biodegradável. Spagni, Marsili-Libelli (2008), observaram, em um reator em batelada sequencial, eficiência de remoção média de DQO em lixiviado de aterro sanitário antigo de apenas 20% e atribuíram esse valor a baixa biodegradabilidade do lixiviado.

Figura 5.3 – Variação da DQO do afluente e do efluente durante a Fase I e II.

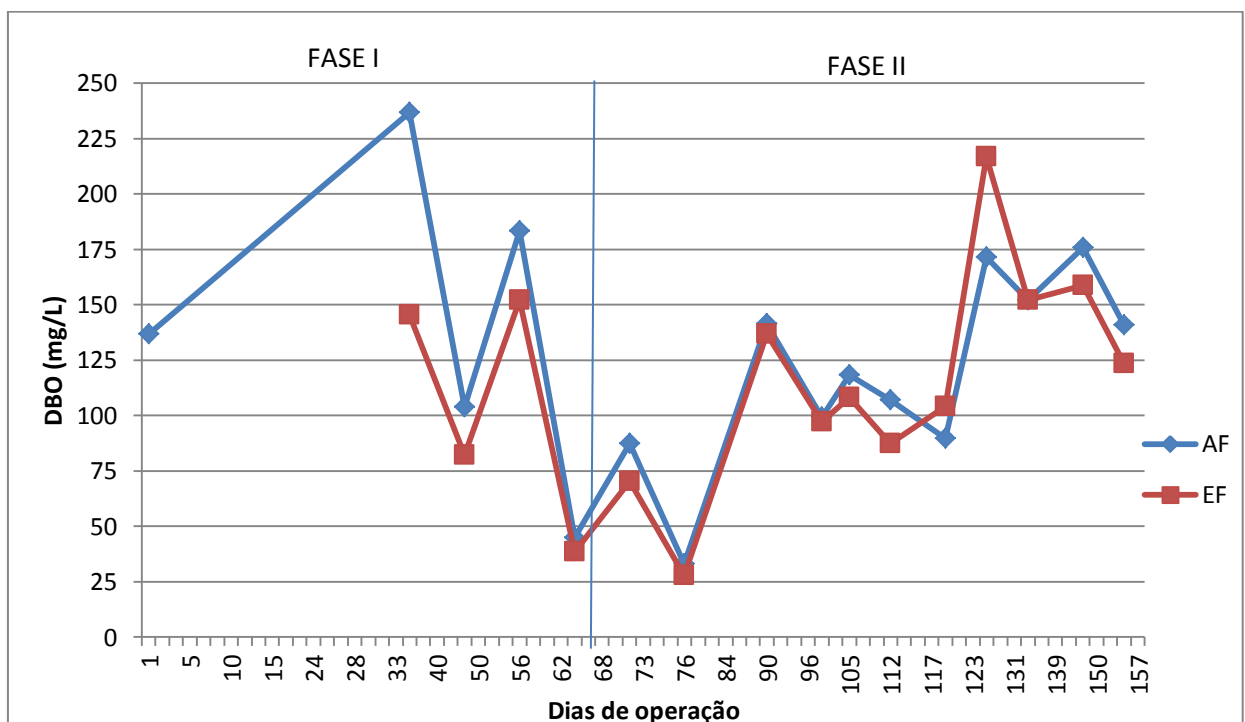


Na Tabela 5.4 observa-se o resumo estatístico (média, desvio padrão, coeficiente de variação e valores máximo e mínimo) dos resultados obtidos referentes aos valores das análises de DBO durante a Fase I e II.

Tabela 5.4. Resumo estatístico das análises de DBO realizadas durante as Fases I e II.

DBO (mg/L)				
	DBO _{Total}		DBO _{Filtrada}	
	Fase I		Fase II	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Média	141	104	119	116
Cv (%)	52	52	35	43
Desvio padrão	73	54,1	42,1	49,9
Mínimo	45	38	33	28
Máximo	236	152	175	216
Amostras	5	4	11	11

Na Figura 5.4 é mostrada a variação de DBO_{Total} ao longo do monitoramento da Fase I. A variabilidade dos valores de DBO do lixiviado bruto se deve às influências das condições hidrometeorológicas, além disso, o armazenamento e posterior descongelamento do lixiviado armazenado podem ter interferido nesses valores. A DBO média do efluente foi em torno de 104mg/L, oscilando na faixa de 38 e 152mg/L. Nesse período a remoção média de DBO foi de 23%. Na Fase II, praticamente não houve remoção de DBO.

Figura 5.4 – Variação da DBO do afluente e do efluente durante a Fase I e II.

Apesar do reduzido número de resultados de DBO, foram determinadas as razões médias de DBO/DQO, que foram de 0,13 e 0,10 no afluente, respectivamente, na Fase I e II e no efluente foi de 0,10 e 0,11, respectivamente para a Fase I e II. Kjeldsen *et al.* (2002) obtiveram valores semelhantes, da ordem de 0,1, indicando que o lixiviado se encontrava na fase metanogênica de decomposição dos resíduos. A remoção de matéria orgânica de lixiviados de aterros de resíduos antigos apresenta uma série de dificuldades, devido à presença de compostos de difícil biodegradação.

Em geral, a razão DBO/DQO em lixiviado de aterros novos (fase acidogênica) está na faixa de 0,4 a 0,5, enquanto que em lixiviado de aterros mais velhos esta razão tende a atingir valores inferiores a 0,1. Embora as características do lixiviado dependam de vários fatores, é comum valores de DQO elevados (5000 à 20000 mg/L), bem como baixa relação DBO/DQO - menor que 0,1 (KURNIAWAN, LO, CHAN, 2006).

Estudos, como o desenvolvido por Hossaka *et al.* (2007), tratando lixiviado do aterro controlado de Londrina em sistema de lagoas aeradas de mistura completa, com TDH de 5, 10, 15, 30 e 40 dias, obtiveram remoção de DQO em média de 20% e DBO de até 92%, demonstrando a presença de elevada parcela de matéria orgânica recalcitrante. A relação DBO/DQO foi da ordem de 0,07, indicando lixiviado de resíduos sólidos na fase metanogênica. Este autor mostra também a dificuldade de remover em sistemas de tratamento biológicos os compostos orgânicos lentamente biodegradáveis do lixiviado.

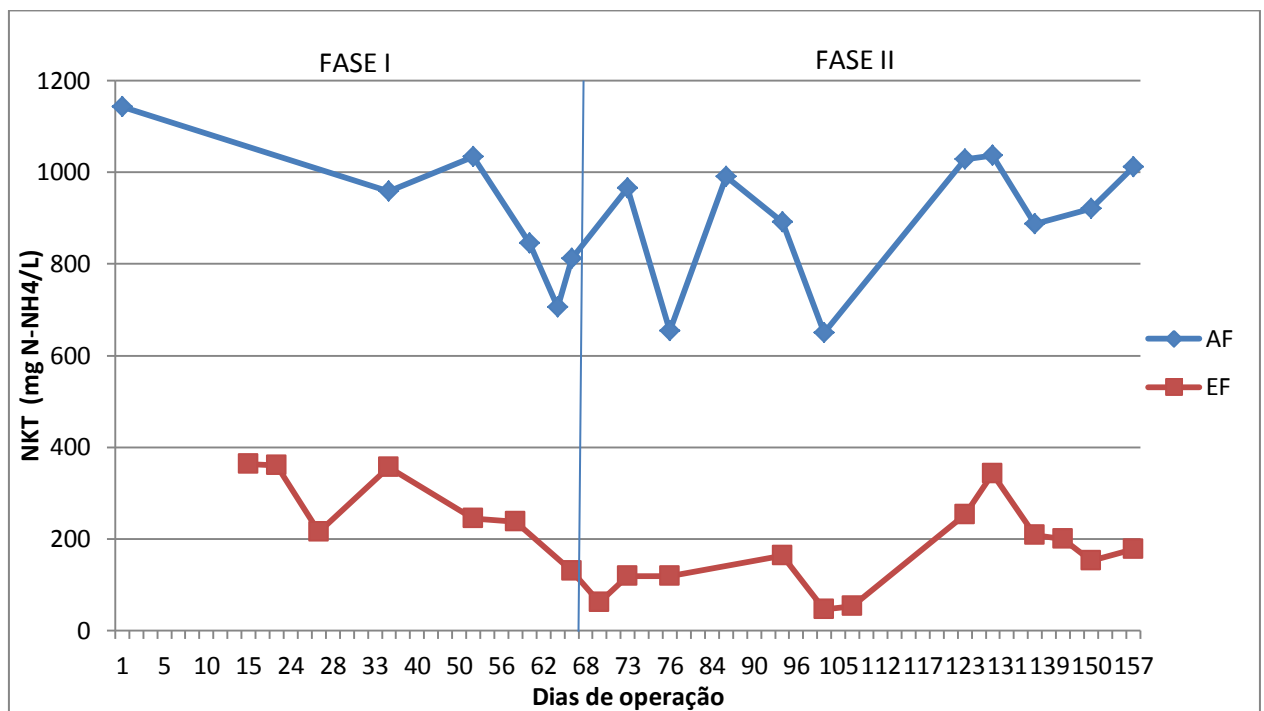
Devido à simplicidade e ao custo-benefício, o tratamento biológico (em suspensão ou crescimento aderido) é geralmente usado para a remoção da maior parte das concentrações de DBO e N-amoniacoal em lixiviados jovens. No entanto, quando usado para lixiviados que contém pouca fração biodegradável, o tratamento biológico pode não ser capaz de alcançar as concentrações adequadas de DQO no efluente (KURNIAWAN, 2006). Desse modo, atualmente busca-se outras tecnologias mais eficientes e eficazes para o tratamento de lixiviados de aterros mais antigos, principalmente com objetivo de remover a alta fração de compostos recalcitrantes presentes neste tipo de água residuária.

A seguir serão mostrados os resultados e a discussão das análises da série de nitrogênio (NKT, N-amoniacoal, Nitrito e Nitrato). Na Tabela 5.5 pode-se observar o resumo estatístico (média, desvio padrão e valores máximo e mínimo e contagem de amostras) dos resultados obtidos referentes aos valores das análises de NKT durante a Fase I e II. A variação dos dados pode ser verificada na Figura 5.5.

Tabela 5.5. Resumo estatístico das análises de NKT realizadas durante as Fases I e II.

	NKT (mg/L)			
	Fase I		Fase II	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Média	916	273	903	158
Desvio padrão	159,53	132,94	142,95	86,64
Mínimo	705	130	650	46,
Máximo	1143	363,	1037	343
Amostras	6	9	10	13

A Figura 5.5 apresenta os resultados de NKT da entrada e saída do reator durante todo o período operacional (Fase I e Fase II).

Figura 5.5 – Variação do NKT do afluente e do efluente durante a Fase I e II.

As análises de NKT do afluente foram realizadas para caracterização do lixiviado bruto (1º dia) e, posteriormente, a partir do 37º dia de operação. O NKT do efluente foi monitorado semanalmente durante todo o período de operação do reator.

Na Tabela 5.5, pode ser observado que as concentrações de NKT no lixiviado afluente foram similares, em média de 916 e 903 mg N-NH₄/L, respectivamente nas Fases I e II.

A relação média N-amoniaco/NKT do lixiviado afluente foi de 0,98 e 0,97 para as Fases I e II, enquanto no efluente essa relação foi em média de 0,92 e 0,84.

A relação de DBO/NKT do lixiviado afluente, na Fase I foi de 1,18, enquanto que na Fase II obteve-se o valor de 1,38. De acordo com Metcalf e Eddy (2003), os valores encontrados estão dentro da faixa sugerida (1,0 à 1,5), que favorece a conversão do nitrogênio amoniacal a nitrato, pois o meio não favorece a predominância de bactérias heterotróficas, o que reduz a competição destas por espaço e nutrientes com as bactérias nitrificantes, aumentando assim, o percentual das nitrificantes no sistema. Entretanto esta faixa é indicada para compostos que apresentam DQO biodegradável, como é o caso de esgoto sanitário.

Como o lixiviado em estudo contém baixa fração de matéria orgânica facilmente biodegradável em relação às concentrações de NKT, como demonstram os valores de DBO, o adequado seria usar a relação DBO/NKT do lixiviado afluente, que foi de 0,15 e 0,11 para as Fases I e II, para avaliar a razão C/N na nitrificação.

A fração de bactérias nitrificantes presentes em um sistema de tratamento pode ser relacionada a razão DBO/NKT (C/N) neste. A medida que a relação C/N cresce o crescimento de microrganismos heterotróficos é favorecido e estes competem com as nitrificantes pelo oxigênio e nutrientes. Para relações DBO/NKT em torno de 0,5 a fração nitrificante, segundo Metcalf e Eddy (2003), seria da ordem de 35% e conforme essa relação decresce a fração de nitrificantes aumenta. O aumento da relação DBO/NKT favorece a predominância da biomassa heterotrófica, com maior taxa de crescimento, no biofilme. Portanto, substratos que apresentam baixa fração orgânica (DBO solúvel) no processo de nitrificação oferecem menor possibilidade de competição das heterotróficas com as bactérias nitrificantes, porém estudos, baseados em técnicas de biologia molecular, tem apontado baixas porcentagens de organismos nitrificantes em relação à biomassa heterotrófica, mesmo em sistema com baixas concentrações de carbono e com nitrificação eficiente (DIONISI et al., 2002; LI et al., 2007).

As concentrações de NKT no efluente foram 273 e 158 mgN-NH/L respectivamente nas Fases I e II. A eficiência de remoção média de NKT foi de 81% na Fase I e de 82% na Fase II. Observa-se que aparentemente a recirculação do efluente nitrificado para entrada do reator teve pouco efeito na eficiência de remoção de NKT.

Os resultados de eficiência de remoção de NKT obtidos neste trabalho são menores em comparação com os valores encontrados por Maringonda (2008), que estudando o tratamento de lixiviado de aterro de resíduos sólidos, em sistema de Lodo Ativado composto de reator anóxico seguido de aeróbio, com tempos de detenção hidráulica total de 20 e 13 dias, obteve eficiência de remoção de NKT de 92%. Observa-se que um dos fatores que pode

ter contribuído para a elevada eficiência de remoção de NKT, obtida por Maringonda (2008), tenha sido o controle de forma automática do pH, com a concomitante correção da alcalinidade, pois sem este controle o mesmo autor obteve eficiência média de remoção de NKT de 61 e 73%, respectivamente para TDH de 10 e 20 dias, portanto menores que as obtidas no presente estudo.

No final da Fase II, no período 116 à 125º dia, verificou-se uma tendência de aumento das concentrações de NKT no efluente final, atingindo valores na ordem de 200mg N-NH₄/L. Estes resultados podem estar relacionado a instabilidade da nitrificação, devido as dificuldades de controle do pH na faixa ótima para a nitrificação.

Na Tabela 5.6 é apresentado o resumo estatístico (média, desvio padrão e valores máximo e mínimo e contagem de amostras) dos resultados obtidos referentes aos valores das análises de N-amoniaco durante a Fase I e II.

Tabela 5.6. Resumo estatístico dos resultados de N-amoniaco para as Fases I e II.

	N-amoniaco (mg/L)			
	<i>Fase I</i>		<i>Fase II</i>	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Média	902	179	885	147
Desvio padrão	171,1	157,6	152,3	110,8
Mínimo	671	10	550	30,
Máximo	1164,	385	1075	335
Amostras	11	20	20	31

Na Figura 5.6, é mostrada a variação de N-amoniaco ao longo do período de monitoramento. Como se pode observar na Figura 5.6, a remoção de N-amoniaco (nitrificação) nos primeiros vinte dias de operação foi lenta (fase de adaptação), apresentando grande variabilidade, possivelmente neste período ainda estava ocorrendo o desenvolvimento do biofilme no meio suporte.

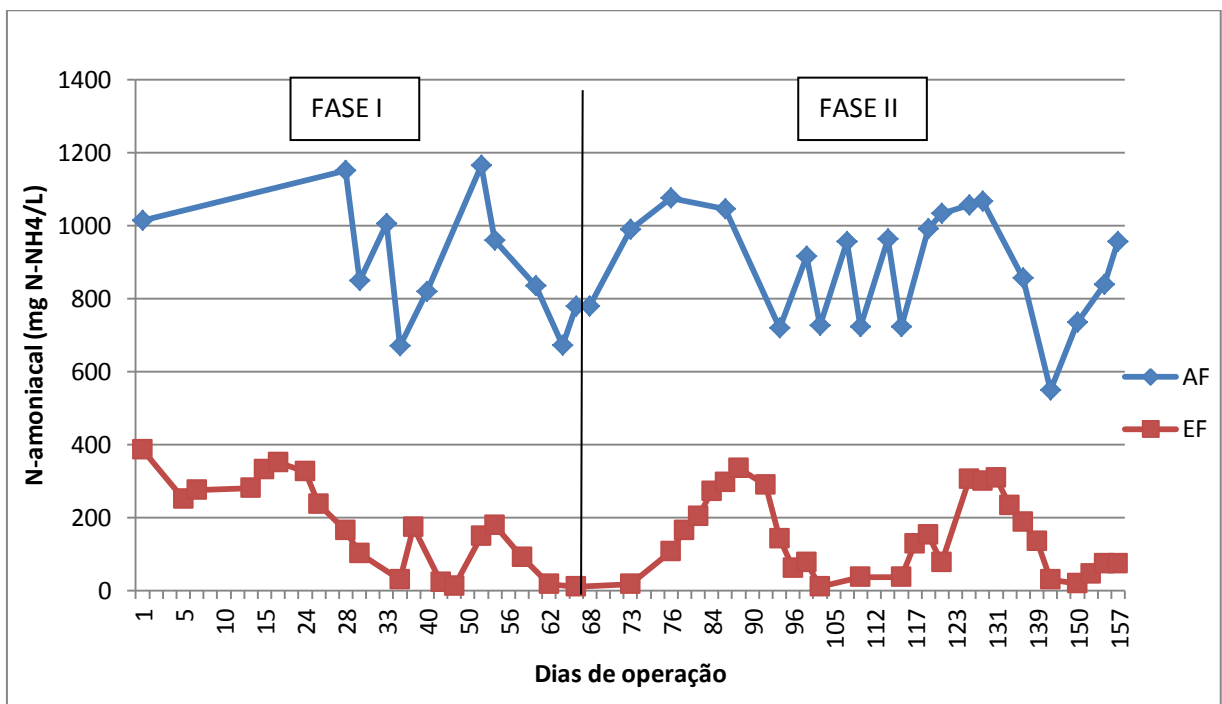
A concentração de N-amoniaco do afluente bruto, na Fase I foi em média de 902 mgN-NH₄/L, com valores na faixa de 671 à 1164, mgN-NH₄/L. Na Fase II, o afluente apresentou a concentração média de 885 mgN-NH₄/L, com valores na faixa de 550 à 1075 mgN-NH₄/L.

A concentração de N-amoniaco nas amostras do efluente variou durante todo o período monitorado. Durante a Fase I, a concentração média foi de 179 mgN-NH₄/L,

alcançando valores entre 10 à 385 mg N-NH₄/L. Na Fase II, a concentração média foi de 147 mgN-NH₄/L, atingindo valores entre 30 à 335 mg N-NH₄/L.

Segundo Shouliang, *et al.*, (2008), altos valores de NKT no efluente mostram que se trata de uma parcela do N-orgânico que não foi amonificada, tratando-se possivelmente de nitrogênio orgânico associado à matéria orgânica recalcitrante, mas neste trabalho, a relação N-amoniacoal/NKT no efluente foi de 0,92 e 0,84, indicando que apenas uma parcela pequena do NKT efluente devia-se ao nitrogênio na forma orgânica, portanto a deficiência na nitrificação não foi relacionada a problemas na amonificação.

Figura 5.6 – Variação do N-amoniacoal do afluente e do efluente durante a Fase I e Fase II.



A eficiência média de remoção de N-amoniacoal na Fase I foi de 80% e na Fase II foi de 83%. A pequeno aumento na eficiência de nitrificação na Fase II em comparação com a Fase I, pode ser devido à recirculação do lixiviado nitrificado, como também ao maior tempo de adaptação da biomassa nitrificante.

Agra (2009), operando um reator com biomassa aderida, obteve valores de remoção de N-amoniacoal de 82% à 99%, tratando águas residuárias domésticas com baixas concentrações de nitrogênio amoniacoal (média 65 mg N-NH₃/L), funcionando com fluxo contínuo e com TDH de 8 horas.

Luoastarinen *et al* (2006) estudaram a eficiência da nitrificação em reatores de leito móvel sob baixas temperaturas, conjugados como pós-tratamento para nitrificação a outros

sistemas de tratamento, utilizando como substrato esgoto doméstico com baixa concentração de N-amoniaco (média: 25 mg N-NH₃/L). Levando em conta apenas a nitrificação no reator com leito móvel a eficiência variou entre 50 e 60%, entretanto chegando a 70% no processo completo.

Outros autores realizaram estudos com reatores de leito móvel usando efluentes com elevada salinidade. Vendramel (2009) operando um reator de leito móvel, em batelada sequencial de 12 e 24 h e fração de enchimento de 40%, tratando efluente salino, obteve uma variação na remoção de N-Amoniaco entre 77 e 97%. Bassin, (2008) também utilizando reator de leito móvel para pós-tratamento de efluente salino com baixa concentração de N-amoniaco (média: 45 mg N-NH₃/L), observou remoção de N-Amoniaco entre 80 e 90% quando adicionado 50% de inóculo (esgoto sanitário) para melhorar a eficiência de remoção.

Schneider (2010), avaliando um reator de leito móvel alimentado com efluente da indústria de petróleo (baixa concentração de N-amoniaco: 25mg N-NH₃/L médio) pré-tratado por ozonização acoplada a carvão ativado, observou a influência do TDH (12, 9, 6 e 3 horas) na eficiência de remoção de nitrogênio. Foi comprovado que o TDH de 6 horas teve uma melhor eficiência de remoção, obtendo 90%, como também influenciou a remoção de DQO. Pode-se observar que o TDH de 6 horas, influenciou positivamente a eficiência de remoção de nitrogênio do reator, por ter ocasionado menos desprendimento da biomassa dos suportes.

Wang *et al.* (2006) avaliaram um processo combinado de precipitação química (coagulação/floculação) e um reator de leito móvel com biofilme (MBB) para a remoção de nitrogênio pelo processo denominado de nitrificação e desnitrificação simultâneas (SND), obtiveram remoções totais de nitrogênio da ordem de 90%. O substrato, água residuária doméstica, apresentava concentrações de N-amoniaco entre 11-54 mg/L e o processo foi estabilizado com uma concentração de OD acima de 2 mg.L⁻¹.

Comparando com autores que utilizaram o sistema de leito móvel no tratamento de águas residuárias com baixas concentrações de nitrogênio amoniacal, observa-se que o presente estudo mostrou faixas de remoção de N-amoniaco próximas as da literatura, mesmo com o efluente apresentando concentrações de N-amoniaco da ordem de 900 mg/L.

Canziani, *et al.* (2006) operando um biorreator de membrana (PO-MBR) utilizando oxigênio puro seguido por um reator de leito móvel para desnitrificação, tratando lixiviado de aterro sanitário com concentração de nitrogênio entre 1000 a 1500 mg L⁻¹, em TDH de 45 dias, obtiveram 90% de eficiência na etapa da nitrificação e os reatores não apresentaram acúmulo de nitrito.

Trennepohl, (2009), operando um sistema piloto de Lodo Ativado, com reator anóxico/aeróbio em série, realizando nitrificação de lixiviado de resíduos sólidos, obteve remoção de nitrogênio amoniacal de 99,8%, porém com controle automático do pH, o que ajudou a nitrificação a ser mais estável.

Pode-se observar que os resultados da eficiência de remoção de N-amoniacal dessa pesquisa apresentam valores próximos aos da literatura consultada. É evidente que as diferentes condições expostas devem ser levadas em consideração. Entretanto pode-se observar que a eficiência de remoção de N-amoniacal obtida foi satisfatória em relação aos estudos relatados, que trataram de lixiviado ou outras águas residuárias com elevada concentração de N-amoniacal.

YE, *et al.* (2008), tratando lixiviado de aterro de resíduos sólidos, com concentração média de N-amoniacal de 565 mg/L, em reator de leito móvel com TDH de 72h, observaram eficiência de remoção de 99,9% de N-amoniacal. Este resultado mostra que a biomassa imobilizada tem ótima resistência à alta carga de N-amoniacal.

Vale ressaltar, que no presente trabalho o sistema não apresentava tratamentos subsequentes ou anteriores, sendo este um fator positivo em relação ao desempenho observado quando comparado aos resultados apresentados por outros autores.

Na Tabela 5.8 pode-se observar o resumo estatístico (média, desvio padrão e valores máximo e mínimo e contagem de amostras) dos resultados obtidos referentes aos valores das análises de Nitrito e Nitrato durante a Fase I e II.

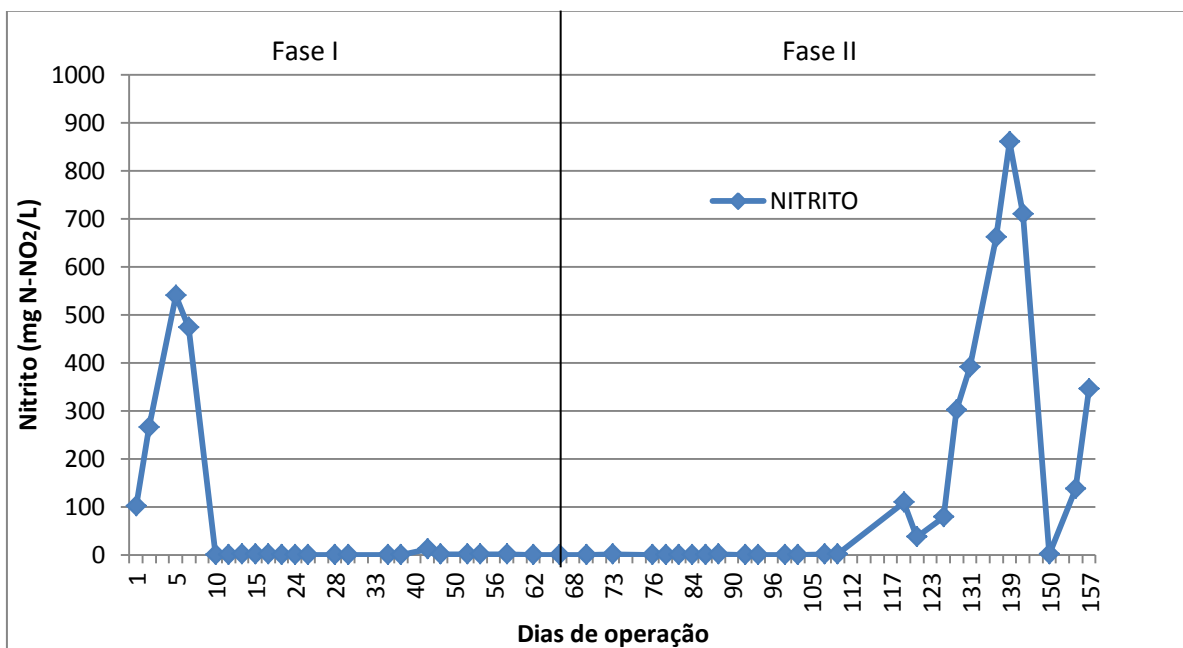
Tabela 5.7 Resumo estatístico das análises de nitrito e nitrato realizadas durante as Fases I e II.

	Nitrito (mg N-NO₂/L) /Nitrato (mg N-NO₃/L)			
	Fase I		Fase II	
	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato
Média	1,3	461,8	0,5	407,9
Desvio padrão	152,2	143,2	299,2	106,0
Mínimo	0,3	429,2	0,3	221,8
Máximo	1,6	590,7	859,9	566,0
Contagem	23	23	26	26

A variação concentração de nitrito e nitrato no efluente é dependente da concentração de NKT e N-amoniacal do afluente, do pH e da alcalinidade no reator. Pode-se observar que a concentração média de nitrito na Fase I, foi de 1,3 mg N-NO₂/L. É possível observar na Figura 5.7, que as concentrações mais altas de nitrito, na Fase I, ocorreram no início da

operação do sistema, durante o período de adaptação da biomassa no reator de leito móvel, quando teve início o desenvolvimento do biofilme no material suporte. Vale ressaltar que o material suporte foi colocado no reator no 1º dia de operação juntamente com o inóculo. As concentrações de nitrito na Fase I, a partir do 9º dia de operação, demonstram que a nitrificação foi efetiva nesse período, sem acúmulo de nitrito, uma vez que havia remoção de N-amoniacal e geração de nitrato.

Figura 5.7 – Variação das concentrações de nitrito do efluente da Fase I e II.



Na Figura 5.7, observa-se que no início da Fase II, as concentrações de nitrito permaneceram abaixo de 1 mg N-NO₂/L, porém a partir do 116º dia este começou a aumentar. Salienta-se que nesse período os valores de pH e de alcalinidade do efluente eram de 6,0, e 120mg CaCO₃/L respectivamente. Nesse mesmo período, houve uma diminuição na porcentagem de remoção de NKT e N-amoniacal, o que mostra coerência nos resultados, e pode-se concluir que houve redução na atividade das nitrificantes, principalmente das oxidadoras de nitrito, devido as condições ambientais do meio, pH e alcalinidade.

O acúmulo de nitrito pode prejudicar o desempenho do reator de leito móvel em termos de remoção de nitrogênio amoniacal, pois o ácido nitroso, que depende diretamente do pH do meio, inibe o processo de nitrificação. Em valores de pH básico o nitrito prevalece no meio enquanto que em pH ácido o equilíbrio é deslocado no sentido de formação do ácido

nitroso. Entretanto nota-se que não houve redução efetiva na eficiência de remoção de N-amoniacoal, nesse período.

O acúmulo de nitrito pode ter sido ocasionado também por outros problemas, como pelo arraste das bactérias oxidadoras de nitrito devido ao desprendimento natural, ou acidental do biofilme do material suporte, ocasionado pelas forças de cisalhamento. .

Nesse período, houve uma queda do TDH de 13 para 8 dias, devido às falhas da bomba de alimentação. Isto pode ter provocado o arraste das bactérias oxidadoras de nitrito do reator, apesar deste ser de crescimento fixo. De acordo com Verstraete e Philips (1998), as BON possuem menores taxas de crescimento específico comparadas as bactérias oxidadoras de amônia, fazendo com que as BOA cresçam mais rápido tornando-as dominantes no meio, com isso, pode haver crescimento excedente de *Nitrossomonas*, prejudicando o crescimento e atividade das bactérias oxidadoras de nitrito.

Vale ressaltar, que a concentração de oxigênio dissolvido sempre foi mantida acima de 2 mg/L..

Portanto, esse acúmulo de nitrito pode ter sido causado pela diminuição de pH, que nesse período chegou à 5,4, que, por consequência, pode ter reduzido a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito.

Em valores de pH inferior à 6,5 a nitrificação praticamente cessa, por falta de amônia livre e alta concentração de ácido nitroso (VILLAVERDE, 2004). Pambrun *et al.* (2006) e Suzuki *et al.* (1974) relatam que as bactérias oxidadoras de amônia utilizam o NH_3 (N-amoniacoal não ionizado) em vez do íon NH_4^+ como substrato. Por outro lado, pH elevado, acima de 8,5, pode causar inibição devido ao excesso de amônia livre, uma vez que a concentração desta depende da concentração de N-amoniacoal e, principalmente, do pH e da temperatura do meio.

Almeida (2007) recomenda que o pH ótimo para nitrificação em sistemas com biofilmes deve estar na faixa de 7,5 à 8,5 e a alcalinidade residual mínima deve ser maior que 50 mg/L.

As concentrações de amônia livre no afluente e efluente, apresentadas na Figura 5.8 e na Tabela 5.8, foram estimadas a partir da concentração de N-amoniacoal, pH e temperatura do afluente e do efluente. As concentrações de amônia livre, considerando o afluente entrando no reator, foram maiores que 10 mg NH_3 /L e, no efluente, menores que 1 mg/L. Considerando-se que o reator era de mistura completa deve-se admitir que no interior do mesmo as concentrações de amônia livre eram da mesma ordem de grandeza das do efluente.

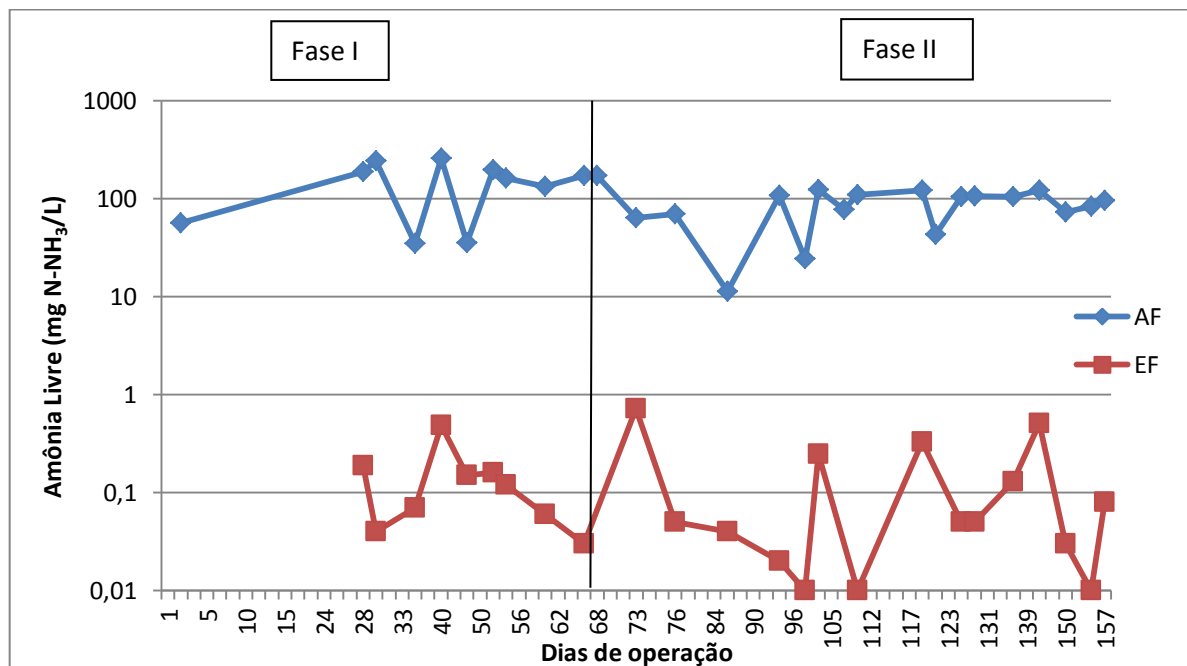
O cálculo das concentrações de amônia livre no meio líquido é importante, para verificar se estas não são a causa da inibição da nitrificação. Concentrações de amônia livre, a partir de 10 mg NH₃/L tem início a inibição da atividade das bactérias oxidadoras de amônia e a partir de 0,1 mg NH₃/L inibem as bactérias oxidadoras de nitrito (HENZE, *et al.*,1995).

O ácido nitroso pode inibir as BON, mesmo em baixas concentrações, como na faixa entre 0,2 a 2,8 mg/L. A concentração deste ácido é dependente da concentração de nitrito, do pH e da temperatura. A concentração de ácido nitroso estimada, durante a Fase I e II, foi em média de 0,16 e 1,14. Como observado na Fase II, a concentração de ácido nitroso encontrada no efluente pode ter inibido a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito, por isso o nitrito acumulou no sistema.

Tabela 5.8 Concentrações de amônia livre durante as Fases I e II.

Concentrações de amônia livre (mg NH ₃ /L)				
	Fase I		Fase II	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Média	149,3	0,1	90,4	0,1
Mínimo	35,2	0	11,3	0
Máximo	258,1	0,4	174,3	0,7
Contagem	10	10	18	18

Figura 5.8 – Variação das concentrações de Amônia Livre do afluente e do efluente da Fase I e II.



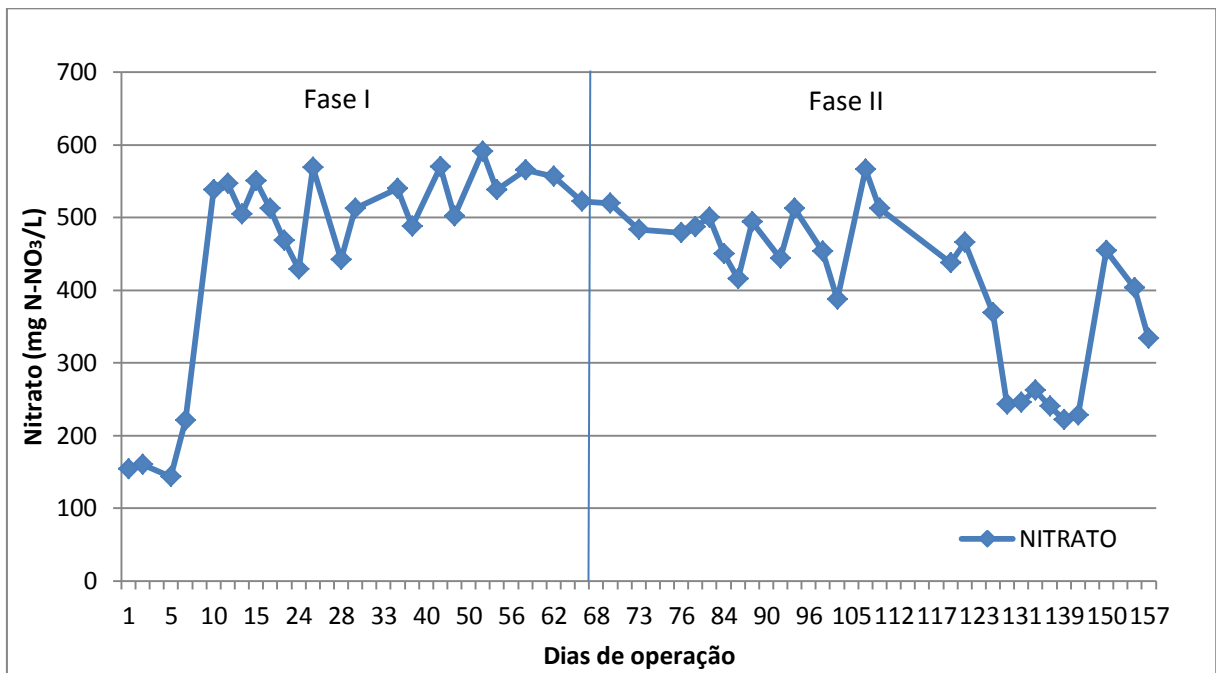
Silva Filho *et al.* (2007) observaram a atividade metabólica das bactérias nitrificantes em sistema de Lodos Ativados tratando águas residuárias domésticas, em diferentes valores de pH (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0), e verificaram que em pH abaixo de 5,0 os dois grupos (BOA e BON) não exibem atividade biológica, enquanto que em pH em torno de 8,0, aumentava a capacidade metabólica.

É importante observar que no caso de águas residuárias com baixa concentração de N-amoniacal, mesmo em pH em torno de 8,0, as concentrações de amônia livre ainda são baixas, porém em lixiviados de aterro sanitário, devido a elevada concentração de nitrogênio, valores de pH dessa ordem podem resultar em elevadas concentrações de amônia livre.

A partir do 98º dia (Fase II) de operação do reator foi necessária a adição de bicarbonato no afluente (reservatório) para a correção do pH, que se encontrava próximo a 5,0, atingindo valores em torno de 7,5 no 104º dia da Fase II. Nota-se a partir disso, que as concentrações de N-amoniacal no afluente decresceram. Nota-se que essas oscilações do pH provocaram instabilidade na nitrificação, não apenas produzindo acúmulo de nitrito, mas também reduzindo a atividade das bactérias oxidadoras de amônia, com conseqüente decréscimo na eficiência de remoção de N-amoniacal.

Com esses resultados é possível observar que é imprescindível a manutenção e controle do pH na etapa da nitrificação, mesmo em sistema de crescimento fixo como o reator de leito móvel. Ainda que o substrato utilizado nesse trabalho, tenha pH e alcalinidade elevados, a queda de pH é inevitável, pois é inerente ao processo de nitrificação. Para contornar esse problema, era adicionado bicarbonato de sódio no reservatório com o afluente sempre que a alcalinidade no efluente atingia valores inferiores a $300 \text{ CaCO}_3\text{L}^{-1}$.

Figura 5.9 – Variação das concentrações de nitrato do efluente da Fase I e II.



O balanço de nitrogênio do afluente e efluente do reator foi realizado levando-se em consideração a concentração desse elemento sob a forma de NKT do afluente e do efluente e de nitrito e nitrato no efluente. Teoricamente, todo nitrogênio sob a forma de N-amoniacal e sob a forma de nitrito, deve ser oxidado a nitrato. Entretanto é difícil esta estequiometria ser perfeita, mesmo porque o nitrogênio pode ser encontrado na forma de outros compostos nitrogenados que não foram quantificados, como por exemplo, os intermediários do processo de nitrificação, além do nitrogênio utilizado na síntese celular.

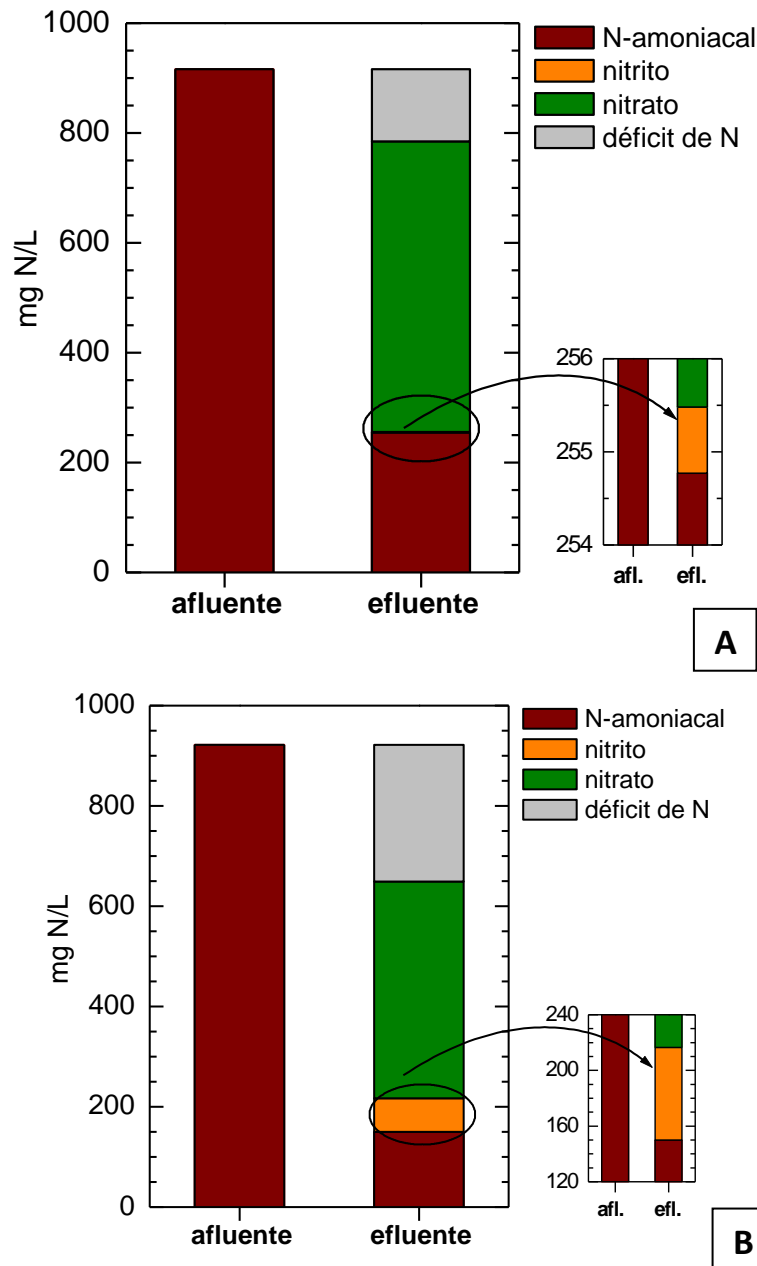
Pode-se observar pela Figura 5.10 (A), que a concentração de nitrogênio no afluente (considerando o NKT) foi em média de 916 mg N.L^{-1} enquanto a concentração de nitrogênio total no efluente ($\text{NKT}_{\text{efl}} + \text{N}_{\text{oxidado do efluente}}$) foi em média de 785 mg N.L^{-1} . Na Fase II como mostra a Figura 5.10 (B), a concentração de nitrogênio no afluente (como NKT) foi em média de 922 mg.L^{-1} , e a concentração de NKT_{efl} mais $\text{N}_{\text{oxidado}}$ do efluente foi de 649 mg.L^{-1} . Observa-se com esses resultados que 14,3% e 29,6% do nitrogênio afluente não foi quantificado no efluente sob a forma de NKT ou de $\text{N}_{\text{oxidado}}$.

No caso de microrganismos heterotróficos, em condições adequadas de crescimento, parte do nitrogênio removido está relacionada a síntese celular dos microrganismos heterotróficos em condições adequadas, embora em pequenas quantidades, cerca de 30% ou até menos (BASSIN, J.P., 2008).

Vale ressaltar, que a perda de nitrogênio sob a forma de amônia, por *stripping* neste estudo pode ser considerada desprezível, já que o pH do efluente não ultrapassou o valor de 8 e a área superficial de contato do reator com a atmosfera era pequena em relação ao seu volume.

Uma hipótese para a remoção de nitrogênio seria a ocorrência da nitrificação e desnitrificação simultânea no interior do biofilme, ainda que incipiente. Neste caso os dois processos nitrificação e desnitrificação podem ter ocorrido no mesmo reator e sob as mesmas condições de operação global, o que pode oferecer vantagens significantes sobre os sistemas convencionais cujos processos ocorrem separadamente. A explicação para o fenômeno da nitrificação e desnitrificação simultânea pode ser dividida em duas categorias: uma de natureza física e outra biológica. A de natureza física é a explicação convencional de que esse fenômeno ocorre como consequência dos gradientes de concentração de oxigênio dissolvido, dentro dos flocos ou biofilmes, causados pelas limitações difusionais de oxigênio (MÜNCH *et al.*, 1996).

Figura 5.10 – Balanço de nitrogênio no reator de leito móvel durante a Fase I (A) e II (B).



Na Tabela 5.9 é apresentado o resumo estatístico (média, desvio padrão, coeficiente de variação e valores máximo e mínimo e contagem das amostras) dos resultados obtidos referentes aos valores das análises dos sólidos em suspensão durante a Fase I e II, para o efluente.

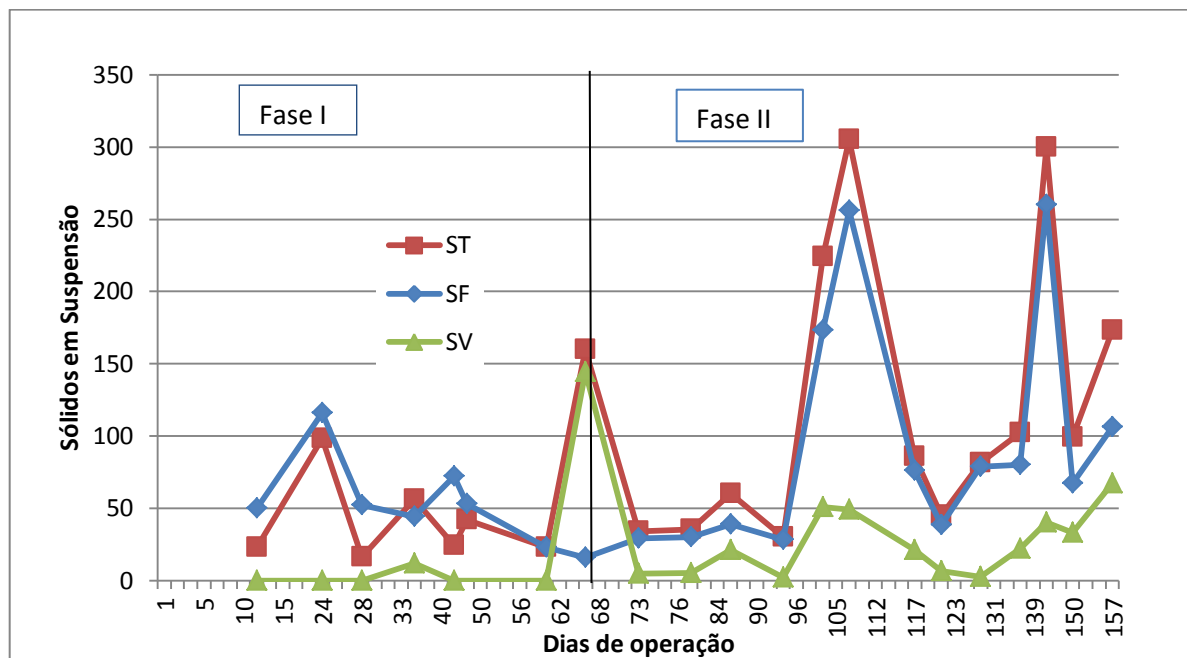
As análises de sólidos em suspensão totais, fixos e voláteis do afluente foram feitas no início de operação (Fase I) e constatou-se que o substrato utilizado apresentava 43,3, 25,5, 17,7 mg/L, respectivamente, de SST, SSV e SSF.

Tabela 5.9. Resumo estatístico das análises de sólidos em suspensão realizadas durante as Fases I e II.

	<i>Sólidos em Suspensão</i>					
	<i>Fase I</i>			<i>Fase II</i>		
	SST	SSF	SSV	SST	SSF	SSV
Média	50	50	-	121	97	-
Desvio padrão	61	30	80	98	81	21
Mínimo	16	15,7	0	30	28	2
Máximo	160	116	144,2	305	260	67
Contagem	8	8	3	13	13	13

Na Figura 5.11 verifica-se grande oscilação nos valores de sólidos no efluente, principalmente, nota-se alguns valores elevados de SSF. As concentrações de SSV foram baixas, porém com algumas oscilações que devem ser consequência do desprendimento e perda de biomassa.

Figura 5.11 – Variação dos sólidos em suspensão das amostras coletadas do efluente durante a Fase I e II.



5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O estudo microbiológico do sistema de leito móvel, tratando lixiviado de aterro sanitário consistiu em duas etapas: monitoramento das bactérias heterotróficas do meio líquido e do biofilme, realizadas pela técnica da contagem em placa, e a quantificação de

bactérias autotróficas e heterotróficas que realizam a remoção de nitrogênio, pela técnica de NMP. A quantificação das bactérias heterotróficas (método da contagem em placa) se distinguiu nas duas fases, sendo provenientes do meio líquido (Fase I e II), e das biomédias (Fase II).

A microbiota presente nas amostras utilizadas nas análises foi correlacionada com as condições de operação e parâmetros físico-químicos do sistema de leito móvel. Para melhor comparação dos resultados, as datas de coleta das amostras são apresentadas relacionadas ao tempo de operação do sistema nas Fases I e II.

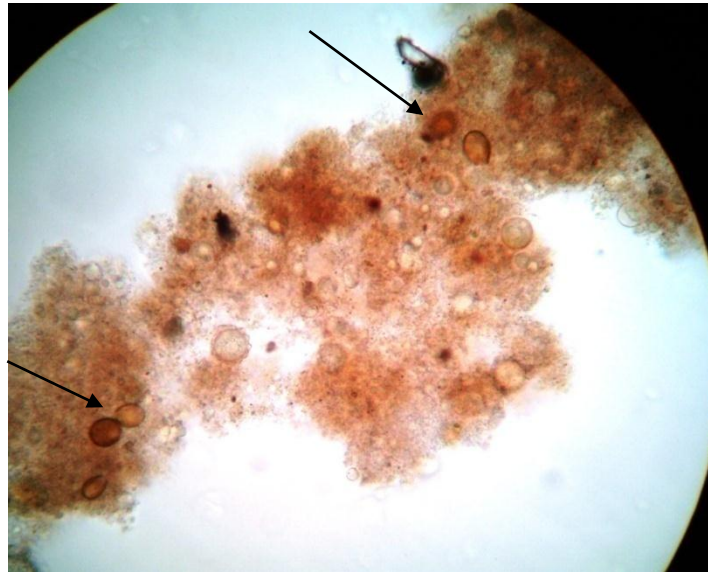
O monitoramento microbiológico por microscopia a fresco do meio líquido foi realizado semanalmente durante a operação da Fase I. Nesse período, foram observados poucos ciliados livres. Dentre os protozoários encontrados, a maioria foi *tecamebas*, como mostra a Figura 5.12. A presença de ciliados livres e *tecamebas* é um indicativo de boas condições de operação, para os nos sistemas de crescimento em suspensão como Lodo Ativado (JENKINS, *et al.*, 1993).

Confrontando as características microbiológicas do meio com os resultados das análises físico-químicas durante a Fase I, que apresentou alta eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal (nitrificação), pode-se dizer que as condições ambientais e operacionais do reator de leito móvel favoreceram o aparecimento destes microrganismos. *Tecamebas* (Protozoa, Amoebozoa, Rhizopoda) do gênero *Arcella sp* e *Euglypha sp* indicam boa qualidade do efluente em termos de nitrificação (MADONI, 1993² apud MENDONÇA, 2002).

Blazejewski, *et al.* (2009), operando um reator de leito móvel com aeração intermitente, tratando esgoto sanitário, observou que os protozoários e os rotíferos são muito mais abundantes no interior do biofilme do que nos flocos em suspensão no reator.

²MADONI, P. DAVOLI, D. CHIERICI, E. Comparative analysis of the Activated Sludge microfauna in Several Treatment Works. **Water Research**, 27(9), p. 1485-1491.

Figura 5.12. Microscopia a fresco de uma amostra coletada do meio líquido durante o monitoramento da Fase I (50X). As setas indicam os microrganismos “*tecamebas*” (Protozoa, Amoebozoa, Rhizopoda).



Para a quantificação dos microrganismos nitrificantes (autotróficos) e desnitrificantes (heterotróficos) foi realizada a técnica do NMP, como forma de estimar estes grupos de bactérias. No entanto, a técnica deve ser realizada com cuidado para que não se obtenha resultados subestimados. Estudos usando o método FISH revelam que geralmente as bactérias oxidadoras de amônia ocorrem em microcolônias formadas por milhares de células individuais. Estas colônias não podem ser facilmente dispersas, o que pode contribuir para a subestimação das BOA nas contagens utilizando o método NMP (BELSER *et al.* 1982).

O método NMP, apresenta duas vantagens, a primeira é ser um método em que se pode estimar a quantidade de bactérias presentes numa amostra, e a segunda, as bactérias podem ser isoladas a partir dos tubos com resultado positivo.

5.2.1 Resultado e Discussão da Técnica de Contagem em Placa

A Tabela 5.10 mostra a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias heterotróficas, durante a Fase I, no meio líquido pela técnica de contagem em placa. Nas Figuras 5.13 e 5.14 são apresentados exemplos de placas obtidas ao longo do trabalho. Pode-se observar que no início de operação até o 31º dia houve aumento de bactérias heterotróficas, indicando que este grupo foi se adaptando as condições presentes no reator. Observa-se na Figura 5.15 uma diminuição de UFC no 56º dia. Na Figura 5.11 nota-se que o

SSV no efluente aumentou a partir do 56º dia durante a Fase I. Supõe-se que as bactérias heterotróficas podem ter sido arrastadas do reator.

Vale ressaltar que em algumas imagens das placas percebe-se a presença de fungos, porém estes não foram contados durante o método de contagem em placa.

Tabela 5.10 Quantidade de Unidades Formadoras de colônias de bactérias heterotróficas realizadas durante o monitoramento da Fase I.

<i>Bactérias heterotróficas – Fase I</i>	
<i>Dias</i>	<i>Quantidade (UFC/mL)</i>
15º dia	$8,1 \times 10^{13}$
31º dia	$1,9 \times 10^{14}$
56º dia	$3,10 \times 10^{10}$

Figura 5.13. Placas de contagem com amostras diluídas à 10^{-10} do 15º dia e 10^{-5} do 31º dia de operação da Fase 1.

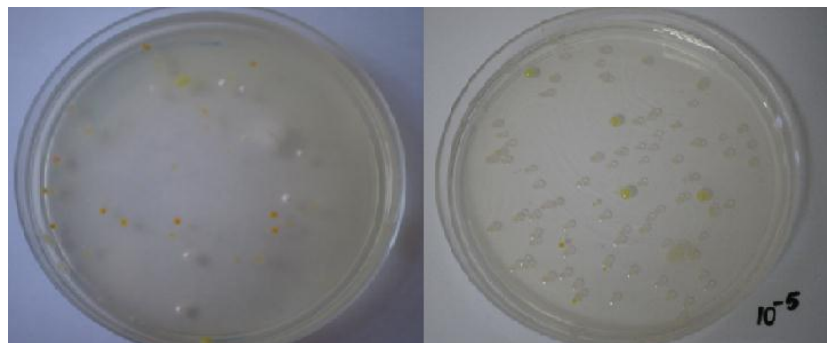
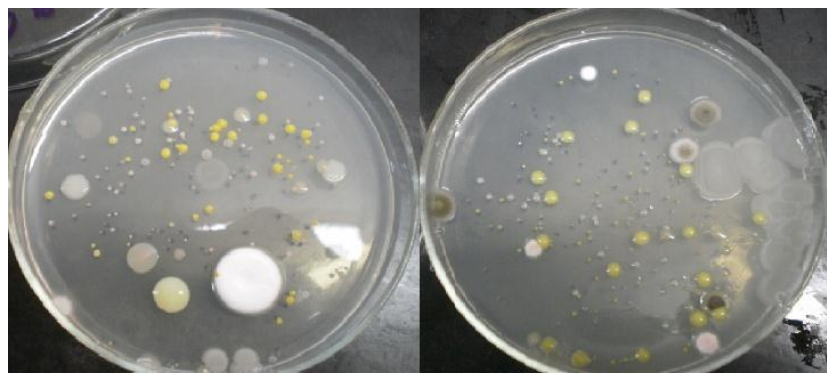
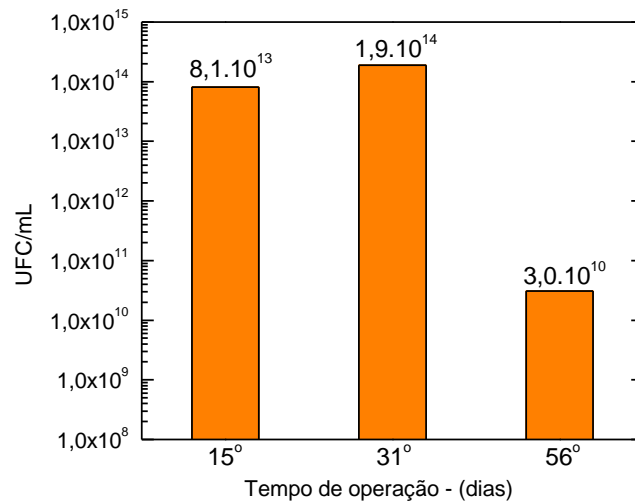


Figura 5.14. Placas de contagem com amostras diluídas à 10^{-6} das biomédias e 10^{-6} do meio líquido coletadas no 59º dia de operação da Fase II.



A estimativa de bactérias do 56º dia foi ainda maior do que verificada por MANGILI *et al.*, (2011) que quantificou $2,4 \times 10^6$ UFC/mL pela mesma técnica (em meio nutriente PCA), usando amostra de um sistema de lodo ativado, em operação a quatro meses, tratando lixiviado de aterro de resíduos sólidos.

Figura 5.15 Contagem de bactérias heterotróficas durante a operação da Fase I.



Pode-se observar na Tabela 5.11 os resultados da quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das bactérias heterotróficas durante o monitoramento da Fase II. Observa-se que houve um aumento significativo do final da Fase I para o início da Fase II. Observa-se que houve um aumento significativo do final da Fase I para o início da Fase II. A diminuição ocorrida ao final da Fase I foi possivelmente devido ao desprendimento do biofilme do suporte. O que pode ter causado um aumento na estimativa de heterotróficas no meio líquido, verificados no 75º dia. Em seguida, observou-se aumento também na quantificação do material suporte, o que pode ser devido ao crescimento e aderência de novas células de bactérias heterotróficas nos biofilmes, isso pode ser observado nas contagens seguintes, principalmente nas contagens das UFC das biomédias. No entanto, essa hipótese não pode ser comprovada, uma vez que na Fase I não foi realizada a quantificação das UFC das bactérias heterotróficas do material suporte.

Tabela 5.11 Unidades Formadoras de colônias de bactérias heterotróficas realizadas durante o monitoramento da Fase II.

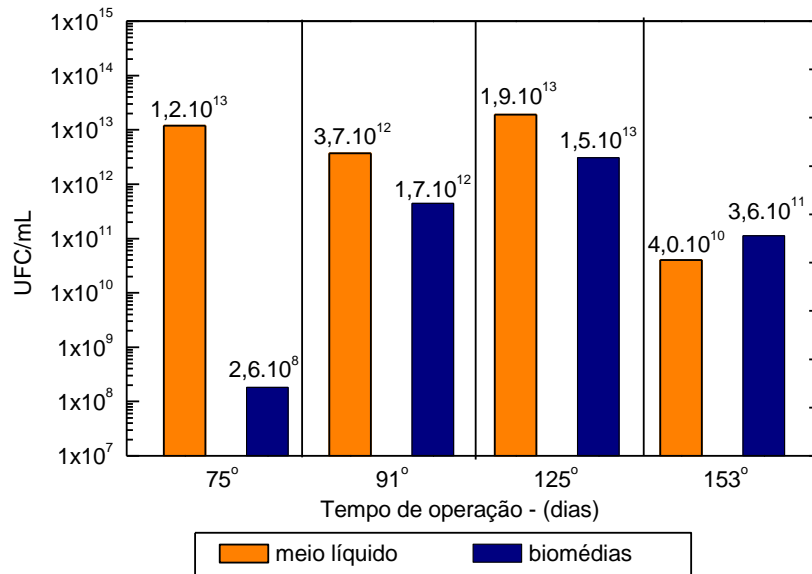
Dias de operação	Heterotróficas	
	Líquido	Biomédias
75º dia	$1,2 \times 10^{13}$	$2,6 \times 10^8$
91º dia	$3,7 \times 10^{12}$	$1,7 \times 10^{12}$
125º dia	$1,9 \times 10^{13}$	$1,5 \times 10^{13}$
153º dia	$4,0 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{11}$

Eduardo (2007), avaliou as características microbiológicas e físico-químicas do lixiviado no processo de tratamento do Aterro Metropolitano de Gramacho (RJ), e por meio da técnica de contagem em placa (utilizando meio PCA) constatou que as amostras das lagoas de aeração continham uma variação de $2,6 \times 10^3$ à $5,3 \times 10^6$ UFC/mL de bactérias heterotróficas e $1,2 \times 10^3$ à $5,3 \times 10^5$ UFC/mL de bactérias heterotróficas no lixiviado tratado.

Bassin (2012) operou três reatores de leito móvel, com objetivo de verificar o efeito de diferentes condições operacionais no desenvolvimento de biofilme e na nitrificação. No MBBR1 (0mg/L de DQO, 90-100 – N-NH₄ e TDH de 48h), foi necessário um período de dois meses para estabelecer um biofilme espesso. No MBBR2 (100-200 N-NH₄ e TDH de 24h), o autor adotou uma baixa carga orgânica (1,93g DQO/m².dia) resultando em um biofilme espesso em 1 mês. Os dois MBBRs foram operados em regime contínuo. No SBBR, em batelada sequencial (150 – 200 N-NH₄ e TDH=48 à 56h), com a mesma carga orgânica do MBBR2, desenvolveu-se um biofilme espesso em cerca de vinte dias.

A última coleta, efetuada no 153º dia, apresentou menor número de UFC comparada aos anteriores. Nesse período houve um acentuado aumento de sólidos voláteis no efluente, como pode ser observado na Figura 5.11.

Figura 5.16 Unidades Formadoras de colônias de bactérias heterotróficas realizadas durante o monitoramento da Fase II.



Portanto, a estimativa de bactérias heterotróficas encontradas tanto na Fase I como na Fase II, mostrou que o sistema de leito móvel propiciou o crescimento e manutenção deste grupo de bactérias, mesmo que o substrato não apresente fração significativa de compostos facilmente biodegradáveis.

Bassin, *et al.*, (2012), operando um reator de leito móvel com objetivo de analisar os efeitos de diferentes condições operacionais na distribuição de heterotróficas e nitrificantes, perceberam que, mesmo quando não era oferecida fonte de carbono orgânico, as bactérias heterotróficas foram dominante. O crescimento destas foi atribuído a liberação de produtos microbianos solúveis pelas autotróficas.

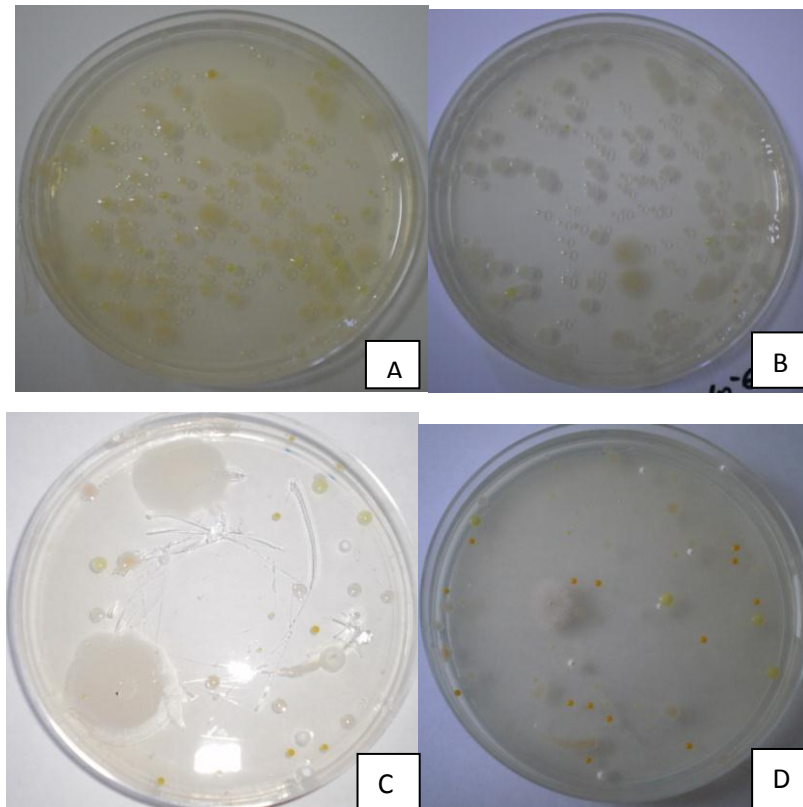
5.2.2 Resultados das Bactérias Heterotróficas Seleccionadas

Foram feitas as contagens das colônias heterotróficas das placas, e em seguida foram selecionadas colônias que se diferenciavam, levando em consideração a coloração e a estrutura das colônias. A seleção foi realizada do mesmo modo para todas as coletas das Fases I e II. Como mostrado no tópico 5.2.1, houve três coletas na Fase I, 15°, 31° e 56° dia de operação do reator, enquanto na segunda fase foram feitas quatro coletas, 75°, 91°, 125 e 153° dia de operação, tanto do meio líquido como do material suporte.

Figura 5.17, as imagens das placas das diluições efetuadas pela técnica de Contagem em Placa, da primeira (15° dia de operação) e segunda (31° dia) coleta do meio líquido durante a Fase I.

Foram selecionadas apenas colônias de bactérias heterotróficas diferenciadas pela análise das características culturais (colônias), como coloração e estrutura. Foi possível observar que na primeira coleta, houve pouca diversidade de colônias, praticamente as mesmas colônias de bactérias foram encontradas nas dez diluições (10^{-1} à 10^{-10}), como é mostrado na Figura 5.17 (A e B), as diluições 10^{-4} e 10^{-10} (Fig 5.17 – C e D), aonde apareceram quatro diferentes colônias em ambas as placas. Esse resultado mostra que as amostras coletadas eram representativas do que podia ser cultivado no reator de leito móvel.

Figura 5.17 Placas da técnica de Contagem do **15º dia** da Fase I. c) diluição de 10^{-6} ; d) diluição de 10^{-8} . Placas do **31º dia** da Fase I. a) diluição de 10^{-6} ; b) diluição de 10^{-8} .



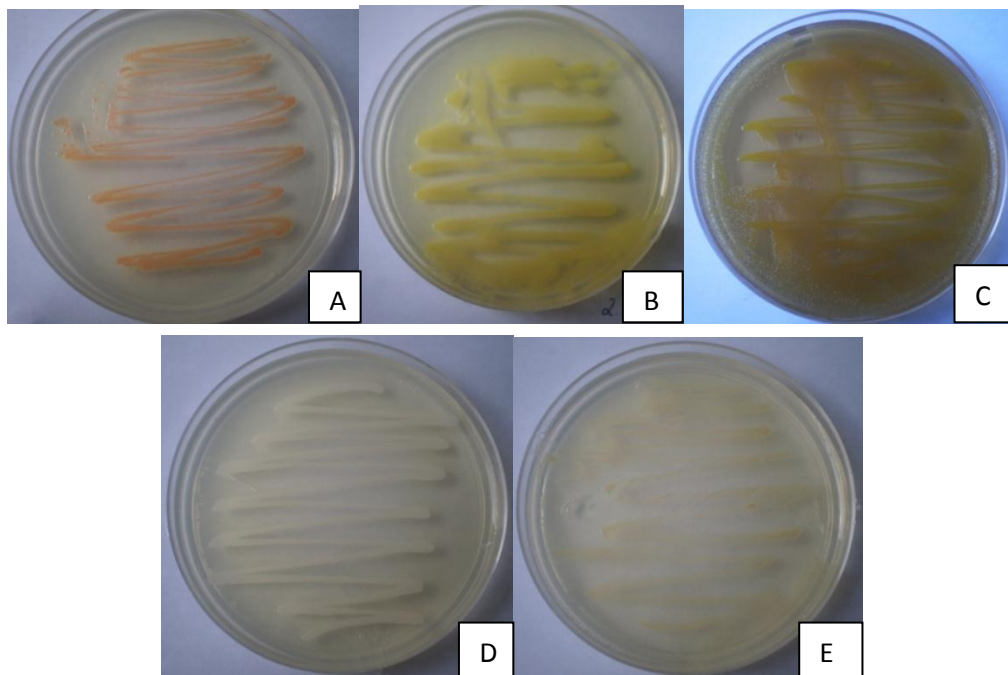
No 31º dia, segunda coleta do meio líquido, houve o aparecimento de colônias de bactérias diferentes daquelas da amostra coletada no 15º dia, mais precisamente nas diluições 10^{-6} e 10^{-8} como é mostrado na Figura 5.17 (A e B). Enquanto que nas outras diluições, continuou-se a observar colônias semelhantes as da primeira coleta (15º dia). Observando a Tabela 5.11, nota-se que a segunda coleta apresentou maior número de bactérias heterotróficas, com $1,9 \times 10^{14}$ UFC/ml e a primeira, com $8,1 \times 10^{13}$ UFC/ml, possivelmente

devido ao aumento da diversidade das colônias de bactérias no meio líquido e visualizadas nas placas de contagem ou então aumento do crescimento de uma determinada bactéria.

Pode-se observar que no 15º dia, as placas de contagem apresentaram maior número de colônias de bactérias da coloração branca opaca, acontecendo o mesmo com as colônias de cor laranja, dentre outras colorações. Visualmente pode-se considerar que estas placas apresentaram um número inferior de colônias amarelas. Ao contrário do que ocorreu nas placas de contagem do 31º dia, onde foi observado maior número de colônias das cores amarelas seguida das brancas opacas e, então, em menor número das colônias de coloração laranja.

Na Figura 5.18 podem ser observadas o crescimento das diferentes colônias selecionadas das placas de contagem do 15º dia da Fase I. As diferenças estão tanto nas colorações como na estrutura dos organismos selecionados.

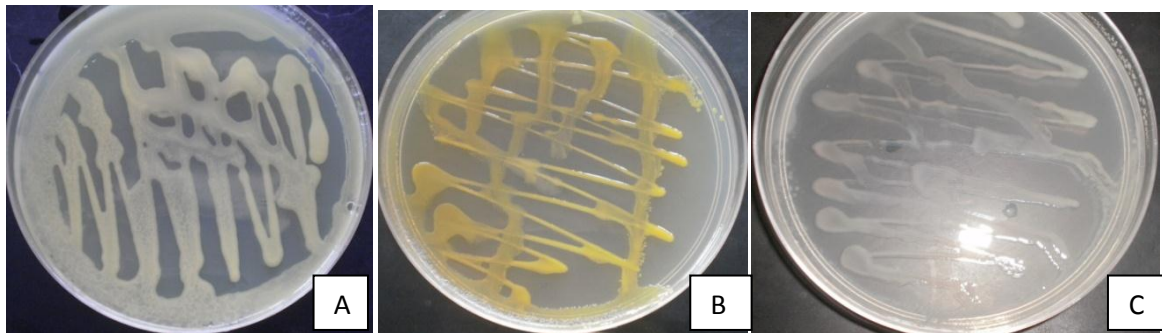
Figura 5.18 Placas de crescimento de culturas referentes às placas de contagem do 15º dia da Fase I.



Observa-se na Figura 5.19, que na segunda coleta, do 31º dia, os organismos da imagem C são semelhante aos da Figura 5.18 D. Entretanto o número de colônias encontradas nas placas de contagem da segunda coleta (31º dia) foi superior ao da primeira (15º dia). Possivelmente, o maior o tempo de operação do sistema favoreceu a adaptação dos organismos as características hidrodinâmica do reator e ao substrato.

Na segunda coleta, houve o aparecimento de três agrupamento de bactérias distintas em relação as da primeira, como pode ser observada na Figura 5.19, que apresentam colorações rosa clara, amarela e branca opaco. Na terceira coleta, entretanto, não foi visualizado o aparecimento de colônias diferenciadas das demais coletas.

Figura 5.19 Placas de crescimento de culturas referentes às placas de contagem do 31º dia da Fase I.



Observando as Figuras 5.18, 5.19 e 5.20, é possível verificar que os organismos selecionados são semelhantes nas três coletas da Fase I. O grupamento de organismos de coloração amarelada está presente nas três coletas, esse fato também ocorre com as selecionadas de cor branca opaca (Figura 5.18 – D, Figura 5.19 – C, Figura 5.20 – C). Estes agrupamentos que apareceram nas três coletas indicam adaptação destas às condições do meio (reator e substrato).

Figura 5.20 Placas de isolamento de culturas referentes às placas de contagem do 56º dia da Fase I.



Observaram-se as morfologias das colônias selecionadas em placa de Petri por microscopia óptica após a coloração pela técnica de Gram. As placas das colônias de cor

amarela apresentaram morfologia de bacilos e foram identificadas como Gram-positivas. As bactérias selecionadas semelhantes que apareceram nas três coletas, de cor branca opaca mais espessa (Figura 5.18 – D, Figura 5.19 – C e D; Figura 5.20 – C), apresentaram morfologia de cocos e foram identificadas como Gram-positivas. Porém na Fase I houve apenas uma placa com bactérias tanto gram-negativas como positivas, supostamente devido à mistura de culturas (Figura 5.18 D).

As outras placas restantes, também foram identificadas como Gram-positivas, e sua maioria, em formato de bacilos (Figura 5.18- A, B, C; Figura 5.20 B) e o restante em cocos (Figura 5.18- E; Figura 5.20- A, C).

- FASE II

Observam-se nas Figuras 5.21 a 5.23 as imagens das diluições efetuadas pela técnica de Contagem em placa, da quarta (75º dia de operação), sexta (125º dia) e sétima (153º dia) coleta do meio líquido durante a Fase II. Como na primeira fase, foram selecionadas apenas bactérias heterotróficas “selecionadas” levando em consideração as colorações. Foi possível observar que na quarta coleta, houve pouca diversidade de agrupamentos, como é mostrado na Figura 5.21, nas diluições 10^{-1} , 10^{-6} , 10^{-9} . Além disso, nas diluições restantes houve o aparecimento de agrupamentos semelhantes aos encontrados durante a Fase I, porém em menor número, como é o exemplo dos organismos selecionados de coloração rosa clara, mostrados na Figura 5.22.

Da quarta para quinta coleta, houve um aumento do número dos diferentes agrupamentos que já haviam sido visualizadas na primeira coleta da Fase I, como é o caso das selecionadas de coloração branca opaca e as amarelas. Observa-se que as selecionadas de coloração amarela e branco opacas apareceram em todas as diluições, desde a quarta até a última coleta, como mostrado nas Figuras 5.21, 5.22 e 5.23.

Figura 5.21. Placas da técnica de Contagem em placa do 75º dia do meio líquido durante a Fase II. A) diluição de 10^{-1} ; B) diluição de 10^{-6} , C) diluição de 10^{-9} .

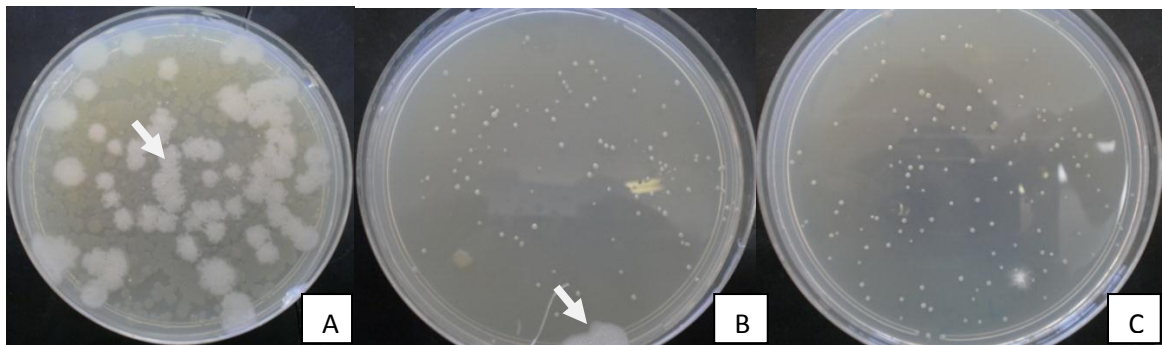


Figura 5.22. Placas da técnica de Contagem em placa do 125º dia do meio líquido durante a Fase II. A) diluição de 10^{-1} ; B) diluição de 10^{-3} , C) diluição de 10^{-6} .

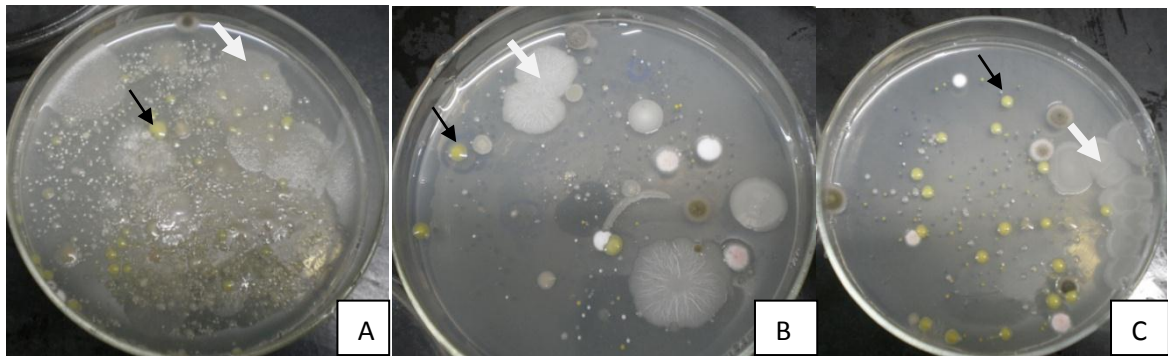
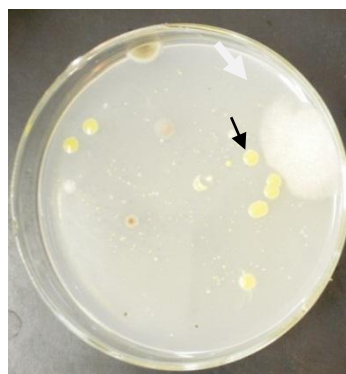


Figura 5.23. Placas da técnica de Contagem em placa do 153º dia do meio líquido durante a Fase II. A) diluição de 10^{-10} .



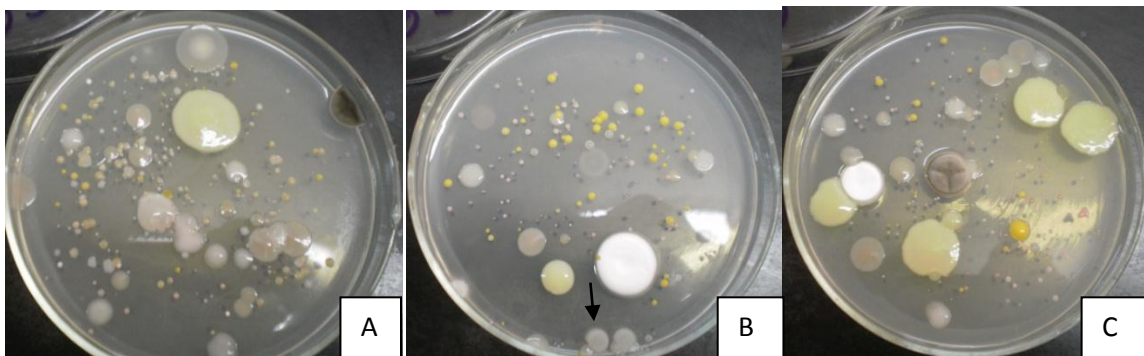
Os agrupamentos de bactérias de coloração branca opaca e amarelas apareceram também nas placas de contagem das biomédias no 153º dia, como é mostrado na Figura 5.23 e 5.24, entretanto é observado que a diversidade de bactérias selecionadas retiradas do meio

líquido é visualmente maior comparado a do material suporte, porém a diversidade de outros organismos no material suporte é maior.

A biodiversidade de bactérias heterotróficas encontradas aderidas no material suporte indica que estes grupos estão sendo desenvolvidos em maior número no meio líquido, e que apresentam maiores velocidades específicas de crescimento, pois segundo Zafarzadeh, *et al.* (2010), o biofilme formado nos materiais suportes dependerá diretamente dos microrganismos que estão se desenvolvendo em suspensão no meio líquido. Se a taxa de crescimento de um determinado grupo de bactérias em suspensão é maior do que a taxa de crescimento de outro grupo, então, estas bactérias serão preferencialmente aderidas em um biofilme.

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

Figura 5.24. Placas da técnica de Contagem em placa do 153º dia do meio suporte durante a Fase II. A) diluição de 10^{-3} , B) diluição de 10^{-6} , C) diluição de 10^{-10} .



A quarta coleta (75º dia) e a sexta (125º dia) do meio líquido, apresentaram o maior número UFC/mL (10^{13}) comparadas com as da quinta, 91º dia (10^{12}), e da sétima, 153º dia (10^{10}).

As coletas do material suporte apresentaram maior número de bactérias somente no 125º dia (10^{13}), pois nas coletas dos demais dias, 75º, 91º e 153º dias, quantificou-se respectivamente 10^8 , 10^{12} e 10^{11} UFC/mL. Nota-se com essas informações, que no 125º dia de operação, as amostras apresentaram maior número de colônias de heterotróficas tanto no meio

líquido quanto nos materiais suportes, período este que se iniciou o acúmulo de nitrito no reator. Esse aumento de bactérias heterotróficas pode competir com a população de bactérias nitrificantes, no meio líquido e no biofilme do material suporte, dificultando o processo de nitrificação.

Observam-se na Figura 5.25 as placas das diferentes agrupamentos de bactérias encontradas nas diluições da contagem em placa retiradas do meio líquido. Houve um aumento na diversidade de selecionadas.

A partir da sexta coleta (125º dia) houve uma maior variação de diversidade de agrupamento de bactérias, período este em que houve o decréscimo do pH no meio líquido, que conseqüentemente causou a inibição de bactérias oxidadoras de nitrito, como discutido anteriormente nos resultados físico-químicos.

Figura 5.25 Placas das culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio líquido do 75º dia da Fase II.

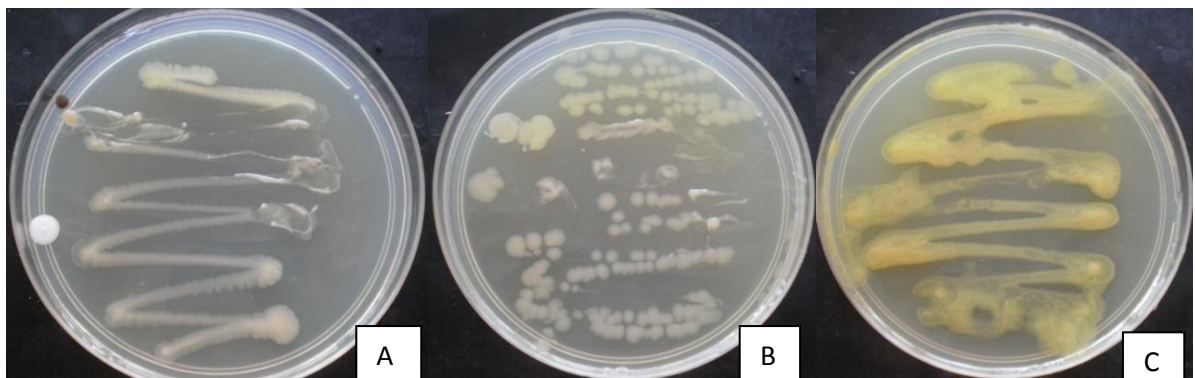


Figura 5.26 Placas de culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio líquido do 91º dia da Fase II.

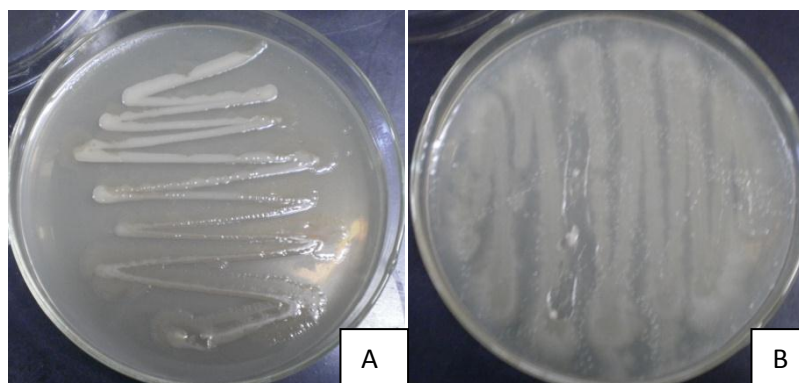
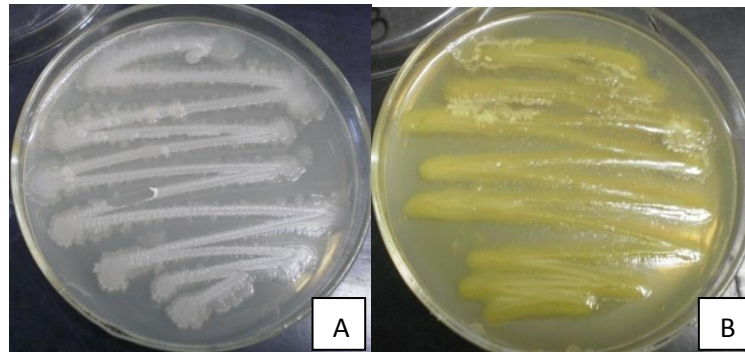


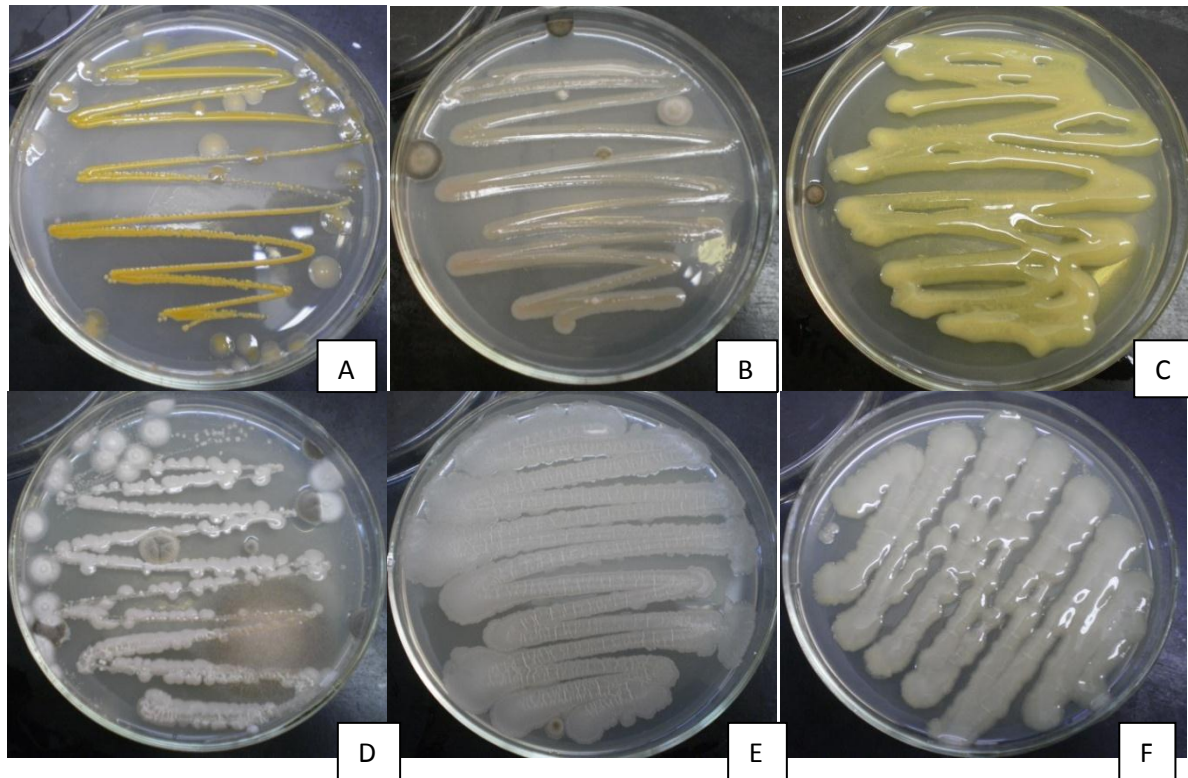
Figura 5.27 Placas de culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio suporte do 91º dia da Fase II.



Pelo teste de coloração de Gram, constatou-se que as bactérias que formam colônias de coloração branca opaca, visualizadas nas Figuras 5.26 (A) e 5.29 (E), foram identificadas como Gram-positivas em formato de bacilos.

Na segunda fase houve aparecimento de Gram negativas em formato de bacilos, e as selecionadas tem coloração branca opaca, que podem ser observadas nas Figuras, 5.26 (B), 5.27 (A), 5.28 (F), 5.30 (B). Pode-se então observar que houve um aumento na diversidade de bactérias Gram-negativas em comparação com a primeira fase, além disso, observou-se que estas bactérias estavam presentes em todas as coletas da Fase II tanto no meio líquido como no meio suporte. Estas bactérias têm características semelhantes com as bactérias nitrificantes (Gram-negativa e em formato de bacilos).

Figura 5.28 Placas de culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio líquido do 125º dia da Fase II.



Os agrupamentos de bactérias de coloração amarelada, como pode-se observar nas Figuras 5.25 (C) e 5.29 (A) dos 75º dia e 125º dia, continuaram a aparecer na Fase II, entretanto foram identificadas como Gram positivas em formato de bacilos. Porém na coleta do meio suporte do 91º dia (Figura 5.27 – B) foram identificadas como Gram negativa em formato em bacilos.

Os agrupamentos de bactérias de coloração rosa clara foram identificadas como Gram positiva com formato em bacilos, e estas foram encontradas nos dias: 75º (meio líquido); 125º (líquido e material suporte), 153º dia (líquido), como podem ser visualizadas nas Figuras 5.28 (B), 5.29 (E). Observa-se que estas bactérias selecionadas foram encontradas em pouca quantidade nas placas de contagem desde a Fase I.

Na Fase II, houve aparecimento de dois agrupamentos de bactérias distintos, comparadas as observadas na Fase I. Um agrupamento coloração rosa clara e identificada como Gram negativa em formato de bacilos foi encontrada no 75º dia no meio líquido, como mostra a Figura 5.25 (A) e a segunda, Gram negativa foi encontrada também no meio líquido, entretanto apresentava formato de cocos e coloração branca, como pode ser observada na Figura 5.28 (E).

A placa com bactéria de coloração laranjada que apareceu na Fase I, foi encontrada no 125º dia (líquido e meio suporte), e 153º dia (líquido), período este que houve acúmulo de nitrito, devido à queda de pH no meio líquido. Esta foi identificada como Gram positiva em formado de bacilos, sendo observada nas Figuras 5.28 (A), 5.29 (C), 5.30 (A).

Figura 5.29 Placas de isolamento de culturas referentes às placas de contagem do meio suporte do 125º dia da Fase II.

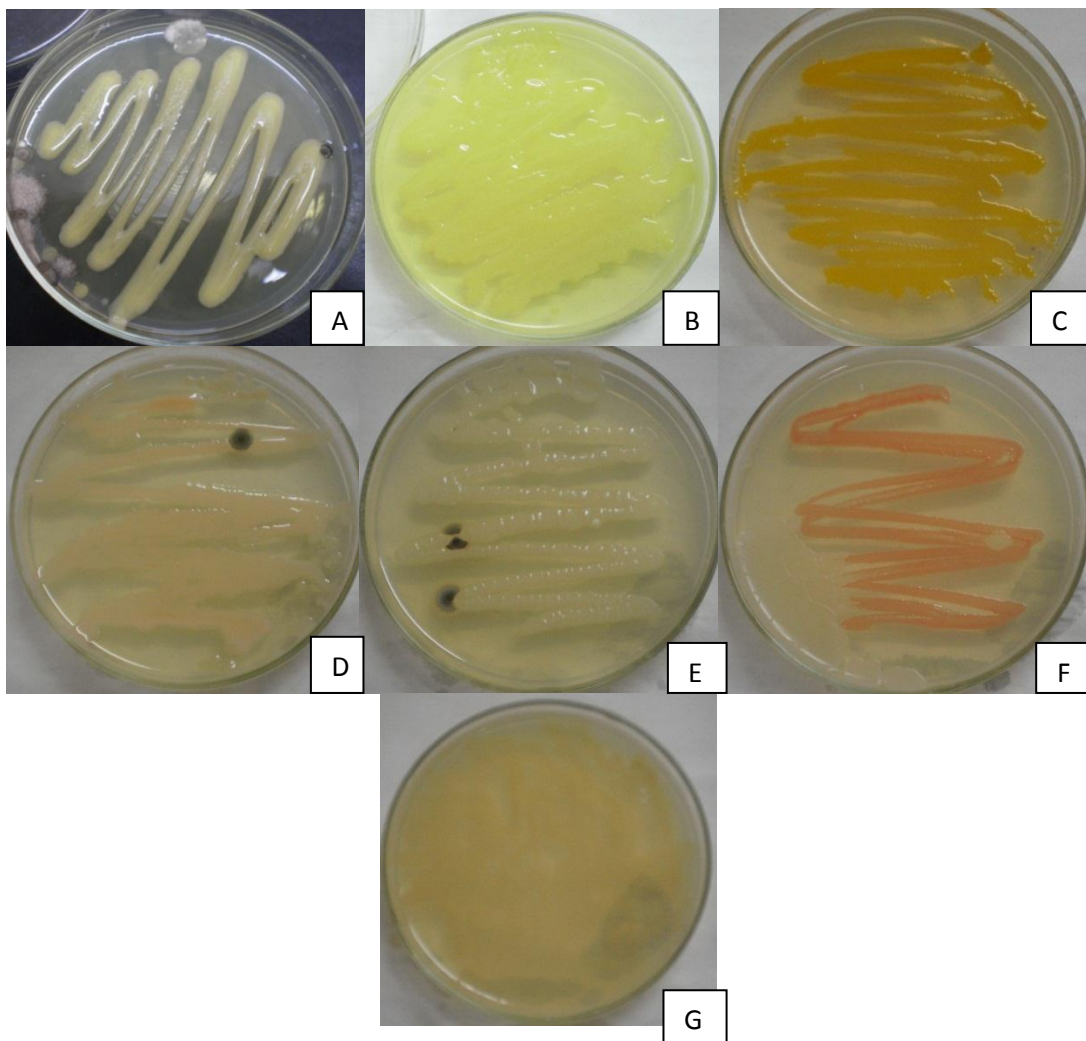
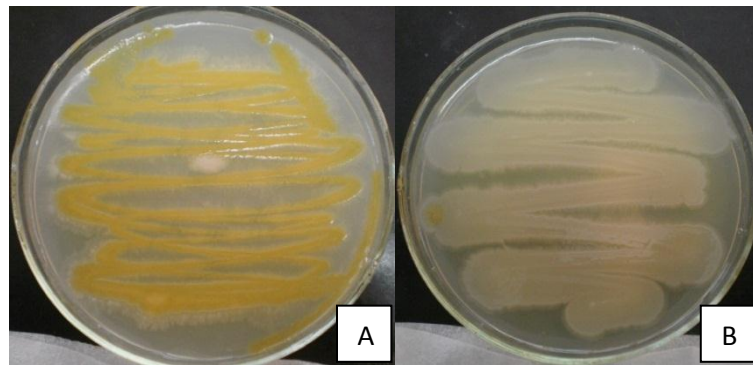


Figura 5.30 Placas de culturas selecionadas referentes às placas de contagem do meio líquido do 153º dia da Fase II.



A partir dessas informações coletadas durante a Fase I e II, pode-se observar que houve maior diversidade de colônias de bactérias heterotróficas e maior estimativa destas na Fase II (tanto no material suporte como no líquido). Durante a Fase II foi feita a recirculação do efluente nitrificado para a entrada do reator, além disso nesse período ocorreu acúmulo de nitrito no reator.

5.2.3 Resultados e Discussão da Técnica da NMP

Foi realizada a quantificação dos microrganismos nitrificantes e desnitrificantes pela técnica do NMP no início e final da Fase I. A Tabela 5.12 mostra o resultado da quantificação das bactérias encontradas na primeira e segunda análise de NMP. Nota-se que os resultados das quantificações das bactérias oxidadoras de amônia e das desnitrificantes para a coleta do 5º dia não foram incluídos.

Tabela 5.12. Número mais provável de bactérias nitrificantes (BOA e BON) e desnitrificantes no início (5º dia) e 38º dia de operação, coleta do meio líquido durante o monitoramento da Fase I.

NMP - FASE I (NMP/100mL)			
	BOA	BON	DESNITRIFICANTES
5º	*	$2,7 \times 10^5$	*
38º	$1,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^{11}$

Na Fase I, a quantificação das bactérias oxidadoras de nitrito foi maior no 38º dia, o que pode ser devido as condições ambientais e operacionais do reator que foram favoráveis

para o desenvolvimento das BON. No período em que foi feito o NMP, o pH do meio líquido estava na faixa de 6,0, com eficiência de 90% de remoção de nitrogênio amoniacal, como pode ser observado na Figura 5.7. Estes resultados comprovam que o aumento das bactérias oxidadoras de nitrito no meio líquido do reator foi devido à oxidação das altas concentrações de nitrito presentes no meio.

Com o decréscimo das concentrações de nitrito (a partir do 10º dia da Fase I) e, conseqüentemente, aumento das concentrações de nitrato, Figura 5.8, verificou-se também o aumento do NMP de bactérias oxidadoras de nitrito (10^6 à 10^7), conforme mostrado na Figura 5.31, resultados que podem confirmar a elevada atividade das oxidadoras de nitrito. No processo de nitrificação, em torno de 80% da energia obtida da oxidação dos compostos inorgânicos é usada na fixação do CO_2 , e para cada átomo de carbono fixado são necessários 35 moles de N-amoniacal ou 100 moles de nitrito (SINHA & ANNACHHATRE, 2007).

Durante o período de monitoramento microbiológico da Fase II, a estimativa de bactérias nitrificantes e desnitrificantes apresentou variações significativas conforme pode ser observado na Tabela 5.13.

Figura 5.31 Número mais provável de bactérias nitrificantes e desnitrificantes realizados no início e fim de operação da Fase I.

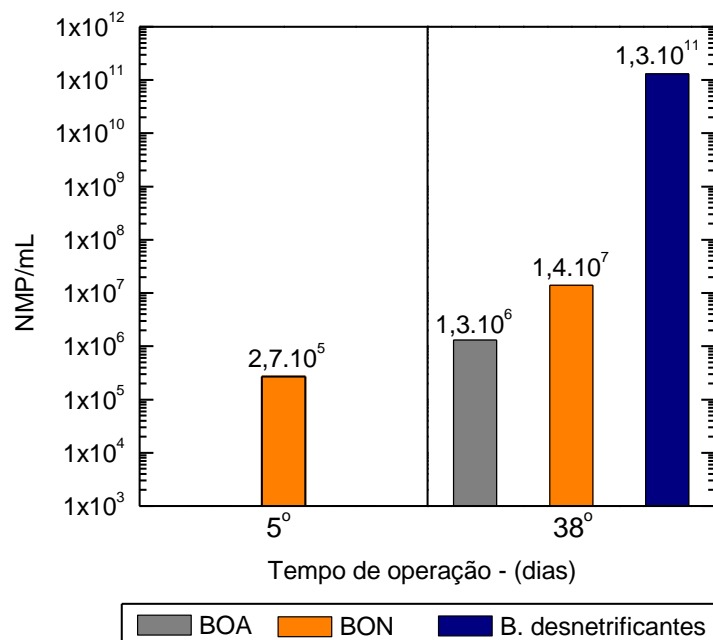


Tabela 5.13. Número mais provável de bactérias nitrificantes (BOA e BON) e desnitrificantes no início (74º dia), meio (125º dia) e final (153º dia) de operação, realizados durante o monitoramento da Fase II.

NMP - FASE II						
Dias de operação	BOA		BON		DESNITRIFICANTES	
	Líquido	Biomédias	Líquido	Biomédias	Líquido	Biomédias
74º dia	$3,2 \times 10^6$	$4,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{11}$	$6,6 \times 10^7$
125º dia	$1,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	36×10^1	$9,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^{11}$
153º dia	$2,4 \times 10^7$	$5,6 \times 10^8$	*	$1,0 \times 10^6$	*	$4,2 \times 10^{11}$

Observa-se na Tabela 5.13 que as estimativas de NMP entre as amostras coletadas do meio líquido e das biomédias tiveram variações durante o monitoramento da Fase II. A maior estimativa de BOA nas biomédias foi no 74º e 153º dia. No caso das estimativas das BON observou-se maior número no meio líquido em relação a quantificação no meio suporte, obtendo-se valores maiores do que nas biomédias para 74º dia e 125º dia de operação.

É possível observar nas Tabelas 5.12 e 5.13, que no NMP do meio líquido, realizado nos 38º dias, Fase I, e no 74º dia, Fase II, a estimativa de BOA, BON e desnitrificantes permaneceram praticamente no mesmo valor. Observa-se que durante esse período não houve mudanças nas condições ambientais do sistema monitoradas pelos parâmetros físico-químicos. É provável que isso tenha influenciado na manutenção estável das bactérias envolvidas tanto na nitrificação como na desnitrificação. Na Fase II houve variações das estimativas entre as BOA, de 10^6 à 10^8 para as análises de NMP no meio líquido e 10^5 à 10^8 para às biomédias.

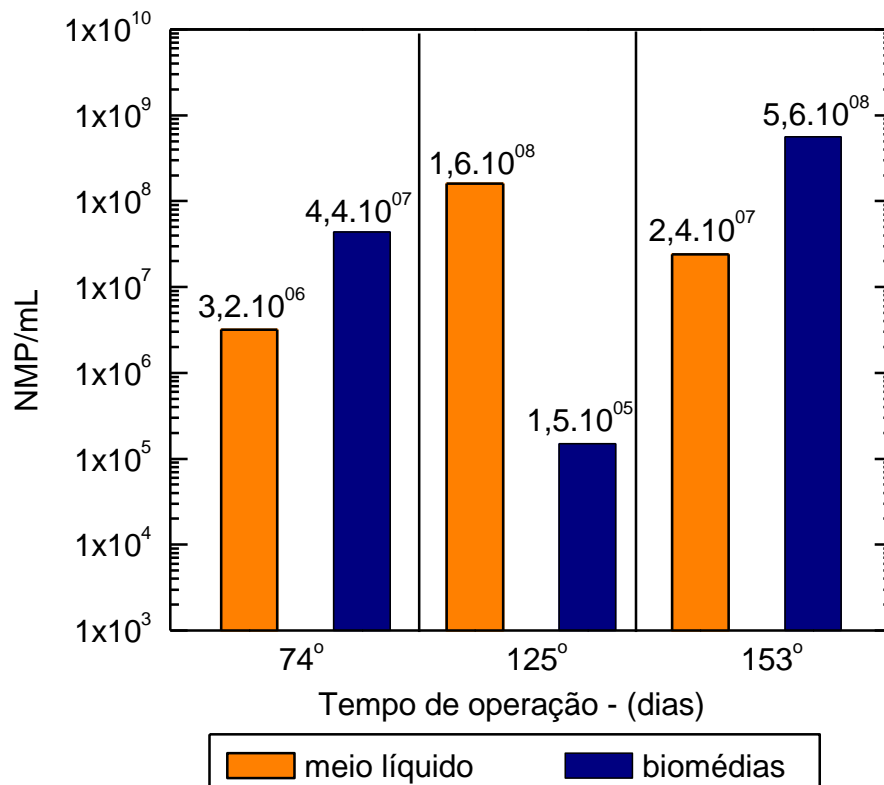
Observa-se na Figura 5.32, que a estimativa de BOA durante o monitoramento da Fase II apresentou variações significativas, tendo um valor máximo no $1,6 \times 10^8$ no 59º dia para a análise do meio líquido e $5,6 \times 10^8$ no 153º dia para as biomédias.

Comparando os resultados estimados das bactérias oxidadoras de amônia com os resultados encontrados de SSV do efluente, onde houve aumento de sólidos fixos e totais, durante a Fase II, como é observado na Figura 5.11, durante os dias 105 à 117º dia, e novamente entre os dias 133º à 145º dia. Entretanto as coletas para o NMP foram aos dias em que os sólidos em suspensão voláteis no efluente apresentaram valores baixos, ($4,7 \text{ mg.L}^{-1}$ no 74º dia, $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no 125º dia e 33 mg.L^{-1} no 154º dia). É observado ainda que no 125º dia de operação a estimativa de BOA nas biomédias foi menor ($1,5 \times 10^5$) do que no meio líquido ($1,6 \times 10^8$) e também é inferior ao comparado à estimativa realizada nas biomédias antes do aumento de SSV, no 153º dia ($4,4 \times 10^7$). Este resultado mostra que possivelmente houve

desprendimento natural e/ou acidental das bactérias durante os períodos em que houve maior SSV no efluente, entretanto nas análises de NMP, por ter apresentado estimativas elevadas de microrganismos, supõe-se que houve aderência de novas células nas biomédias nos dias consecutivos, e este fato não influenciou negativamente a eficiência de nitrificação, observada da Figura 5.6.

Observa-se ainda, que a estimativa das bactérias oxidadoras de amônia no 125º dia foi menor nas biomédias, período em que se iniciou um acúmulo de nitrito. Portanto, o valor inferior encontrado no NMP pode indicar deficiência na oxidação de amônia a nitrito. O acúmulo de nitrito durante essa fase foi até o 143º dia, e a terceira coleta foi realizada quando o reator apresentava alta eficiência de oxidação do nitrito, cujo valor de nitrato foi de 454,2 mg, portanto houve um aumento do NMP das BOA (nas biomédias e meio líquido) devido à alta oxidação de amônia à nitrito.

Figura 5.32 Número mais provável de bactérias oxidadoras de amônia realizado no início, meio e fim da operação da Fase II



Observa-se na Tabela 5.13, que o NMP das BON do meio líquido, realizado no 38º dia da Fase I (10^7) para o 74º dia da Fase II (10^7) permaneceu da mesma ordem de grandeza. Vale ressaltar que, apesar do início da recirculação do efluente nitrificado, durante esse período não houve mudanças significativas nos resultados das análises físico-químicas, portanto

possivelmente não houve mudanças na microbiota do líquido. Como não foram feitas determinações de NMP das biomédias na Fase I não foi possível fazer a comparação da evolução destas da Fase I para a Fase II.

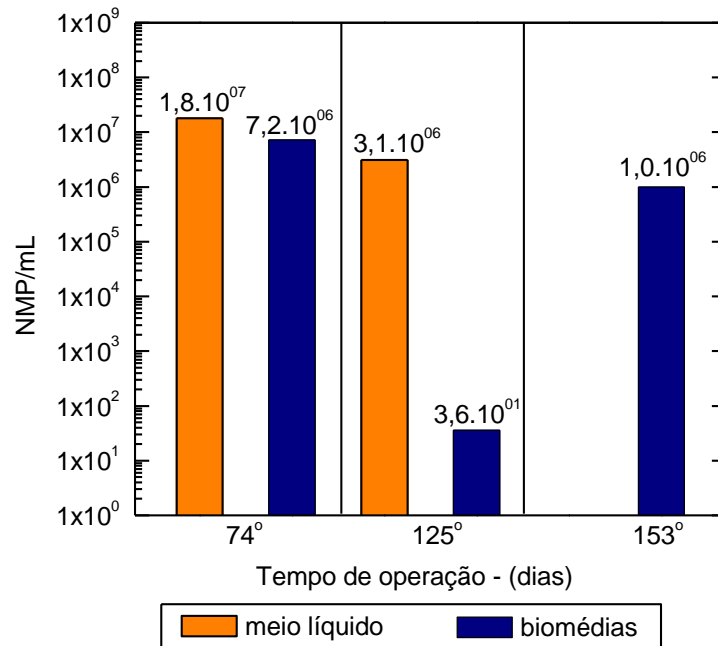
Observa-se, na Figura 5.7, que a partir do 111º dia, Fase II, teve início o aumento das concentrações de nitrito, período este em que foi realizada a segunda coleta para a quantificação do NMP (125º dia). Já a terceira coleta (153º dia) foi realizada durante o período que houve a queda de nitrito e estabilização da nitratação. Comparando com os resultados de NMP percebe-se que houve uma diminuição acentuada do 74º dia para 125º dia na estimativa das bactérias oxidadoras de nitrito (10^7 para 10^1) e, de forma oposta, houve um aumento de BOA (10^6 para 10^8). Esse fato provavelmente foi devido a um desequilíbrio entre as comunidades das oxidadoras de amônia e de nitrito, inclusive provocando o acúmulo de nitrito no reator.

A baixa estimativa das bactérias oxidadoras de nitrito no 125º dia da Fase II pode ter favorecido o acúmulo de nitrito. O aumento gradativo das concentrações de nitrato observado no 143º dia de operação deve-se possivelmente à adaptação destas bactérias ao sistema ou melhoria nas condições ambientais.

Oliveira (2010) observou que, no início de operação de um filtro biológico de leito flutuante de fluxo ascendente e aerador, preenchido com biomédias e alimentado com efluente de aquicultura, houve aumento da concentração de nitrito, devido a uma maior disponibilidade de substrato (N-amoniaco) ocorrendo um desequilíbrio inicial entre as comunidades de bactérias oxidadoras de amônia e de nitrito, sendo que o primeiro grupo tende a crescer mais rapidamente no início, e o nitrito torna-se disponível após a oxidação da amônia e por isso, na partida de sistema de nitrificação o nitrito pode se acumular.

Observa-se na Figura 5.33, que a estimativa de BOA foi maior do que das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) no 74º (no material suporte) e 125º dia de operação (líquido), não podendo-se incluir o NMP do 153º dia por falta de um resultado. Isto é esperado, pois a reação de oxidação da amônia libera mais energia (por mol de amônia) para o crescimento celular do que a oxidação do nitrito (FOCHT E VERSTRAET, 1977 apud MENDONÇA, 2002).

Figura 5.33 Número mais provável de bactérias oxidadoras de nitrito realizado no início, meio e fim da operação da Fase II



Observando a eficiência de remoção de NKT, que na Fase I e II apresentaram valores de 81% e 82% respectivamente. Verificou-se que não houve nitrificação completa, uma vez que a parcela de NKT residual foi em torno de 200 mg/L. Como Isso indica que houve limitação na etapa de nitrificação, principalmente, uma vez que 94 e 82% do NKT efluente esta na forma de N-amoniacal.

Li et al. (2007) observou que a nitrificação foi incompleta em TDH pequenos (2 dias) e baixo OD (0,7 a 1,0 mg.L⁻¹) em reator em batelada sequencial. Duas razões foram sugeridas: a primeira seria que a maior taxa de produção de nitrato (5,1 a 4,2 mol. cel. ⁻¹.h⁻¹ para *Nitrobacter*) em relação à produção de nitrito (0,9 a 20,0 mol.cel. ⁻¹.h⁻¹ para *Nitrosomonas*) e, a segunda, que o nitrito produzido foi rapidamente reduzido a N₂ na fase anóxica e por isso não houve acúmulo desse no referido período.

Observou-se neste trabalho, que o NMP das BOA permaneceu superior à estimativa das BON, na Fase II, resultado que possivelmente está associada aos coeficientes de produção das mesmas.

As BOA apresentam maiores coeficientes de produção que as BON (PAMBRUN *et al.*, 2006), entretanto tem sido observado em diversos trabalhos usando diferentes técnicas (NMP, DGGE, T-RFLP, FISH) maior número das últimas em relação as primeiras (YE & ZHANG, 2010; DIONISI *et al.*, 2002). Essas discrepâncias observadas podem estar relacionadas à composição do afluente, características dos sistemas (hidrodinâmica,

crescimento fixo ou em suspensão) e aos parâmetros operacionais (LI *et al*, 2007, YE & ZHANG, 2010).

Com base nas taxas de crescimentos das bactérias oxidadoras de amônia ($0,76 \text{ dia}^{-1}$), de nitrito ($0,84 \text{ dia}^{-1}$) e heterotróficas ($4,8 \text{ dia}^{-1}$), FDZ- Polanco *et al* (2000), concluiu que as oxidadoras de amônia tem maior atividade do que as oxidadoras de nitrito, isso em parte deve-se a inibição seletiva das BON, causado por excesso de amônia livre, que em seu estudo apresentou concentrações maiores que $0,5 \text{ mg NH}_3\text{-N/g}$ sólidos voláteis aderidos, ocasionando a diminuição do grupo BON, e assim, favorecendo o acúmulo de nitrito. Este autor utilizou biofiltro aerado biológico (UBAF) visando a nitrificação de água residuária sintética em diferentes concentrações de DQO.

Durante o monitoramento da Fase I e II, houve variação das concentrações de amônia livre no efluente, porém os valores foram baixos, variando de 0 a $0,7 \text{ mgNH}_3\text{L}^{-1}$. Considerando que o reator é de mistura completa, as concentrações de amônia livre do meio líquido do reator estariam com valores próximos à do efluente, por isso, com base na literatura, pode-se inferir que as concentrações de amônia livre presentes podem ter provocado redução da atividade das BON, que como já observado são mais sensíveis as concentrações desta.

Observa-se que nas coletas do 74° , 125° , 153° dia o NMP das BOA foram de 10^6 , 10^8 , 10^7 , enquanto que a estimativa na biomédia foi de 10^7 , 10^5 e 10^8 , respectivamente. A estimativa das BON foi maior no meio líquido (10^7 , 10^6) do que no material suporte ($10^6, 10^1, 10^6$).

De acordo com Ye & Zhang (2008) e Belser *et al.*(1982), as BON tendem a viver sintroficamente com as BOA nos flocos ou biofilmes onde o nitrito pode ser obtido diretamente, enquanto que as BOA preferem viver livremente no meio líquido onde a amônia é facilmente disponível, por isso estão sujeitas a serem “lavadas” do reator biológico.

Kindaichi *et al.* (2006), também relataram que biofilmes de reatores alimentados apenas com N-amoniaco e ausência de carbono orgânico, a diversidade das bactérias desnitrificantes, BOA e BON, no biofilme, estão em frações de 50%, 22% e 28% respectivamente. A menor fração encontrada para as BOA pode ser devido a presença de betaproteobacteria oxidadoras de amônia que não hibridam com a sonda Nso190 (Técnica FISH), como por exemplo *Nitrosomonas eutropha*.

Kraiguer *et al.* (2012) observaram que *Nitrosomonas* (BOA) era dominante nos biofilmes, em reator de leito móvel tratando águas residuárias. *Nitrosomonas eutropha* foi dominante em 20% entre outras linhagens de *Nitrosomonas*. Quan, *et al.* (2012) também

observaram a mesma dominância por *Nitrosomonas* (BOA), seguida pelas *Nitrospira* (BON), em sistemas de Lodos Ativados.

Portanto, tanto a dominância quanto a distribuição de determinados grupos de bactérias nas camadas do biofilme é dependente das concentrações de N-amoniaco e carga orgânica provenientes do substrato utilizado.

A ausência de nitrito e as altas concentrações de nitrato, juntamente com as condições ambientais e operacionais do reator, a partir do 77º dia, provavelmente devem-se à rápida oxidação do nitrito a nitrato, coincidindo com baixo NMP de oxidadoras de amônia e alta NMP de oxidadoras de nitrito, observados nas Figuras 5.32 e 5.33.

De maneira geral, o crescimento de *Nitrobacter*, e outras bactérias oxidadoras de nitrito impedem o acúmulo de nitrito, devido à alta eficiência na conversão de nitrito para nitrato. Porém, dependendo das condições ambientais, como a temperatura e pH, bem como das características da água residuária, a velocidade de crescimento da *Nitrosomonas* (BOA) pode exceder a velocidade de crescimento das *Nitrobacter*.

Brites (2008), operando um reator em bateladas sequenciais visando a nitrificação de lixiviado, realizou três coletas durante o monitoramento, para a estimativa de bactérias envolvidas no processo de nitrificação e desnitrificação. Os resultados indicaram maior número de BOA em relação ao de BON. Na primeira coleta (61º dia) encontrou-se 10^6 para as bactérias oxidadoras de amônia, 10^1 para as oxidadoras de nitrito e 10^6 para as desnitrificantes. Na segunda coleta, foi estimado que as BOA e desnitrificantes continuavam superior as BON. Somente houve mudança na terceira coleta (118º dia), em que foi notada uma diminuição das BOA (10^5) e das desnitrificantes para 10^5 , e um aumento repentino das BON para 10^5 . O autor explica que às condições operacionais e ambientais, (temperatura= 22°C e pH 8,3) influenciaram positivamente o crescimento das nitrificantes (BON).

Shore, *et al.* (2012) operando três reatores de leito móvel, tratando águas residuárias industriais, em diferentes temperaturas, observaram acúmulo de nitrito após terem aumentado a temperatura, e que este fato coincidiu com uma diminuição na população de BON, indicando que o aumento da temperaturas (acima de 22-25°C) é favorável à atividade das BOA em relação as BON.

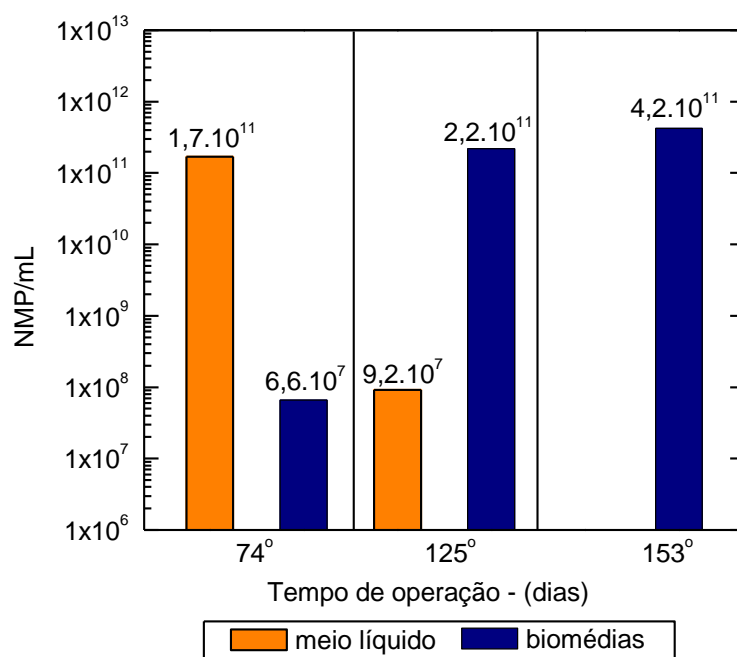
A diminuição da população de bom, no presente trabalho, não resultou em déficit no desempenho na eficiência da nitrificação, pois ainda que tenha ocorrido acúmulo de nitrito houve a oxidação do N-amoniaco para este. Entretanto neste estudo o acúmulo de nitrito não deve estar relacionado a temperatura, uma vez que durante as duas fases esta foi controlada em $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Portanto à queda do pH, chegando à 5,4 no 45º dia da Fase II, pode ter sido a principal causa do acúmulo de nitrito. Essa queda de pH deve ter reduzido a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito.

Pode-se observar ainda, Figura 5.31, que a Fase I apresentou uma estimativa de $1,3 \times 10^{11}$ NMP/100mL de bactérias desnitrificantes. Este valor é superior ao encontrado em Mangili, *et al.*, (2011), cuja estimativa das desnitrificantes variou entre $7,8 \times 10^5$ à $2,8 \times 10^8$ para amostra de lodo ativado tratando lixiviado de aterro na fase metanogênica.

Comparando a estimativa das bactérias desnitrificantes da Fase I (10^{11}) com as da Fase II (10^{11}) percebe-se que no meio líquido houve a permanência dos mesmos valores, como observado na Figura 5.34. Esse fato foi semelhante ao ocorrido com as bactérias nitrificantes.

Figura 5.34 Número mais provável de bactérias desnitrificantes realizado no início, meio e fim da operação da Fase II.



Pode-se observar que o número mais provável de desnitrificantes foi maior que para as bactérias oxidadoras de amônia e nitrito. Percebe-se que a estimativa de bactérias desnitrificantes nas biomédias no 74º dia foi menor (10^7) do que nas demais coletas (125º e 153º dia), além disso, nessa coleta as desnitrificantes no meio líquido (10^{11}).

Na segunda coleta, o NMP das desnitrificantes no material suporte, aumentou (10^{11}) permanecendo da mesma ordem de grandeza na terceira coleta (153º dia).

É possível observar, que neste trabalho, não foi incluído o processo de desnitrificação, pois o processo empregado era aeróbio. O NMP de desnitrificantes encontrado nas duas fases foram superiores ao encontrado em Etchebehere, *et al.* (2002) que obteve NMP da ordem de

$2,4 \times 10^7$ de bactérias desnitrificantes por mL, operando um reator anóxico alimentado com lixiviado, mas essa estimativa somente foi alcançada após a adição de etanol, para promover a desnitrificação.

Brites, (2008) operando reator em bateladas sequenciais, em escala de bancada com aproximadamente 2 litros, tratando lixiviado de aterro novo visando a nitrificação, encontrou maior densidade de bactérias oxidadoras de amônia.

Apesar das características do lixiviado utilizado apresentar baixa concentração de matéria orgânica de fácil biodegradação, relação DBO/DQO menor que 0,1 conforme Maringonda (2008),. Apesar dos baixos valores médios de DBO no afluente, que foram, nas Fases I e II, respectivamente de 141 e 119 mg O₂/L, por isso a relação DBO/NKT foi que 0,2 nas duas fases, os valores de NMP de bactérias desnitrificantes nas duas fases foram altos.

A fração de bactérias nitrificantes decresce à medida que a relação C/N cresce, fazendo com que aumente o desenvolvimento das bactérias heterotróficas que competem com as autotróficas por oxigênio e nutrientes, uma vez que tem velocidade de crescimento bem maior.

Hirooka *et al.* (2009), por meio de análises de PCR-DGGE de amostras de NMP, após incubação por 40 dias, em meio seletivo para bactérias oxidadoras de N-amoniacoal, constatou a presença predominantemente de bactérias heterotróficas, indicando que as bactérias oxidadoras de nitrogênio poderiam ter sido usadas como fonte de carbono pelas bactérias heterotróficas. Estudos têm apontado baixas porcentagens de organismos nitrificantes em relação à biomassa heterotrófica, mesmo em sistema (tratando águas residuárias) com baixas concentrações de carbono e com nitrificação eficiente (DIONISI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2007)

No processo de desnitrificação, cada óxido de nitrogênio é catalizado por uma enzima específica, como óxido de nitrogênio redutase (nitrito redutase, nitrato redutase e óxido nitroso redutase, entre outros). Na fase da redução as formas oxidadas do nitrogênio são usadas na respiração, como receptores de elétrons. As desnitrificantes utilizam o nitrito e o nitrato presentes, para realizar o processo. Estas bactérias possuem maior taxa de crescimento específico comparadas às nitrificantes. Isto pode explicar o motivo das bactérias desnitrificantes apresentarem-se em número superior aos das bactérias nitrificantes, resultado observado durante as Fases I e II. Além disso, a alta densidade de bactérias desnitrificantes encontrada nas análises de NMP das biomédias pode ser devido ao ambiente anaeróbio/anóxico formado dentro do biofilme, onde pode ocorrer a desnitrificação.

Dessa forma, substratos que apresentam altas concentrações de matéria orgânica biodegradável, influenciarão o desenvolvimento de culturas mistas de bactérias nitrificantes e heterotróficas (muitas delas desnitrificantes).

5.4 RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a quantificação da biomassa aderida ao material suporte, foi preciso abrir o reator e retirar amostras os mesmo do interior do reato, portanto isto foi realizado somente ao final da operação do sistema.

A quantificação da biomassa foi realizada em dois ensaios, no 262º e 276º dia, utilizando diferentes metodologias, com objetivo de avaliar o melhor método para o desprendimento da biomassa.

Foi realizada a caracterização do afluente e do efluente no início da quantificação da biomassa. O efluente do reator apresentava as seguintes condições: pH: 6,4; Alcalinidade: 365 mgCaCO₃/L; Remoção de N-amoniaco: 71%; Remoção de NKT: 62%; Remoção de DQOfilt.:6%; nitrito ~ 800mg N-NO₂/L; nitrato: 7mg N-NO₃/L. Os sólidos em suspensão total, fixos e voláteis do efluente foram em média de 73, 49 e 24 mg/L respectivamente.

O primeiro ensaio foi realizado utilizando a metodologia adaptada de Abreu (2008), que se baseou na agitação das amostras de material suporte (5 unidades) com água destilada e micro pérolas de vidro por vinte minutos. Após o desprendimento da biomassa, seguiu-se o método de determinação de sólidos em suspensão.

Com este método, constatou-se que os sólidos em suspensão totais aderidos foram de 1,3 mg por material suporte e 1mg sólidos voláteis por material suporte. Com estes resultados estimou-se a concentração de sólidos em suspensão totais no reator, apenas a parcela aderida ao material suporte, como 164 mg SSV/L, sendo que destes 126 mg/L eram sólidos suspensão voláteis aderidos.

Abreu (2008), operando um reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo, tratando esgoto sanitário, com TDH de 12 horas, observou que 0,73mg STV/g de espuma de poliuretano, e 3,35g STV/L do reator.

Agra (2009), tratando esgoto sanitário utilizando bucha vegetal (3g) como enchimento de um reator de leito móvel, quantificou a biomassa aderida em torno de 0,26 g SSV por área/material suporte (área superficial: 850 a 1000m².m⁻³)

Como constatou-se que a concentração de sólidos aderida ao material suporte, para verificar se o material aderido havia sido totalmente extraído, foi feita a pesagem dos

suportes amostrados após a extração dos biofilmes ($P_{\text{médio}} = 0,334 \text{ g}$), para a comparação com o peso inicial ($P_{\text{médio}} = 0,327 \text{ g}$). Com base nos resultados obtidos acredita-se que o método utilizado não removeu totalmente o biofilme do material suporte, por isso um segundo ensaio foi feito, utilizando ultrassom para desprendimento do biofilme do suporte.

O segundo ensaio foi realizado no 276º dia de operação e as condições do reator estavam próximas à do primeiro ensaio, apresentando ainda acúmulo de nitrito, aproximadamente de $600 \text{ mg N-NO}_2/\text{L}$.

Para o desprendimento da biomassa aderida, os materiais suportes foram deixados por vinte minutos em um equipamento de ultrassom, e então seguiu-se o método de determinação de sólidos em suspensão. Neste ensaio foi obtido $1,28 \text{ mg}$ de sólidos em suspensão total por unidade de material suporte e $1,22 \text{ mg}$ para os sólidos em suspensão. A concentração de sólidos em suspensão totais e voláteis aderidos estimado no reator ($410 \text{ material suporte}$), foi de 156 e 148 mg/L , respectivamente.

Foi feita a pesagem dos suportes após o desprendimento, que resultou em um $P_{\text{médio}} (5) = 0,332 \text{ g}$, valor um pouco acima da média do material suporte antes de ser utilizado.

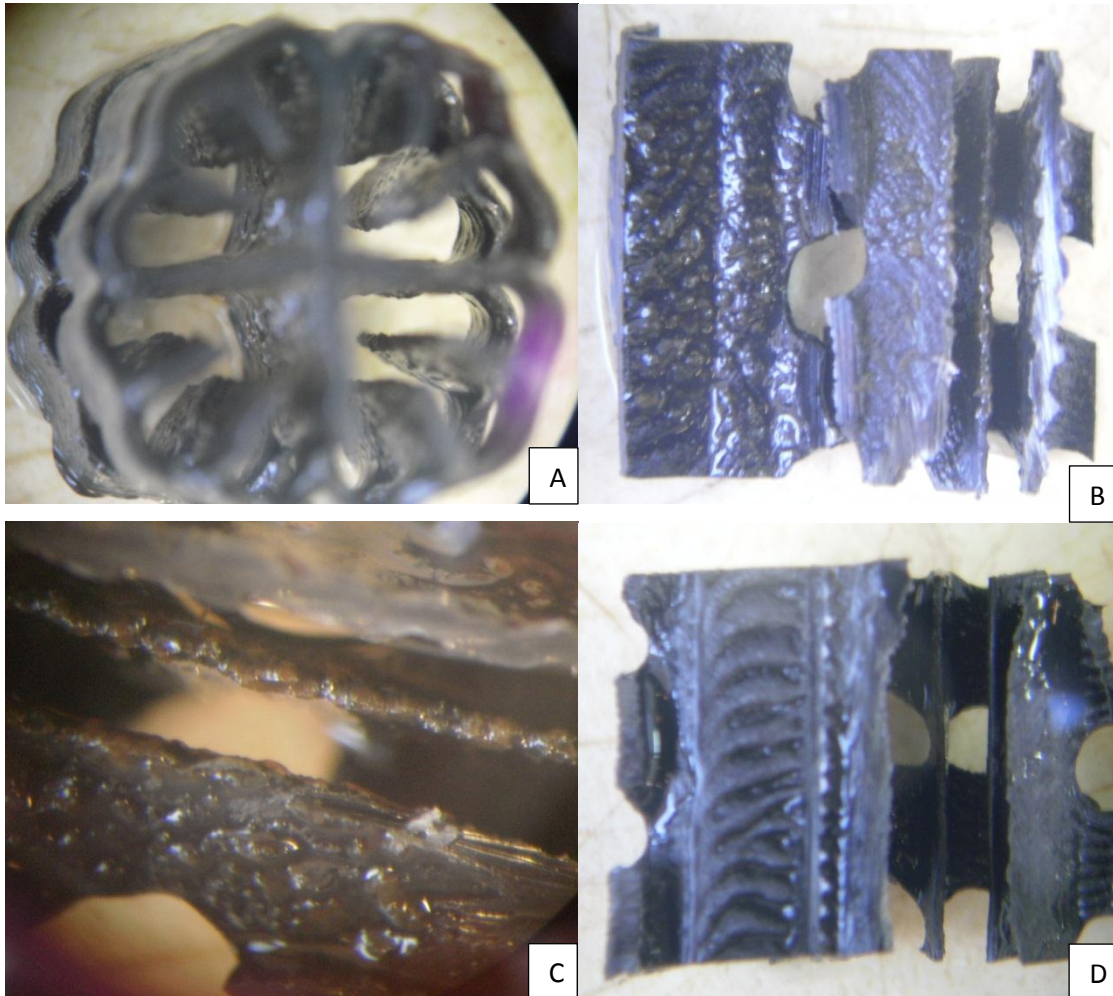
Segundo Araújo (1995), a aderência dos microrganismos no material suporte pode ser reversível ou irreversível. Depois que a bactéria se adere de forma irreversível, somente poderá ser removida pela ação de forças muito fortes de cisalhamento.

Uma maior concentração de biomassa pode possibilitar melhores eficiências nos tratamentos de águas residuárias em reatores de leito móvel, pois com a imobilização dos microrganismos nitrificantes, o reator pode ser operado em menor tempo de retenção celular. Entretanto, o aumento excessivo na espessura do biofilme pode fazer com que ocorra mais rapidamente o desprendimento natural, e por isso prejudica a manutenção da biomassa no interior do reator (ROSTRON *et al.*, 2001).

Ao final do experimento foram realizadas fotografias do material suporte em estereomicroscópio e microscopia eletrônica de varredura para avaliar as condições do biofilme aderido no material suporte utilizado no reator de leito móvel. As micrografias foram realizadas no dia que os materiais suporte foram retirados do reator para a quantificação da biomassa (276º dia de operação).

Pode-se observar na Figura 5.35 que a espessura do biofilme no material suporte é consideravelmente pequena. Após a lavagem do material suporte, realizado durante o método de quantificação da biomassa, observou-se que ainda restavam sólidos aderidos no material (Figura 5.35 D).

Figura 5.35 Fotografias realizadas utilizando estereomicroscópio. A) Material suporte (objetiva 1,0X); B) Corte do material suporte (objetiva 1,5 x); C) interior do suporte antes da lavagem (objetiva 2,5x); D) Interior do suporte depois da lavagem (objetiva 1,5x).



As Figuras 5.36 e 5.37 mostram as micrografias realizadas por microscopia eletrônica de varredura na superfície externa e interna do material suporte. A Figura 5.36 (A) indica a localização dos biofilmes na superfície externa. Nota-se que a maior parte do biofilme está localizada nas rugosidades da superfície externa do material plástico, entretanto ainda há presença de bactérias em superfícies mais lisas, como mostra a Figura 5.36 (B), porém estas apresentam poucas substâncias poliméricas extracelulares para fixação, supondo que sua aderência ainda é recente, ou que já tenha ocorrido desprendimento. Nos sistemas de biofilme pouco ou nenhum biofilme cresce aderido a parte externa dos suportes, devido às forças de cisalhamento, crescendo em partes protegidas no interior (RUSTEN, *et al.* 2006).

Blazejewski, *et al.*, (2009) operando um reator de leito móvel, com aeração intermitente e alimentado com esgoto doméstico, para nitrificação e remoção de matéria

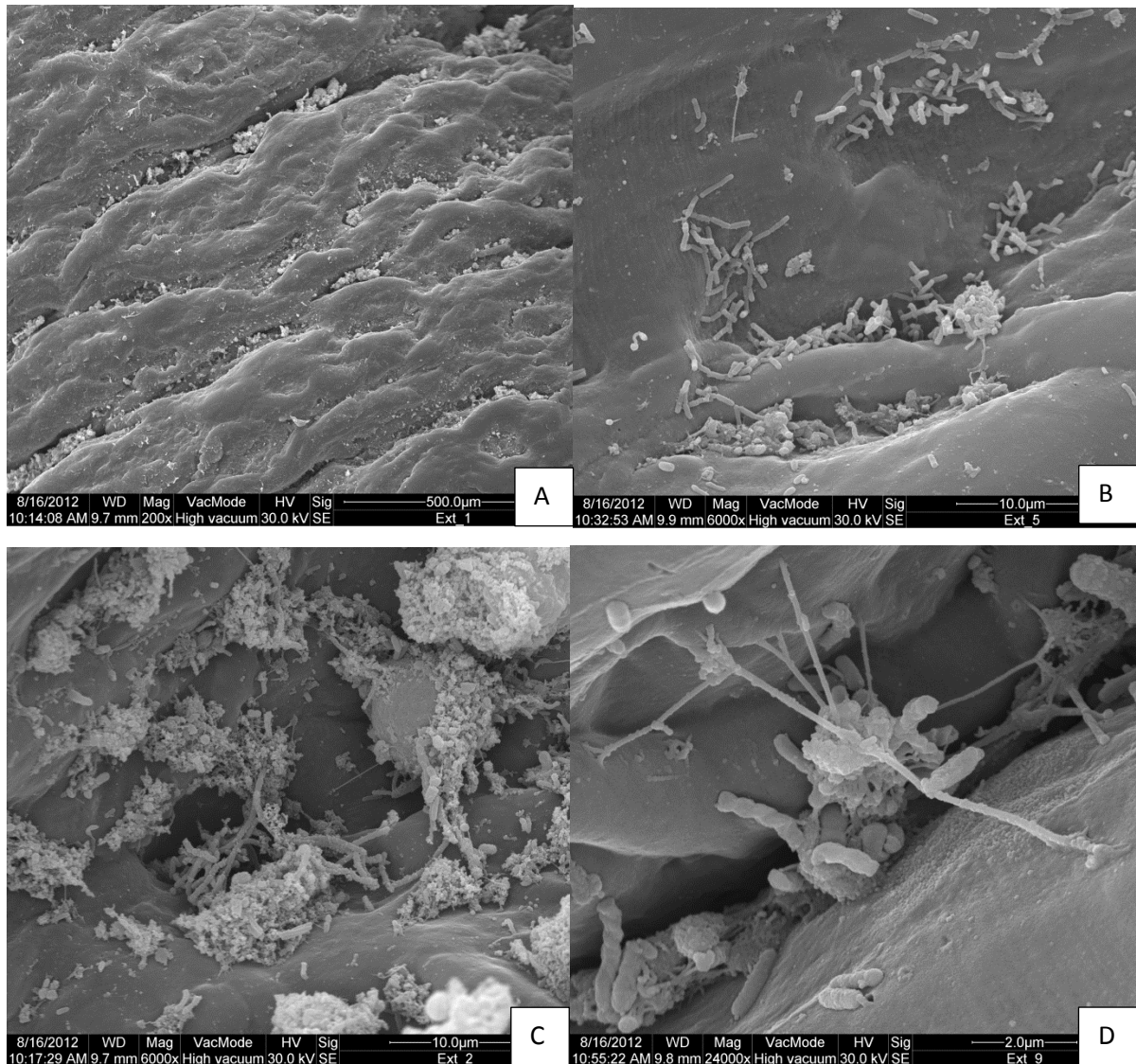
orgânica, observou que o biofilme era mal desenvolvido na superfície externa do material suporte, não cobrindo toda a superfície e com a presença de colônias separadas, enquanto que no interior do material suporte foi observado apenas locais colonizados por colônias de ciliados.

Segundo Rusten *et al.*, (2006), a taxa de nitrificação em reator de leito móvel, é somente influenciada por três fatores, a carga de matéria orgânica, a concentração de N-amoniaco e a concentração de oxigênio dissolvido. A carga orgânica controla a nitrificação e deve ser baixa. E a taxa de nitrificação depende da distribuição das heterotróficas e nitrificantes dentro do biofilme e da penetração de oxigênio para a camada de nitrificantes. Segundo Hem, *et al.*, (1994) o processo de desnitrificação é insignificante na parte exterior do material suporte, onde ocorre a mineralização do biofilme

Materiais suporte com superfícies de contato irregulares, porosas ou providas de rugosidades (maior área de contato superficial), potencializam a excreção de polissacarídeos dos microrganismos, propiciando condições perfeitas para o estabelecimento do biofilme (SUTHERLAND, 2001).

A Figura 5.36 (C e D) mostra um detalhe do interior das rugosidades da superfície externa do material suporte, onde se observa a diversidade de microrganismos no biofilme. Há presença de diferentes morfologias de bactérias, como bacilos, cocos e espirilos.

Figura 5.36 Fotografias realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Parte externa do material suporte; B) Superfície externa do material suporte; C) Rugosidade da superfície externa do material suporte; D) Bactérias aderidas às rugosidades.



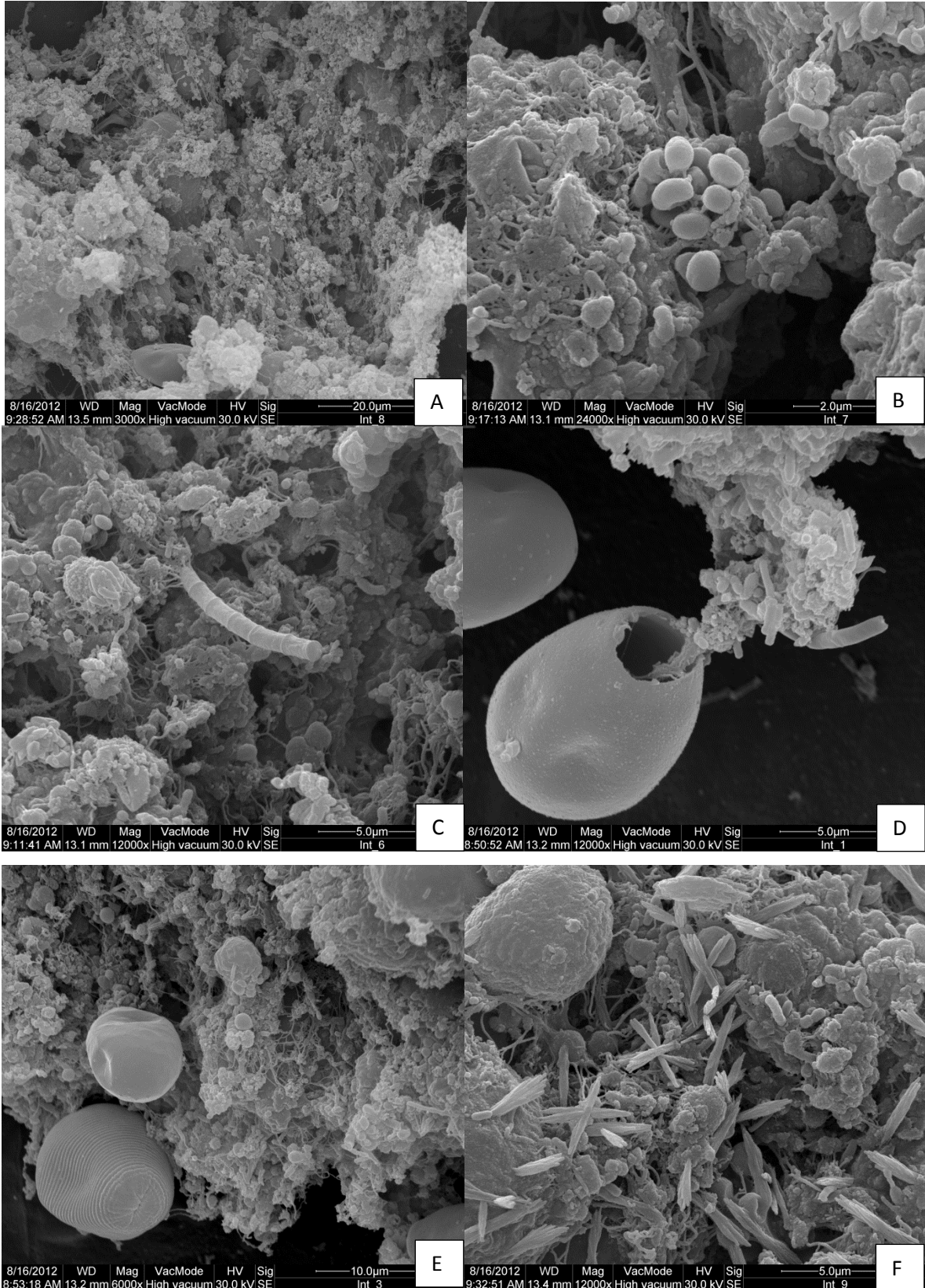
A Figura 5.37 mostra as imagens realizadas na parte interna do material suporte. É possível observar a espessura do biofilme encontrado no interior do material, em que nota-se um aumento de exopolímeros que favorecem a fixação das bactérias. Na parte interna do material suporte, observaram-se aglomerações de biofilmes e regiões não colonizadas. Além disso, a colonização dos microrganismos ocorreu próxima aos poros e rugosidades. Comprovando que os biofilmes são formados em regiões independentes e não são uniformes (BENTHUM *et al.*, 1995).

Pode-se observar a colonização do biofilme por diferentes bactérias (Fig. 5.37 - C); bactérias semelhantes a *Nitrospira* (Fig. 5.37 - D), *tecamebas* e por outros protozoários, bem

como elementos inorgânicos, como sódio, avaliados pela microscopia de transmissão (Fig. 5.37- F).

Tecamebas, como já citado anteriormente, foram visualizadas desde o início da operação, caracterizando períodos de bom desempenho da nitrificação (EIKELBOOM, 2000). Entretanto, não é observado biofilme com colonização excedente de protozoários. Segundo Salvetti *et al.* (2006b), a intensa densidade de metazoários, como os rotíferos, provocam um desprendimento de biofilme e conseqüentemente uma grande liberação de sólidos em suspensão, além da diminuição da taxa de nitrificação.

Figura 5.37 Fotografias realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Parte interna do material suporte; B) Superfície externa do material suporte; C) Rugosidade da superfície externa do material suporte; D e E) Microrganismos aderidos às rugosidades (Int.) F) substância química aderida ao biofilme.



O crescimento e espessura do biofilme é influenciado pelas condições hidrodinâmicas e pelas cargas orgânicas aplicadas. A presença de material suporte pode favorecer a distribuição das bactérias que apresentam taxa de crescimento mais acelerado nas camadas superiores do biofilme (onde a passagem do substrato é maior, e o desprendimento dos microrganismos é maior) enquanto as bactérias nitrificantes crescem no interior do biofilme, prevenindo o arraste destas para fora do reator. O biofilme formado por bactérias heterotróficas pode apresentar uma espessura maior do que os biofilmes compostos por bactérias autotróficas, devido ao lento crescimento destas (OKABE, *et al.* 1996). Em biofilmes com grande espessura a concentração de OD no meio deve ser alta o suficiente para sobrepor às limitações da difusão deste no biofilme.

Bassin *et al.*, (2012) observando biofilme em micrografias perceberam que a biomassa nitrificante é significativamente alterada quando a DQO do afluente é reduzido. Em algumas partes do material suporte houve o desprendimento do biofilme quando a DQO foi reduzida, com o desprendimento das bactérias heterotróficas, o biofilme remanescente foi enriquecido pelas nitrificantes, que por consequência aumentou a taxa específica de remoção de N-amoniacal.

Estudando a dinâmica dos microrganismos nos biofilmes, Okabe, *et al.* (1996), observaram que a distribuição espacial das bactérias heterotróficas e nitrificantes é dependente da razão C/N, sendo que na ausência de carbono, os dois grupos podem coexistir nas camadas externas do biofilme.

A diversidade e a abundância de bactérias nitrificantes variam significativamente ao longo das diferentes profundidades do material suporte. Estas variações são atribuídas à diversidade de condições ambientais propiciadas pelas diferentes camadas ou profundidades do biofilme, como também pelas concentrações decrescentes de amônia e substratos orgânicos, concomitantes às crescentes concentrações de nitrito e nitrato (MISSAGIA, 2010).

Tendo como referência os resultados da quantificação da biomassa e a análise microscópica do material suporte, percebe-se visualmente que os microrganismos aderidos eram consideravelmente escassos, tendo melhor aderência nas rugosidades do material suporte.

Entretanto, uma redução na espessura do biofilme não significa baixo rendimento da oxidação do N-amoniacal. Elanter, *et al.*, (2007), observando a competição entre bactérias heterotróficas e autotróficas em biofilme de um reator de leito fixo, sob diferentes condições de carga orgânica, observaram que a espessura do biofilme decresceu de 330 para 190mm,

porém isso não afetou significativamente as taxas de oxidação de amônia, que permaneceram estáveis em 2,1 g de N/m²d.

Vale ressaltar, que a biomassa aderida pode ter sido influenciada negativamente pelas condições ambientais e operacionais.

6 CONCLUSÕES

O trabalho realizado, empregando reator de leito móvel com TDH de 13 dias, para o tratamento biológico de lixiviado, visando a remoção de nitrogênio, permite concluir que:

- A aplicação do reator de leito móvel como sistema de tratamento biológico para remoção de nitrogênio de lixiviados é promissor, mesmo quando o afluente possui elevadas concentrações de N-amoniacoal (≈ 890 mg N-NH₃/L);
- A manutenção e o controle do pH, com a adição de fonte externa de alcalinidade é essencial para que o sistema apresente desempenho satisfatório e processo de nitrificação se mantenha estável;
- A eficiência de remoção de DQO, TDH de 10 dias, na Fase I foi de 18% e na Fase II de 21%. Seu desempenho quanto à remoção média de DBO foi de 23% durante a Fase I, e de 9%, na Fase II. O reator de leito móvel apresentou pouco desempenho para remoção média de matéria orgânica, possivelmente devido às elevadas concentrações de compostos recalcitrantes ou lentamente biodegradável presentes no lixiviado de aterros de resíduos sólidos;
- Em termos de NKT, praticamente não houve diferença na eficiência de remoção nas duas fases de operação do reator de leito móvel, sendo a remoção média de 81 e 82%, respectivamente nas Fases I e II. A eficiência de remoção de N-amoniacoal na Fase I foi de 80% e na Fase II foram foi de 83%;
- O balanço das concentrações de nitrogênio total entrando e saindo do reator, demonstrou que nas Fases I e II a eficiência de remoção de nitrogênio total foi em média de 14 e 29%;
- Na Fase II, foi possível observar que a redução do pH, interferiu nas condições de crescimento e manutenção das bactérias oxidadoras de nitrito, reduzindo a atividade destas e, conseqüentemente acumulando nitrito no sistema;
- Observou-se a presença de ciliados livres e tecamebas, no período em que houve alta eficiência de remoção de nitrogênio amoniacoal;
- Durante a Fase I, a estimativa de bactérias heterotróficas foi na ordem de 10^{10} à 10^{13} . e na Fase II foi de 10^{10} à 10^{13} , para o meio líquido, e de 10^8 à 10^{13} para as biomédias. Apesar da baixa concentração de matéria orgânica facilmente biodegradável, baixa concentração de DBO, ocorreu o desenvolvimento destas bactérias tanto no meio líquido como no biofilme;

- O NMP das bactérias envolvidas na remoção de nitrogênio (oxidação e redução) indicou que as condições ambientais e operacionais influenciaram positivamente o desenvolvimento destas. A estimativa de BOA, BON e desnitrificantes no meio líquido durante as Fases I e II foi da ordem de 10^6 a 10^8 , 10^5 a 10^7 e 10^7 a 10^{11} , respectivamente;
- Foi observado que o NMP das BON (10^6 no meio líquido e 10^1 nas biomédias) foi inferior às oxidadoras de amônia (10^8 no meio líquido e 10^5 nas biomédias) no período em que houve a queda de pH na Fase II, indicando que o pH influenciou negativamente as atividades destas, e por consequência favoreceu o acúmulo de nitrito no efluente;
- Na quantificação da biomassa do material suporte, os sólidos em suspensão totais aderidos foram aproximadamente 1,3 mg SST e 1mg SSV por unidade de material suporte;
- Aparentemente a recirculação do efluente nitrificado para a entrada do reator não proporcionou em melhor desempenho.

7 REFERÊNCIAS

ABREU, S.B., ZAIAT, M. desempenho de reator anaeróbio –aeróbio de leito fixo no tratamento de esgoto sanitário. **Eng. Sanit. Ambient.** Vol.13, p. 181 – 188., 2008.

AGRA, C. Angela. **Tratamento de Aguas Residuárias domesticas em reatores de biomassa dispersa e biomassa aderida.** Dissertação apresentada ao programa regional de pós-graduação em Desenvolvimento e meio ambiente – PRODEMA, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, PB, 2009.

AKERMAN, A. **Feasibility of nitrate-shunt (nitrification) on landfill leachate.** Tese (mestrado) – Instituto de Tecnologia, Universidade de Lund. Lund (Suécia). 2005.

ALMEIDA, P. G. S. **Efeito de diferentes tipos de meio suporte no desempenho de filtros biológicos percoladores aplicados ao pós-tratamento de efluentes de reatores UASB, com ênfase na nitrificação.** Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Escola de Engenharia - UFMG. 2007.

APHA, AWWA, WEF **Standards Methods for the Examination of Water e Wastewater**, 21º ed. Washington. D.C, 2005.

ARAÚJO, J.C. **Caracterização e Evolução do Biofilme em Reator Anaeróbio de Leito luidificado Alimentado com Esgoto Sanitário Sintético.** Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo. 1995.

BASSIN, J.P. **Nitrificação de efluentes salinos em reatores de leito móvel com biofilme em biorreatores agitados.** Mestrado em ciências em engenharia química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, A. S. ROSADO, M. C. M., VAN LOOSDRECHT, and DEZOTTI, M. Effect of Different Operational Conditions on Biofilm development, Nitrification, and Nitrifying Microbial Population in Moving-Bed Biofilm Reactors. **Environ. Sci. Technol.**v. 46, 1546–1555, 2012.

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

BELSER, L.W., MAYS, E. L. Use of nitrifier activity measurements to stimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments. **Appl.Env.Microbiol.**, 43. (4): 945-948. 1982

BENTHUM, van W. A. J., LOOSDRECHT, van, M. C. M., TIJHUIS, L., HEIJNEN, J. J., Solids Retention Time In Heterotrophic And Nitrifying Biofilm Airlift Suspension Reactor. **Water Science Technology**. v 32, n. 8, p 53 - 60. 1995.

BITTON, G. **Wastewater microbiology.** John Wiley Jons, inc.Publications, 2005.

BRASIL, CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução n. 357.* Brasil: Brasília, 2005

BRAKER, G., FESEFELDT, A., WETZEL, K.P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, p. 3769 -3775. 1998.

BRITES, Eneida C. F. **Operação de reator em bateladas sequenciais visando a nitrificação de lixiviado de aterro novo: Avaliação em escala de bancada. Dissertação de mestrado em tecnologia ambiental e recursos hídricos.** Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia. Departamento de Eng. Civil e Ambiental, Brasília, 2008.

CABEZAS, Angela. **Microbiologia de los procesos biológicos de nitrificación – denitrificación em La descontaminación de desechos. Universidade de La republica.** Facultad de Química. Trabajo de tesis presentado no Mestrado em Química. Montevideo, 2005

CANZIANI, R., EMONDI, V., GARAVAGLIA, M., MALPEI, F., PASINETTI, E., BUTTIGLIERI, G. Effect of oxygen concentration on biological nitrification and microbial kinetics in a cross-flow membrane bioreactor (MBR) and moving-bed biofilm reactor (MBBR) treating old landfill leachate. **Journal of Membrane Science**, v. 286., p. 202–212., 2006.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADEV, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitritation of salicylic acid. **Communications in Soil Science**, v. 6, p 71-80, 1975.

CETESB. **Microbiologia de Lodos Ativados**, série Manuais, Companhia de tecnologia de Saneamento Ambiental, 23p. São Paulo, SP, 1992.

CLEMENT, B. **Physico-chemical characterisation** 25 french landfill leachates. Sardinia, Itália, 1995.

CHRISTENSEN, T;H., KJELDTSEN, P. BJERG, P.L, JENSEN, D.L., CHRISTENSEN, J. B., BAUN, A. AURECHTSEN, H. E HERON, G. biogeochemistry of landfill leachate plume. **Applied Geochemistry**, 16: 659 – 718, 2001.

DONG-JIN KIM, LEE D., JÜRIG KELLER, J. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 459–468, 2005.

DINÇER, A.R. and KARGI, F. Kinetics of Sequential Nitrification and Denitrification Process. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 27, p. 37 – 42, 2000.

DIONISI, Hebe M.; LAYTON, Alice C.; ROBINSON, Kevin G.; SAYLER, Gary S.; GREGORY, Igrid R. 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, n.01, Jan. 2002, p. 245-253, 2002.

EDUARDO, Janaina. **Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas do lixiviado (chorume) no processo de tratamento do Aterro Metropolitano de Gramacho.**

Dissertação apresentação à Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual de Rio de Janeiro.

ELENER, D., MILFERSTEDT, K., ZHANG, W., HAUSNER, M., MORGENROTH, E., Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. **Water research**. v., 4, p. 4657– 4671, 2007.

EIKELBOOM, D. H. **Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation**. Manual, Asis/ IWA, 156 p. Londres, Reino Unido. 2000.

ETCHEBEHERE, C., ERROZQUIN M.I., DABERT, P., MOLETTA, R. and MUXI, L. Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. **FEMS Microbiology Ecology**.35 (3) p. 259-265, 2001.

ETCHEBEHERE, C., ERRAZQUIN, M.I., DABERT, P., MUXI, L. Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 40, p.97-106, 2002.

EPA – **U.S. Environmental Protection Agency technology transfer**. Process design manual dor nitrogen control. Washington – U.S.A, 1975
YAMASAKI, 2009

FDZ-POLANCO, F. NDEZ, E.MEA, URUENA A., VILLAVERDE, GARCIA, P.A.Spatial Distribution of heterothophs and nitrifiers in a submerdegbiofilter for nitrification.**Wat. Res**. Vol. 34, No. 16, pp. 4081–4089, 2000

FLEMMING HC, WINGLINDER J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPS) – Parte I: Structural and ecological aspects. **Water Science &Technology**.43(6): 1–8. 2001.

FOCHT, D.D., VERSTRAET, W. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. **Adv. Microbiol. Ecol**. 1, 135-214,.1977.

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

FUJI, F.Y. **Análise comparativa entre o processo de Lodo Ativado e o reator de biofilme de leito móvel na remoção de nitrogênio de esgoto sanitário**. Escola politécnica de São Paulo. Mestrado em Engenharia. São Paulo. 2001.

GONZALEZ, Beatriz Cruz. **Construção de microssensores e sua aplicação para estudo de biofilme empregado no tratamento de águas residuárias**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Mestrado em Engenharia e Hidráulica e Saneamento, São Carlos, 2009.

GUO, H., ZHOU, J., JUNG, W., ZHANG, X., ZHANG, Z., UDDIN,S. Performance and microbial structure of a combined biofilm reactor. **Bioprocess Biosyst Eng**. V. 27, p. 249-254, 2005.

HEM, L.J., RUSTEN, B., ODEGAARD, H., Nitrification in a moving bed biofilm reactor. **Wat. Res.** Vol. 28, No. 6, pp. 1425-1433, 1994

HENZE, M., HARREMOES, P., COUR JANSSEN, J., ARVIN, E. **Biological and Chemical Wastewater Treatment**, 2nd edn. Springer, Berlin, 1995.

HIROOKA, K., ASANO, R., NAKAI, Y. Change in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge during selective incubation for MPN determination. **J Ind Microbiol Biotechnol** .V.36, P.679-685, 2009.

HOSSAKA, A.L. *et al.* Avaliação da formação de nitritos em sistema de lodos ativados em batelada no tratamento de lixiviados de aterro sanitário visando a desnitrificação de via curta. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 25**, 2009, Recife. Anais Recife: ABES, 2009.

IAMAMOTO, C. Y. **Remoção de Nitrogênio de Águas Residuárias com Elevada Concentração de Nitrogênio Amoniacal em Reator Contendo Biomassa em Suspensão Operado em Batelada Sequenciais e Sob Aeração Intermitente**. 2006. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ILIES, P. E MAVINIC, P.S. The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate. **Water Research**, vol. 35., p 2065-2072, 2001.

JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGER, G.T. Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming. 2 Edition. **Lewis Publishers**, Chelsea, Michigan, 193p. 1993.

JETTEN, M.S.M; STROUS,M.; van de PASS- XCHOONEN, K.T., SCHALK, J; van DONGEN, U.G.J.M.; van de GRAAF., A.A. LOGEMANN, S.; MUZER, G.; van LOOSDRECHT M.C.M., KUENEN, J.G. The anaerobic oxidation of ammonium. **FEMS microbiology Reviews**, n. 22, p.421 – 437. 1999.

KJELDSSEN, P.; BARLAZ, M. A.; ROOKER, A. P.; BAUN, A.; LEDIN, A., CHRISTENSEN, T. H. Present and long-term composition of MSW landfill leachate: a review. **Critical Reviews in environmental Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 297-336, 2002.

KIELING, D., D., **Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas**. Universidade federal de Santa Catarina. Centro tecnológico. Departamento de engenharia química e engenharia de alimentos. Pós-graduação em engenharia química. Florianópolis, 2004.

KINDAICHI, T., KAWANO, Y., ITO, T., SATOH, H. and OKABE, S. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. **Biotechnol. Bioeng.**,v. 94, p. 1111–1121., 2006.

KURNIAWAN, T.A., LO. .H., CHAN, G.Y.S. Physico-chemical treatment for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachate. **Journal of hazardous materials**. v. 129, p.80-100., 2006.

KOOPS, H. POMMERENING – ROSER, A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. **FEMS Microbiology Ecology**, n.37, p. 1-9, 2001.

KRAIGHER, B., PAL, L., HUMAR., B., LEVSTEK, M., MULEC, I. Total bacterial and ammonia-oxidizer community structure in moving bed biofilm reactors treating municipal wastewater and inorganic synthetic wastewater. **Bioresouce Technology** 110, p. 135-143, 2012.

LI B., IRVIN, S., BAKER, K. The variation of nitrifying bacterial population sizes in a sequencing batch reactor (SBR) treating low, mid, high concentrated synthetic wastewater. **J. Environ.Eng.Sci.**v.6, p.651-663, 2007.

LUOSTARINEN, S., LUSTE, S., VALENTIN, L., RINTALA, Y. nitrogen removal from on-site treated anaerobic effluents using intermittently aerated moving bed biofilm reactor at low temperature. **Water research**, vol. 40, pp. 1607-1615., 2006.

MADONI, P. La Microfauna Nell'Analisi di Qualità Biologica dei fanghi Attivi. In: **Manual di Applicazione – Índice Biótico Del Fango (SBI)**. Azienda Gas Acqua Consorziale di Reggio Emilia, Università degli Studi di Parma, 48p. 1994.

MANGILI, F.B., JACOBS, A.C.P, MAROUBO,L.A., LOPES, D.D., PRATES,K.V.M.C. Caracterização e quantificação de microrganismos em sistema de remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de Aterro. **26º Congresso brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, ABES, 2011.

MARIGONDA, A.J., LOPES, D.D. Caracterização físico-química do chorume do Aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos de Rolândia – Pr. ICTR 2004. **Congresso brasileiro de ciência e tecnologia em resíduos e desenvolvimento sustentável**. Costão do Santinho. Florianópolis. Santa Catarina, 2004.

MATSUMOTO, S., TERADA, A., AOI, Y, TSUNEDA, S. ALPKVIST, E., PICIOREANU, VAN LOOSDRECHT. Experimental and simulation analysis of community structure of nitrifying bacteria in a membrane-aerated biofilm. **Water Science & Technology**. V. 55 N. 8–9, p. 283–290, 2007.

METCALF & EDDY Inc.; **Wastewater engineering: treatment and reuse**. Tata McGraw-Hill Edition, 2003.

MENDONÇA, Luciana. C. **Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido**. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, SP. 2002.

MISSAGIA, Beatriz. **Estudo das comunidades bacterianas em filtros biológicos percoladores utilizados para o pós-tratamento de efluentes de um reator UASB**. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em saneamento, meio ambiente e recursos hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010

MOREIRA, F. M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MÜNCH, E.V.; LANT, P.; KELLER, J. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. **Water Research**, v.30, n.2, p.277-284., 1996.

NICOTELLA, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M; HEIJNEN, J.J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. **Journal of Biotechnology**, v.80, p. 1-33, 2000.

NOGUEIRA, R.; LAZAROVA, V.; MANEM, J.; MELO, L.F. Influence of Dissolved Oxygen on the Nitrification Kinetics in a Circulating Bed Biofilm Reactor. **Bioprocess Engineering**, n.19, p. 441 – 449, 1998.

OKABE, S.; OOZAWA, Y.; HIRATA, K.; WATANABE, Y. Relation between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ration. **Water Reserch**, v. 30, n.7, p.1563-1572, 1996a.

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

OLIVEIRA, A.D.G, BIANCHINI, T.P., QUADROS, A., PRATES, K.V.M.C., LOPES, D.D. Desenvolvimento da comunidade microbiológica em reator em batelada aerado alimentado com lixiviado de aterro sanitário. **XV SILUBESA**, Associação brasileira Engenharia Sanitária e Ambiental, 2012.

OLIVEIRA, Karina Vogel. **Caracterização da comunidade microbiana em biofilme associado a filtro biológico para o tratamento de efluente de Aquacultura**. Pós graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do RS. Porto Alegre, RS, 2010.

PAMBRUN, V.; PAUL, E.; SPÉRANDIO, M. Control and modeling of partial nitrification of effluents with high ammonia concentrations in sequencing batch reactor, **Chemical Engineering and Process**, vol. 4, p. 323–329. 2008.

PAREDES, D., KUSCHK. P., MBWETTE, T. S. A., STANGE, F., MÜLLER, R.A., KÖSER. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment – A Review **Eng.Life Sci.**, 7, No. 1, 13–25, 2007.

PELCZAR, M.J. CAHN, E.C.S., NOEL, R.K. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, 2ª ed. São Paulo, Makron Books, 1996.

PHILIPS, P.S.; FRESTONE, N.P. E HALL, R.S. Dealing with leachate. **Chemistry in Britain** 30: 828-830, 1994.

QUAN, W., YUXIÃO, W., TIANMIN, W., HAO, Z., LIBING, C., HONGZHANG, C., XIUQUIN, K., XIN-HUI, X., CHONG,Z. Effects of packing rates of cubic-shaped polyurethane foam carriers on the microbial community and the removal of organics and nitrogen in moving bed biofilm reactors. **Bioresouce Technology** 117., p. 201-207. 2012.

RENOU, S; GIVAUDAN, J.G.; POULAIN, S.; DIRASSOUYAN, F.; MOULIN, P. Landfill leachate treatment: Review and opportunity, *Journal of Hazardous Materials*, **ELSEVIER**, páginas 468 a 493, 2007.

ROCHA, Etiane Elayne Medeiros. **Monitoramento físico-químico e microbiológico do lixiviado do aterro controlado de resíduos sólidos urbanos de aguazinha em Olinda - PE**. Mestrado em Engenharia civil da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2008.

ROSTRON, W. M.; STUCKEY, D. C.; YOUNG, A. A. Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilization media. **Water Research**.v.35, n. 5, p 1169-11178. 2001.

ROUSE, J.D., BURICA, O. STRAZAR, M. et al. A pilot-plant study of a moving-bed biofilm reactor system using PVA gel as a biocarrier for removals of organic carbon and nitrogen. **Water Science and Technology**, v. 55, n. 8-9, pp. 135 -141. 2007.

RUSTEN, B., EIKEBROKK, B. ULGENES, Y. et al. Design and operations of the kaldnes moving bed biofilm reactors. **Aquacultural engineering**, v. 34, n,3, pp. 322-331, 2006.

SALVETTI, R., Azzellino, A., Canziani, R. and Bonomo, L. Effects of temperature on tertiary nitrification in moving-bed biofilm reactors. **Water Reserch**.v.40 , p. 2981– 2993, 2006a.

SALVETTI, R. AZZELLINO, A. CANZIANI, R. et al. Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. **AquaculturalEngineering**, v. 34, n. 3, pp. 322-331, 2006b.

SEDLAK, Richard L. **Phosphorus and Nitrogen Removal From Municipal Wastewater**. 2. ed. 1991.

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

SCHINEIDER, Eliangela Edila. **Avaliação de um reator de leito móvel com biofilme para tratamento de efluente da indústria do petróleo, com posterior ozonização acoplada a carvão ativado granular com biofilme**. Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE. UFRJ, RJ, 2010.

SCHMIDT, E.L., BELSER, L.W. Nitrifying Bacteria. In: PAGE, A. LEE,R.H., MILLER, R.H., KEEENEY, D.R. Chemical and microbiological properties. Wisconsin: American **Society of Agronomy**, p.1027-1042. 1984.

SILVA FILHO, H. A.; DERKS, Y. M. ; PORTO, A. L.; CAVALCANTI, P.F.F. ; VAN HAANDEL, A, C. **Comportamento da atividade metabólica das bactérias nitrificantes de sistemas de Lodos Ativados sob diferentes valores de pH**. In: XIII SILUBESA - Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2007.

SILVA, C.A.M.C., CAMPOS, J.C., FERREIRA, J.A., MIGUEL, M.A.L.; QUINTAES, B.R. **Caracterização microbiológica de lixiviados gerados nos resíduos sólidos domiciliares e de serviços de saúde da cidade do Rio de Janeiro**, 2011.

SINHA B., ANNACHHATRE, E.A.P. Partial nitrification - operational parameters and microorganisms involved. *Rev Environ Sci Biotechnol*. V.6, P. 285-313, 2007.

SHOULIANG, H.; BEIDOU, X.; HAICHAN, Y.; LIANSHENG, H.; SHILEI, F.; HONGLIANG, L. Characteristics of dissolved organic matter (DOM) in leachate with different landfill ages. *Journal of Environmental Sciences*, v. 20, p. 492 – 498. 2008.

SHORE, J.L., COY, S.M., GUNSH, C.K., DESCHUSSES, M.A. Application of a moving bed biofilm reactor for tertiary ammonia treatment in high temperature industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 112., p. 51-60, 2012.

SHRESTHA, N. K.; HADANO, S.; KAMACHI, T.; OKURA, I. Conversion of Ammonium to Dinitrogen in Wastewater by *Nitrosomonas europae*. *Applied Biochemistry and Biotechnonology*. V. 90, p. 221 – 232, 2001.

SPAGNI, Alessandro, MARSILI- LIBELLI, Stefano., Nitrogen removal via nitrite in sequencing batch reactor treating sanitary landfill leachate., *Bioresource technology*., 2008.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Archaea Press. 1966.

SPINOLA, A.L.G. **Biofilmes aeróbios para remoção de nitrogênio em células de fluxo, submetidos a diferentes velocidades superficiais e taxas de carregamento**. Universidade de São Paulo. Dissertação apresentada ao Mestrado de Hidráulica e Saneamento. São Carlos, SP, 2009.

SPRINGER, N., LUDWING, W., PHILLIPP, B., SCHINK, B. *Azoarcus anaerobius* sp. Nov. Aresercionol degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *Int.journ.Syst.Bact.* 48, 953-956, 1998.

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

TATSI, A. A.; ZOUBOULIS, I.; MATIS, K. A.; SAMARAS, P. Coagulation-flocculation pretreatment of sanitary landfill leachates, *Chemosphere*, v. 53, p. 737-744, 2003.

TARTAKOVSKY, B., LOTLAR, E., SHEINTUCH, M. Coupled nitrification-denitrification process in a mixed culture of coimmobilized cells: analysis and experiment chemical. *Engineering Science*, v. 51, n.10, p.2327-2336, 1996.

TRENNEPHL, F.G. **Remoção biológica de nitrogênio em lixiviado de aterro de resíduos, em sistema de lodos ativados com fonte externa de carbono**. Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento. Londrina, Pões e Saneamento. Londrina, PR, 2009.

VAN HAANDEL, A.; MARAIS, G. **O comportamento do sistema de lodo ativado**. Campina Grande, Epigraf, 488p, 1997.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; JETTEN, M.S.M. Microbiological conversions in nitrogen removal. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 1998.

VAZOLLER, R. F. **Biodiversidade: Oportunidade e Perspectivas Tecnológicas**. Workshop. Campinas-SP-USP, p.1-24, 1996.

VENDRAMEL, S.M.R., **Nitrificação de efluente industrial em reator de leito móvel com biofilme: efeito da salinidade**. Tese de D.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Riode Janeiro, RJ, Brasil., 2009.

VERMELHO. **Práticas de microbiologia**. Ed.Guanabara Koogan, 1ª Ed. 2006.

VERSTRAETE, W.; PHILIPS, S. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. **Environ. Pollut.**, 102 (1), 717-726, 1998.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, Lodos Ativados**, Vol. 4. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 428p, 1997.

VILLAVERDE, S. **Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment**. Reviews in Environmental Science and BioTechnology. p. 171-183. 2004.

XAVIER, J.B., PICIOREANU, C. VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Assessment of three dimensional biofilm models through direct comparison with confocal Microscopy imaging. **Water Science and Technology**, 2003.

YAMASAKI, B. **Análise do processo de nitrificação de lixiviado de Aterro Sanitário em um sistema com reator anóxico e aeróbio com e sem adição de fonte externa de carbono para desnitrificação**. Trabalho de conclusão de curso para obtenção de título de Engenheiro Civil na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

YE, Z., YU. H., WEN, L., NI. J. Treatment of landfill leachate by immobilized microorganisms. **Sci China Ser B-Chem.**, vol. 51; n. 10. p. **1014-1020**, 2008.

YE, Lin; ZHANG, Tong. Estimation of nitrifier abundances in a partial nitrification reactor treating ammonium-rich saline wastewater using DGGE, T-RFLP and mathematical modeling. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V.88, p.1403-1412, 2010.

WANG, X. J., XIA, S. Q., CHEN, L., ZHAO, J. F., RENAULT, N. J., CHOVELON, J. M., Nutrients removal from municipal wastewater by chemical precipitation in a moving bed biofilm reactor. **Process Biochemistry**, v.41, n. 4, pp. 824-828, 2006.

WATANEBE, S., MASUDA, M., ISHIGURO, M. Simultaneous nitrification and denitrification in microaerobic biofilms. **Wat.Sci. Technol.**, v. 26.P. 511-522, 1992.

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

ANEXOS

DIAS	pH		Alcalinidade		NKT		N-amoniaco		N-OXIDADO	amônia livre	
	AF	EF	AF	EF	AF	EF	AF	EF		AF	EF
1	7,93	8,76	5362,2	1664,89	1142,7		1013,8	385,41			
3		8,27		1000,76						56,79	
4		7,61									
5		6,82		216,94				251,35	251,35		
8		7,05		229,41				276,02	276,02		
9		6,8									
10		7		166,24							
11		7,07		166,24							
12		7,06		168,78				280,68	280,68		
15		6,84		269,3		363,07		331,41	331,41		
18		6,4		144,62				351,89	351,89		
21		6,31		138,8		360,74					
24		6,25		125,5				326,3	326,3		
26		6,17		114,7				236,9	236,9		
27						215,28					
28	8,44	6,22	5628,9	110,55			1150,8	165,2	1316	189,09	0,19
31	8,74	5,77	6331,3				849,6	101,5	951,1	245,47	0,04
32											
33	7,9	6,52	5562,4				1005,8				
35		6,44		135,5	958,7	356,7	670,8	30,7	701,5	35,17	0,07
38		6,31		78,9				174,6	174,6		
40	8,79		7227,3				819,4			258,14	0,49
41		7,49		254,3				23,3	23,3		
48	7,66	7,25	5946,5	226				12,1	12,1	35,78	0,15
50		6,44		113							
52		6,2		111,4	1033,4	244,4	1164,2	149,4	1313,6	199,03	0,16
55	8,46	6	6293	101,4			960,3	178,7	1139	164,18	0,12
56											
59		6		107,2		237,4		90,8	90,8		
60	8,43		8679,3		844,8		835,9			134,63	0,06
62		6,32		127,5				17,7	17,7		
63	8,61		5385,8		705,2		672,1				
66	8,6	6,64	6150	126,5	812,3	130,3	778,3	10,3	788,6	174,34	0,03

Fase I

Dias	pH		Alcalinidade		NKT		N-amoniaco		N-oxidado	Amônia livre	
	AF	EF	AF	EF	AF	EF	AF	EF		AF	EF
68	8,60	6,97	6150,00	143,00			778,30			174,34	0
69		7,32		200,70		61,70					
70											
73	8,00	7,80	3855,10	322,50	965,80	118,70	989,10	17,20	1006,3	64,57	0,72
74		5,97		96,40							
75											
76	8,00	5,80	5384,50	88,90	653,90	118,70	1075,20	107,00	1182,2	70,19	0,05
80		5,62		65,70				165,70	165,7		
82		5,64		64,00				202,90	202,9		
84		5,30		64,80				272,30	272,3		
87	7,20	5,32	4716,20	65,60	990,00		1045,40	296,50	1341,9	11,33	0,04
89		5,24		48,20				334,70	334,7		
90											
91		5,30		59,00				289,00	289		
94	8,40	5,30	4291,80	56,40	891,50	162,90	719,60	141,50	861,1	109,13	0,02
96		5,09		58,18				60,90			
98	7,64	5,04	3798,50	59,00			916,50	77,20	993,7	24,62	0,01
104	8,46	7,52	3617,80	267,60	649,60	46,50	727,00	11,60	738,6	124,29	0,25
105											
108	8,10	7,67	5000,50	349,10		53,50	956,50		956,5	77,53	0
111	8,44	5,40	5003,80	61,50			722,40	36,30	758,7	109,56	0,01
112											
115	8,31		4383,80				963,90				
116	8,44	5,40	5003,80	61,50			722,40	36,30			
117		7,64		291,80				128,50			
119	8,30	6,50	4030,40	139,60			991,50	152,20	1143,7	122,59	0,33
122	7,80	4,90	4761,10	49,90			1033,80	77,80	1111,6	43,45	0
123	8,10	5,80	4681,30	91,40	1028,10	253,10					
125	8,20	5,40	4267,30	97,30			1055,70	304,80	1360,5	105,83	0,05
129	8,20	5,40	4165,20	131,30	1037,10	342,70	1066,40	299,80	1366,2	106,97	0,05
131		6,20		162,90				309,10	309,1		
133	9,40	6,50	6901,40	211,20				234,10	234,1		
136	8,30	6,00	6962,90	214,40	887,00	208,30	856,90	188,50	1045,4	105,95	0,13
139	8,20	7,40						135,30	135,3		
143	8,60	7,40	5147,20	339,20		199,40	549,70	30,00	579,7	123,13	0,51
145											
150	8,23	6,40	3815,90	133,90	920,80	152,30	734,40	19,50	753,9	73,67	0,03
152	8,20	5,00	3787,20	47,10				45,50			
154	8,20	5,30	4651,20	61,70			838,10	73,70	911,8	84,07	0,01
157	8,20	6,20	4238,70	151,00	1011,70	177,30	957,00	74,60	1031,6	96	0,08

DIAS	DQO		DBO		ST	SF	SV
	AF	EF	AF	EF			
1	1291,00		136,80				
3		1481,20					
4							
5							
8							
9		1340,00					
10							
11					23,00	50,00	*
12							
15		1320,30					
18							
21							
24		1233,30			98,00	116,00	*
26							
27							
28					16,00	52,00	*
31	1160,00	1073,00					
32							
33							
35			236,70	145,30	56,00	44,00	12,00
38							
40	1191,00						
41		828,10			24,00	72,00	*
48		826,90	103,80	82,20	42,00	53,00	
50							
52	1096,00	1044,80					
55							
56			183,40	152,20			
59		980,70					
60	958,30				23,00	23,00	0,00
62							
63			45,00	38,50			
66	1007,90	687,50			160,00	15,70	144,20

Fase I

	DIAS	DQO		DBO		ST	SF	SV
		AF	EF	AF	EF			
	68							
	69		1026,00					
	70			87,50	70,20			
	73	932,30	906,30			34,00	29,20	4,70
	74							
	75							
	76			33,00	28,00			
	80	1305,00	931,20			35,30	30,00	5,30
	82							
	84							
	87	1130,20	956,30			60,00	39,00	21,00
	89							
	90			141,30	136,70			
	91							
	94	1171,80	948,80			30,00	28,00	2,00
	96							
	98			99,20	97,10			
	104	1056,20	926,20			224,00	173,00	51,00
	105			118,20	108,20			
	108					305,00	256,00	49,00
	111							
	112	1295,40	863,70	107,00	87,50			
	115							
	116							
	117	1306,20	1010,40			86,00	76,00	21,00
	119			89,80	104,10			
	122	1306,30	984,40			45,00	38,50	6,50
	123							
	125			171,30	216,90			
	129	1395,80	939,50			81,30	78,80	2,50
	133			152,20	152,00			
	136	1445,30				102,00	80,00	22,00
	139							
	143	1284,70				300,00	260,00	40,00
	145			175,70	158,60			
	150	1046,80	1156,30			99,00	67,00	33,00
	154			140,80	123,40			
	157	1513,80	1130,60			173,00	106,00	67,00
Fase II	média	1245,37	981,64	119,64	116,61	121,12	97,04	25,00