

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

WILDER HENRIQUE LIMA

**ESTUDO MICROBIANO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO
TRATADO EM REATOR COMBINADO ANAERÓBIO-AERÓBIO**

CAMPO MOURÃO

2016

WILDER HENRIQUE LIMA

**ESTUDO MICROBIANO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO
TRATADO EM REATOR COMBINADO ANAERÓBIO-AERÓBIO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Engenharia Ambiental, do Departamento Acadêmico de Ambiental (DAAMB) do Câmpus Campo Mourão, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Kreutz

Co-Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina de Souza

CAMPO MOURÃO

2016

Dedico este trabalho as minhas avós Carmem e Odília, dois anjos de luz em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo qual fui ensinado e aprendi a amar e respeitar desde criança.

As energias que regem o universo e conduzem nossas vidas, as quais aprendi a compreender com o passar dos anos.

Aos meus pais e heróis, Nilda Aparecida Cruz Lima e Vitor Antônio Lima, por me apoiarem, nem sempre de bom grado, mas mesmo assim ao meu lado junto a esta caminhada, e principalmente pelo carinho e amor incondicionais dedicados a mim todos os dias, horas, minutos e segundos da minha vida.

Ao meu irmão, Túlio Felipe Cruz Lima, por todos os momentos ao meu lado, conselhos, ensinamentos e tão grande evolução espiritual da qual possuí.

Aos meus amigos, por tornarem suportável a graduação e a estadia longe de casa, principalmente a Martha Soudaleff que além de amiga, foi professora dos ensinamentos da graduação e da vida.

A todos os meus professores e mestres da universidade, dos quais aprendi tudo que sei até aqui, em especial a professora Débora Cristina de Souza.

A Cristiane Kreutz, que além de professora, orientadora, foi sempre amiga, parceira, e esteve sempre pronta a me ajudar resolver os problemas das correrias que a fiz passar.

Por fim, peço desculpas aos nomes que não foram citados, mas que certamente serão sempre lembrados em minha memória.

RESUMO

LIMA, H. W. **Estudo Microbiano de Efluente de Abatedouro Bovino Tratado em Reator Combinado Anaeróbio-Aeróbio**. 2016. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

A atividade de abate de bovinos utiliza uma grande quantidade de água que, em quase toda sua totalidade é descartada como efluente líquido. As águas residuárias contêm sangue, gordura, excrementos, substâncias contidas no trato digestivo dos animais, fragmentos de tecidos, entre outros, caracterizando um efluente com elevada concentração de matéria orgânica. Esse efluente, quando disposto ao meio ambiente sem tratamento, representa focos de proliferação de insetos e de agentes patogênicos, além de contaminação de águas superficiais e subterrâneas. O tratamento biológico é uma técnica que consiste em obter mais rapidamente e em melhores condições a desejada estabilização da matéria orgânica biodegradável, por processos físicos, químicos e biológicos. O tratamento mais recomendado aos dejetos e águas residuárias de instalações de bovinos é do tipo biológico. Diante do exposto, esta pesquisa objetivou avaliar a biomassa imobilizada em reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo empregado no tratamento biológico de efluente bruto de abatedouro bovino, estabelecendo a contagem de bactérias heterotróficas, bactérias nitrificantes e desnitrificantes presentes no meio suporte de acordo com as metodologias citadas pelos autores; Araújo Junior e Zaiat (2006) para quantificar a biomassa aderida ao meio suporte, Villas Bôas (1999) para contagem de bactérias heterótrofas, Tiedje (1984) para determinar o Número Mais Provável (NMP) de bactérias desnitrificantes e Schmidt e Belser (1984) para a estimativa do (NMP) de bactérias nitrificantes. Os resultados indicaram que o material suporte de carvão vegetal não apresentou condições favoráveis ao estabelecimento do biofilme, mostrando valores baixos entre 0,310g para ST e 0,302g para SVT de matéria seca aderida. O NMP das bactérias nitrificantes oxidadoras de nitrito, variaram entre $1,1 \times 10^2$ a $3,1 \times 10^3$ e das bactérias oxidadoras de amônia, variaram de $1,2 \times 10^4$ a $3,3 \times 10^6$, mostrando que as bactérias oxidadoras de nitrito apresentaram valores menores que das bactérias oxidadoras de amônia e das desnitrificantes variou entre $6,3 \times 10^4$ e $3,9 \times 10^5$, indicando que as condições ambientais e operacionais influenciaram no desenvolvimento das mesmas.

Palavras Chaves: reator combinado, biomassa imobilizada, bactérias nitrificantes.

ABSTRACT

LIMA, H. W. **Estudo Microbiano de Efluente de Abatedouro Bovino Tratado em Reator Combinado Anaeróbio-Aeróbio**. 2016. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

The slaughtering activity of cattle uses a large amount of water which, in its entirety, is discarded as a liquid effluent. Wastewater contains blood, fat, excreta, substances contained in the digestive tract of the animals, fragments of tissues, among others, characterizing an effluent with high concentration of organic matter. This effluent, when disposed to environment without treatment, representations of insect proliferation and pathogens, in addition to contamination of surface and groundwater. Biological treatment is a technique to obtain biodegradable organic matter more quickly and in a better way by physical, chemical and biological processes. The most recommended treatment for waste and waste water from cattle facilities is biological. In view of the above, this research aimed to evaluate a biomass immobilized in an anaerobic-aerobic fixed bed reactor used no biological treatment of bovine slaughterhouse raw effluent, buying a count of heterotrophic bacteria, nitrifying and denitrifying bacteria. Present in the medium support according to methodologies cited by the authors; Araújo Junior and Zaiat (2006) to quantify a biomass adhered to the support medium, Villas Bôas (1999) for counting heterotrophic bacteria, Tiedje (1984) to determine the number of denitrifying bacteria and Schmidt and Belser (1984) for the estimation of (NMP) of nitrifying bacteria. The results indicated that the material support of the charcoal did not present favorable conditions for the establishment of the biofilm, showing low values between 0.310g for ST and 0.302g for SVT and adherence dry matter rates. The NMP of the nitrite-oxidizing nitrifying bacteria varied from 1.1×10^2 to 3.1×10^3 and that the ammonia oxidizing bacteria ranged from 1.2×10^4 to 3.3×10^6 , showing that the oxidizing bacteria of Nitrite presented lower values than the ammonia oxidizing bacteria and the denitrifiers varied between 6.3×10^4 and 3.9×10^5 , indicating that as environmental and operational conditions influenced no development of the same.

Key-words: combined reactor, immobilized biomass, nitrifying bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático do RCAALF	22
Figura 2: Amostras da primeira coleta do biocarvão no RCAALF.....	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Diferença entre as médias nos pontos de coleta para sólidos totais (ST).	31
Gráfico 4: Diferença entre as médias nos pontos de coleta para bactérias desnitrificantes.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da biomassa aderida ao suporte de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT).	30
Tabela 2: Número mais provável de bactérias nitrificantes	33
Tabela 3: Número mais provável de bactérias desnitrificantes	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Efluentes de Abatedouro Bovino	11
3.2 Tratamento Biológico	12
3.2.1 Micro-organismos envolvidos no tratamento biológico	14
3.2.2 Remoção biológica de nitrogênio	17
3.2.2.1 Nitrificação.....	17
3.2.2.2 Desnitrificação	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Aparato Experimental	21
4.2 Quantificação da Biomassa Aderida	24
4.3 Análises Microbiológicas	25
4.3.1 Bactérias Nitrificantes.....	25
4.3.2 Bactérias Desnitrificantes	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 Quantificação da biomassa aderida ao meio suporte	30
5.2 Análises Microbiológicas	33
5.2.1 Bactérias Nitrificantes.....	33
5.2.2 Bactérias Desnitrificantes	36
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A poluição de corpos hídricos pode ser determinada como qualquer alteração física, química ou biológica, capaz de ultrapassar os padrões estabelecidos pelas legislações ambientais. Estas têm como objeto manter a qualidade conforme o uso preponderante (SILVA, 2011).

Em abatedouros, assim como em vários tipos de indústrias, o alto consumo de água acarreta grandes volumes de efluentes. Nestes estabelecimentos de 80 a 95% da água consumida é descarregada como efluente líquido, que possui alta taxa de matéria orgânica o que traz altas concentrações de nitrogênio. Mesmo após tratamento a concentração de matéria orgânica apresenta valores maiores que 15 mg.L^{-1} , acima dos padrões previstos pela resolução (CONAMA 430/2011). Tais processos podem trazer danos à saúde pública e à vida aquática, como o aumento do consumo de oxigênio dissolvido nos corpos hídricos (UNEP; DEPA; COWI, 2000).

Para evitar esses impactos e alcançar os limites de lançamento de águas residuárias, estabelecido na legislação ambiental vigente, é necessária utilização de processos de tratamento prévio. A escolha do processo ideal dependerá principalmente das características do efluente. Como já mencionado, os efluentes de abatedouro bovino apresentam uma grande quantidade de matéria orgânica favorecendo o tratamento biológico, que pode ser anaeróbio, aeróbio ou combinado aeróbio-anaeróbio (ARRUDA, 2004).

A massa microbiana que envolve os processos aeróbios é constituída basicamente por bactérias e protozoários. Organismos, como fungos e rotíferos podem ser eventualmente encontrados. De maneira geral, pode-se dizer que a diversidade de espécies de micro-organismos da biomassa é pequena (VON SPERLING, 1996).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi quantificar a biomassa imobilizada em reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo e a partir desta, avaliar a influência qualitativa das bactérias heterotróficas, nitrificantes e desnitrificantes presentes no meio suporte, a fim de observar seu desempenho e desenvolvimento ao longo do processo de tratamento do efluente em reator combinado anaeróbio-aeróbio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a biomassa imobilizada em reator combinado anaeróbio-aeróbio de leito fixo, empregado no tratamento de efluente de abatedouro bovino, com o propósito de conhecer o consórcio microbiano existente.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a biomassa aderida ao meio suporte;
- Realizar a contagem de bactérias nitrificantes e desnitrificantes;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Efluentes de Abatedouro Bovino

Em 2010, o rebanho bovino representava um dos maiores rebanhos de animais do Brasil e do mundo, com cerca de 207 milhões de cabeças. O abate de bovinos é uma das atividades econômicas mais importantes no mercado brasileiro, tendo em vista que o Brasil é um dos maiores consumidores e exportadores da carne bovina do mundo. No entanto, o setor deve cumprir todas as leis sanitárias para que não haja recusa do produto pelos compradores, bem como garantir a proteção do meio ambiente (ANUALPEC, 2010).

O efluente dos matadouros possui uma elevada vazão e grande carga de sólidos em suspensão, nitrogênio orgânico e uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) na ordem de 4.200 mg.L^{-1} em média (AGUILAR, 2002), dependendo do reaproveitamento ou do tratamento do efluente. Devido à sua constituição, esses despejos são altamente putrescíveis, iniciando sua decomposição em poucas horas e formando gases malcheirosos (PACHECO; WOLFF, 2004).

Para o abate de bovinos são utilizados, em média, 2500 litros de água por cabeça, sendo que esse volume é descartado como efluente (SCARASSATI et al., 2003). Os principais constituintes dessas águas residuárias são compostos orgânicos e biodegradáveis, expressos principalmente por gorduras e proteínas presentes, tanto na forma particulada quanto dissolvida (SILVA, 2011).

A resolução nº. 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 13 de maio de 2011, dispõem sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores, alterando parcialmente e complementando a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. O artigo nº 16 desta resolução cita as condições e padrões de lançamento de efluente (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2011).

Toda vez que se gera um resíduo industrial, é necessário que exista uma alternativa para o seu tratamento, pois este não deve ser acumulado, indefinidamente em um determinado local e muito menos disseminar seus resíduos no ambiente de qualquer maneira, lançando-os na atmosfera, nas águas ou no solo (ARRUDA, 2004).

A água residuária é um dos contribuintes para a poluição aquática, além de aumentar a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a carga de nutrientes de corpos d'água, causam impactos negativos ao ambiente e levam à desestabilização de ecossistemas aquáticos (MORRISON et al., 2001). A qualidade da água disponível e acessível tem grande impacto no padrão de vida e bem-estar da população (ODJADJARE; OKOH, 2010).

3.2 Tratamento Biológico

O tratamento biológico aeróbio é uma reprodução do mecanismo de biodegradação que ocorre naturalmente nos rios, processo denominado de autodepuração. Este processo se realiza através da estabilização biológica (biodegradação) da matéria orgânica. Em condições aeróbias, o mecanismo envolvido na biodegradação (processada por bactérias) é a respiração celular que promove a oxidação de compostos orgânicos com quebra de moléculas complexas, transformando-as em moléculas mais simples e mais estáveis. Neste caso, o oxigênio é o principal acceptor de elétrons gerados a partir da degradação destes compostos. Além disso, durante o metabolismo respiratório ocorre a liberação de energia necessária para o crescimento e manutenção das células bacterianas (VAZOLLÈR; GARCIA; CONCEIÇÃO NETO, 1991).

A digestão anaeróbia é um processo que oferece efetiva proteção ao ambiente, a baixo custo. Os processos anaeróbios requerem, em geral, menor espaço e tem baixa produção de lodo, estimada como sendo inferior a 20% da apresentada por processos aeróbios convencionais e, também, oferecem a possibilidade de recuperação e utilização do gás metano como combustível (CHERNICHARO, 1997).

Em sistemas aeróbios a fração de material anabolizado é de 67%, sendo catabolizados apenas 33%, em reatores anaeróbios 3% do material orgânico é anabolizado e 97% é catabolizado (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994).

Os sistemas biológicos podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com a locação da biomassa dentro do reator: biomassa em suspensão e biomassa fixa. Um terceiro grupo pode ser criado caso una-se os dois tipos sendo conhecido como um sistema híbrido de tratamento (LAMEGO NETO, 2008).

Ainda segundo o autor, os processos de tratamento de efluentes com biomassa fixa são aqueles que utilizam meio suporte para fixação dos micro-organismos. As características do material influenciam diretamente na eficiência de remoção de poluentes do efluente.

O tratamento com biomassa fixa apresenta vantagem em relação ao processo com lodo ativado, uma vez que, é menos dependente de boa decantação, menor sensibilidade a toxinas e apresenta coexistência da atividade metabólica anóxica e aeróbia dentro de um mesmo micro ecossistema de biomassa (LAMEGO NETO, 2008; GONÇALVES et al., 2001).

Alguns fatores ambientais como temperatura, pH (potencial hidrogeniônico) e toxicidade interferem nos processos aeróbios e anaeróbios. Segundo CARVALHAL (1999), cada bactéria tem uma condição ótima de temperatura na qual apresenta a maior velocidade de crescimento em condições ideais. Desta forma o crescimento torna-se mais lento (maior tempo de geração) na medida em que a temperatura se afasta da temperatura ótima. Para qualquer micro-organismo, existe uma temperatura máxima e mínima acima ou abaixo da qual não ocorre crescimento celular.

Na faixa mesofílica (20-45°C), a temperatura ótima se situa em torno de 35°C e na faixa termofílica (45-65°C), em torno de 55°C (SOARES; HIRATA, 1997). Segundo SOARES (1990), o processo apresenta uma maior instabilidade nos seus parâmetros de controle, quando operado na faixa termofílica, e quando ocorre variação da temperatura, esse problema se agrava podendo afetar mais seriamente o processo.

Já para Van Haandel e Lettinga (1994), a digestão anaeróbia é possível à temperatura baixa (10°C), mas a eficiência e a carga orgânica diminuem muito com a diminuição da temperatura. Os micro-organismos anaeróbios são mais sensíveis à temperatura do que os aeróbios. Na realidade, as bactérias metanogênicas são mais sensíveis do que as acidogênicas, portanto um aumento de ácidos voláteis pode ser o resultado de baixas temperaturas porque a velocidade das metanogênicas é afetada, e conseqüentemente há uma queda de pH.

Segundo Speece (1996) para cada 5°C de queda de temperatura há um declínio de 34% da atividade dos micro-organismos, o mesmo, autor considera a temperatura ótima na faixa de 25 a 30 °C para processos mesofílicos. Já o pH, altera

as cargas dos sítios ativos das enzimas, modificando suas estruturas e conseqüentemente perdendo suas características.

Existem micro-organismos que possuem uma faixa mais ampla de sobrevivência do que outros. A grande maioria dos micro-organismos em sistemas de tratamento microbiológico de águas residuárias tem atividade ótima em valores de pH em torno da neutralidade (CARVALHAL, 1999).

Em sistemas onde existe uma série de micro-organismos atuando em forma de consórcios, deve-se buscar a faixa de pH onde se propicia o crescimento máximo da maior parte dos micro-organismos envolvidos (SOARES, 1990).

O valor e a estabilidade do pH no reator anaeróbio são extremamente importantes: uma concentração elevada de bactérias metanogênicas só pode se desenvolver quando o pH se mantém numa faixa estreita, perto do valor neutro: se o pH tiver um valor menor de 6,3 ou superior a 7,8 a concentração de bactérias metanogênicas diminui rapidamente (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994).

A adequada degradação dos efluentes por qualquer processo biológico depende da manutenção de um ambiente favorável para os micro-organismos, incluindo o controle e a eliminação de constituintes tóxicos. A toxicidade tem sido considerada uma das principais razões para a não aplicação de processos anaeróbios, pois as bactérias metanogênicas são facilmente inibidas por toxinas, devido a sua pequena fração de substratos sintetizados em células e ao elevado tempo de geração dessas bactérias. Os micro-organismos possuem um grau de adaptação a concentrações inibitórias, desde que certas condições de projeto sejam favorecidas como elevados tempos de residência de sólidos e minimização do tempo de residência das toxinas no sistema (CHERNICHARO, 1997).

3.2.1 Micro-organismos envolvidos no tratamento biológico

A microbiota é indicadora de uma série de conjuntos e parâmetros dos quais um deles se destaca, o processo de lodos ativados, uma vez que sua natureza varia com o nível de depuração, com a concentração de oxigênio dissolvido, com a presença de substâncias tóxicas, daí a importância em se realizar a análise da microbiota do sistema (MADONI, 1997).

Os organismos vivos podem ser agrupados em categorias de acordo com a forma que usam o carbono e a energia do ambiente. As bactérias heterotróficas

obtêm o carbono a partir de compostos orgânicos para o seu desenvolvimento (GERALDI, 1994).

Bactérias são organismos unicelulares procariotos, podendo apresentar-se isoladamente ou formando colônias do tipo filamentosas, semelhantes a cachos de uva e outros (VON SPERLING, 1996).

Assim como as bactérias heterotróficas, estão incluídas neste grupo tanto bactérias patogênicas como aquelas pertencentes ao grupo dos coliformes do qual obtêm o carbono a partir de compostos orgânicos, entretanto, de acordo com estudos epidemiológicos, foi concluído que, na ausência de contaminação fecal, não há uma associação direta entre as concentrações de bactérias heterotróficas na água de consumo humano e efeitos à saúde da população (BARTRAM et al., 2003).

De acordo com a legislação brasileira vigente para água de consumo humano, as bactérias heterotróficas não são utilizadas como critério de qualidade, mas sua concentração deve ser determinada em 20% das amostras analisadas quanto à presença de coliformes e seu valor não deve ultrapassar 500 UFC/mL (BRASIL, 2004). Quanto à água mineral natural e à água natural, a legislação estabelece que a contagem de bactérias heterotróficas seja realizada diariamente na fonte ou poço (BRASIL, 2000).

As bactérias nitrificantes são muito sensíveis a fatores ambientais e operacionais que podem influenciar diretamente em seu metabolismo de forma a interferir na taxa de crescimento e, como consequência, a taxa de oxidação da amônia. Como exemplo desses fatores tem-se a temperatura, o pH, a concentração de oxigênio dissolvido e à presença de substâncias tóxicas ou inibidoras, que exercem influência direta sobre o crescimento das bactérias, conforme já comprovado por vários pesquisadores (DOWNING, 1978).

O processo de nitrificação é considerado vulnerável no tratamento de efluentes, no qual o crescimento das bactérias nitrificantes é lento e a sensibilidade as condições do meio como a temperatura, o pH e oxigênio dissolvido são fatores limitantes que podem interferir tanto positivamente quanto negativamente no desenvolvimento do mesmo (CAMPOS, 2006).

O processo de nitrificação em um sistema de tratamento biológico irá ocorrer seguindo parâmetros como: tempo de retenção celular, configuração do sistema e tempo de detenção hidráulica. Além das condições operacionais: temperatura, pH,

oxigênio dissolvido, alcalinidade, relação entre carbono e nitrogênio (C/N), concentração de amônia livre, toxicidade e outras (OLIVEIRA, 2012).

Quando há disponibilidade de matéria orgânica biologicamente biodegradável e tendo o carbono como fonte de energia para a geração de material celular e na ausência de oxigênio dissolvido ocorre o processo de desnitrificação (FREITAS, 2009).

As bactérias desnitrificantes apresentam velocidade de desenvolvimento elevado se comparado as nitrificantes, uma vez que são na maioria bactérias heterotróficas e utilizam o substrato orgânico como fonte de carbono, ou são facultativas, ou seja, em ambiente aeróbio utilizam o oxigênio como receptor final de elétrons e em ambientes anaeróbios utilizam o nitrato e/ou nitrito como receptor de elétrons. Fatores que influenciam a desnitrificação podem ser a concentração de nitrato; a ausência de oxigênio dissolvido; pH e temperatura (BITTON, 2005).

Pseudomonas, Paraccocus, Alcaligenes, Thiobacillus, Micrococcus, Achromobacter, Aerobacter, Brevibacterium, Flavobacterium, Lactobacillus, Proteus, Spirillum, Bacillus são alguns gêneros de bactérias desnitrificantes que mais se encontram nos efluentes, todavia o tipo de efluente tratado varia para os gêneros encontrados no tratamento (OLIVEIRA, 2012).

A nitrificação por via curta pode proporcionar uma economia de até 25% na demanda de oxigênio dissolvido e até 40% na demanda de matéria orgânica necessária para desnitrificação (FREITAS, 2009).

Em efluentes dos mais variados tipos, os protozoários, e principalmente os ciliados, são muito numerosos em todos os tipos de tratamento aeróbico das águas, alcançando densidades da ordem de 10.000 células por mL no tanque de arejamento e representando cerca de 9% da biomassa em suspensão (MADONI, 1997).

Os protozoários são organismos unicelulares, eucariotas, compostos por uma massa de protoplasma. A maior parte é definida por organismos heterotróficos e aeróbios estritos. São organismos que podem se alimentar de bactérias e costumam apresentar tamanho superior a elas. Suas principais atuações estão relacionadas ao consumo da matéria orgânica, consumo de bactérias livres e participação na formação de flocos (VON SPERLING, 1996).

Os principais grupos de protozoários encontrados são classificados em: amebas, flagelados, ciliados de vida livre, e rotíferos. Os protozoários são

importantes no tratamento biológico de efluentes pois auxiliam na degradação da matéria orgânica (JENKINS et al., 2003).

3.2.2 Remoção biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um nutriente importante, pois compõe as moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, sendo um componente limitante à vida. Nos efluentes, o nitrogênio pode ser encontrado em forma de nitrogênio orgânico e nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato (VON SPERLING, 1997; HAANDEL; MARAIS, 1999).

A remoção de nitrogênio pela maneira convencional necessita de uma etapa aeróbia, para promover a nitrificação, e outra anaeróbia para realizar a desnitrificação (LI; NAKHLA; ZHU, 2012).

3.2.2.1 Nitrificação

O processo de nitrificação ocorre sob condição aeróbia, em que bactérias quimioautotróficas empregam dióxido de carbono como fonte de carbono e oxigênio como receptor final de elétrons. A energia para manutenção e síntese celular é proveniente da oxidação de compostos inorgânicos como amônia e nitrito. (HAANDEL; MARAIS, 1999; METCALF; EDDY, 2003).

As fases da nitrificação envolvem diferentes gêneros de bactérias, sendo que os principais responsáveis pela nitritação são *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*. No processo de nitratação, evidencia-se o gênero *Nitrobacter*, mas são conhecidos outros gêneros como: *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina* (RITTMANN; MCCARTY, 2001).

As Equações 1 e 2 representam o processo de nitritação e nitratação respectivamente.



A quantidade estequiométrica de oxigênio requerido, de acordo com as Equações 1 e 2, são de 3,43 mgO₂ / mg NH₄⁺ para a nitritação e de 1,14 mgO₂ / mg

N-NO₂ para nitratação, fazendo uma demanda teórica de oxigênio para nitrificação de 4,57 mg O₂ / mg N-NH₄⁺ (SHARMA; AHLERT, 1977; METCALF; EDDY, 2003).

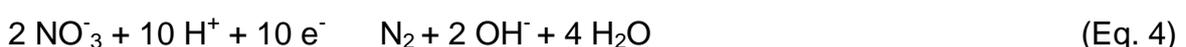
Um fator crucial na nitrificação é a alcalinidade, que mantém o pH do meio próximo a neutralidade. Durante o processo de nitrificação uma grande quantidade de alcalinidade é consumida, devido a liberação do íon H⁺ para o meio. Para a oxidação de 1,0 g de N-NH₄⁺, são gastos 7,14 g de CaCO₃ ou 8,64 g de HCO₃⁻ (SEDLAK, 1991; METCALF; EDDY, 2003).

Outros parâmetros importantes que influenciam diretamente o processo de nitrificação são a temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD), tempo de retenção celular (TRC) e tempo de detenção hidráulico (TDH). As melhores temperaturas para o processo encontram-se na faixa de 25 a 35° C. No que diz respeito ao pH, os valores recomendados para a nitrificação, situam-se entre 7,2 e 9,0 pois valores de pH abaixo de 7,0 ou acima de 9,5 fazem com que a taxa de nitrificação seja reduzida 22 a metade da taxa ótima. Quanto à concentração de OD, valores superiores a 2 mg.L⁻¹ são suficientes para se atingir a nitrificação (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1993).

3.2.2.2 Desnitrificação

A etapa seguinte do processo de remoção de nitrogênio é a desnitrificação, onde os produtos da nitrificação, nitrito e nitrato são reduzidos a nitrogênio gasoso por bactérias heterotróficas, que utilizam nitrito e/ou nitrato como receptor final de elétrons e matéria orgânica como fonte de carbono e energia. O carbono utilizado pode ser de fonte endógena ou exógena, depende da disponibilidade ou não de matéria orgânica no efluente. Diferente do que acontece no processo de nitrificação, na desnitrificação ocorre produção de alcalinidade, onde 50% da alcalinidade consumida pela nitrificação é recuperada na seguinte proporção: à medida que 1mg NO₃⁻ é reduzido à N₂ gasoso são produzidos 3,58 mg de alcalinidade na forma de CaCO₃ (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1993).

Abaixo, nas Equações 3 e 4 são apresentadas as estequiometrias do processo de desnitrificação via nitrito e nitrato consecutivamente.



Segundo Rittmann e Mccarty (2001), as bactérias que participam do processo de desnitrificação, geralmente são gram-negativas e pertencem às classes alfa e beta das Proteobactérias, como os gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. No meio ambiente existem também bactérias grampositivas, que inclui o gênero *Bacillus* e algumas arqueias halofílicas (*Halobacterium*), com grande capacidade para realizar a desnitrificação.

De acordo com Jeyanayagam (2005), a temperatura, o pH e a concentração de oxigênio, como na nitrificação, também influenciam no processo de desnitrificação, a desnitrificação se desenvolve a temperaturas que ficam na faixa de 11 a 31°C. A taxa de desnitrificação diminui em valores de pH inferiores a 6,1 e superiores a 9,1, sendo o intervalo ideal entre 6,4 e 8,1. Manter a temperatura sob controle traz benefícios para os processos nitrificação e desnitrificação, que são afetados por variações deste parâmetro.

Os sistemas com elevada eficiência de remoção de amônia são mais comprometidos pela temperatura, comparados aos sistemas onde a taxa de nitrificação é menor. A taxa de nitrificação aumenta com a temperatura de 23, 30 a 35° C e diminui quando a temperatura decresce de 20° C para 10 °C, em quase 30% de eficiência (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY,1993).

A concentração de oxigênio também é um fator limitante e regulador do processo de nitrificação, no tratamento de efluentes com alta carga de nitrogênio, isto é facilmente perceptível e essencial na remoção de nitrogênio via acúmulo de nitrito. A taxa de remoção do nitrogênio amoniacal diminui em baixas concentrações de oxigênio, uma vez que os micro-organismos nitrificantes e heterotróficos competem pelo oxigênio, que acaba sendo capturado pela biomassa heterotrófica. (RUIZ; JEISON; RUBILAR, 2006; et al., 2007)

De acordo com Joo, Hirai e Shoda (2005), algumas bactérias, sob determinadas condições, podem nitrificar de maneira heterotrófica e desnitrificar de maneira aeróbia, como por exemplo, as *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Thiosphaera pantotropha*, *Comamonas sp* e *Alcaligenes faecalis*. Esses micro-organismos vêm sendo estudados por possuírem potencial no contexto dos novos processos relacionados à remoção de nitrogênio, que mostram sistemas de tratamento de efluentes que usualmente utilizam unidades separadas para promover a remoção de matéria orgânica e nitrogênio.

Esses sistemas geralmente apresentam custos elevados de construção e operação, pois além dos gastos com fonte externa de carbono e com energia, torna-se necessário a construção de um segundo tanque para desnitrificação (MORITA; UEMOTO; WATANABE, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aparato Experimental

Para o desenvolvimento da pesquisa foi utilizado um reator combinado anaeróbio-aeróbio de leito fixo (RCAALF), confeccionado em um tubo de *plexiglass* com formato cilíndrico (90 mm de diâmetro interno e 1000 mm de comprimento), com volume total de aproximadamente 6,5 L e volume útil de aproximadamente 4,75L (Figura 1). O reator foi operado com regime de escoamento ascendente e fluxo contínuo formado por uma câmara de alimentação e um leito reacional, sendo dividido em duas zonas de atividade: zona anaeróbia e zona aeróbia.

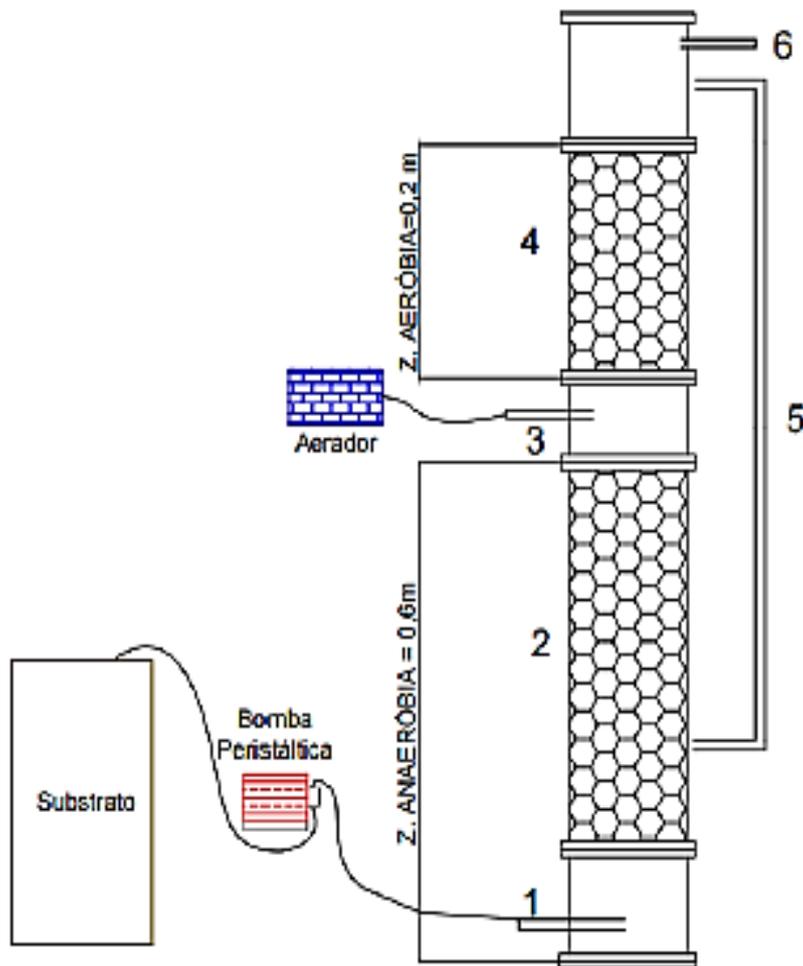


Figura 1: Desenho esquemático do RCAALF

Legenda: (1) Entrada do afluente; (2) Zona anaeróbia; (3) Aeração; (4) Zona aeróbia; (5) Recirculação; (6) Saída do efluente tratado

Fonte: CUNHA (2015).

Os compartimentos que caracterizam as zonas anaeróbia e aeróbia são preenchidos com material suporte. Para a imobilização da biomassa, utilizou-se biocarvão, produzido a partir da queima da casca do coco.

As coletas foram realizadas em três pontos do reator que foram denominados respectivamente para este estudo de P1, P2 e P3. Os pontos de coleta, a periodicidade e o tipo de análises a ser realizada estão identificados no Quadro 1.

Quadro 1: Pontos de coleta e periodicidade amostral

Ponto	Descrição do ponto de coleta	Tipo de análise	Periodicidade
P1	Entrada do compartimento anaeróbio, localizado a aproximadamente 0,13 metros da base do reator.	Quantificação da biomassa	Mensal
		Bactérias heterotróficas	Quinzenal*
		Bactérias nitrificantes	Quinzenal*
		Bactérias desnitrificantes	Quinzenal*
P2	Saída do compartimento anaeróbio que sofre influência da aeração, localizado a aproximadamente 0,70 metros da base do reator.	Quantificação da biomassa	Mensal
		Bactérias heterotróficas	Quinzenal*
		Bactérias nitrificantes	Quinzenal*
		Bactérias desnitrificantes	Quinzenal*
P3	Entrada do compartimento aeróbio, localizado a aproximadamente 0,85 metros da base do reator	Quantificação da biomassa	Mensal
		Bactérias heterotróficas	Quinzenal*
		Bactérias nitrificantes	Quinzenal*
		Bactérias desnitrificantes	Quinzenal*

* coletas realizadas a cada 15 dias, num período total de 135 dias.

Fonte: autoria própria

As análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

4.2 Quantificação da Biomassa Aderida

Para quantificar a biomassa aderida ao meio suporte foi aplicado o procedimento analítico desenvolvido por Araújo Junior e Zaiat (2006). Amostras do biocarvão foram coletadas uma vez por mês, nos meses de setembro, outubro e novembro de 2015, em três pontos do reator combinado anaeróbio-aeróbio de leito fixo (RCAALF), conforme definido no Quadro 1 e detalhada abaixo.

1. Será coletado uma porção de suporte no qual a biomassa ficará aderida e será transferida para um frasco de 50 ml;
2. Serão adicionadas ao frasco 10 ml de água destilada e também pérolas de vidro;
3. O frasco será tampado e agitado energeticamente durante 20 minutos, onde se espera que seja promovido o desprendimento da biomassa do suporte;
4. Após agitação, o líquido será separado do suporte e das pérolas de vidro e transferido para uma cápsula de porcelana de 50 ml, previamente pesada (P0). A porção de suporte será transferida para uma cápsula de vidro. Utilizando-se cerca de 5 ml de água destilada para lavagem das pérolas de vidro;
5. A cápsula de porcelana contendo o líquido separado e a cápsula de vidro contendo o suporte serão levadas à estufa, ajustada para temperatura de 105°C, onde permanecerão até o peso constante por cerca de 24 horas;
6. Decorrido o tempo de secagem, a cápsula de porcelana e os suportes serão pesados, obtendo-se as respectivas massas P1 e P_{suporte};
7. Após pesagem, a cápsula de porcelana será transferida para a mufla, ajustada para temperatura de 500°C, onde permanecerá por 2 horas;
8. Finalmente, após a calcinação na mufla, a cápsula de porcelana contendo o líquido separado novamente será pesada, obtendo-se o valor de P2;

Este procedimento será executado ao final da etapa experimental, quando as amostras forem retiradas após a abertura do reator. Assim, serão calculadas as massas de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT) aderidos por massa de suporte, conforme apresentados nas Equações 1 e 2.

$$ST = \frac{P1 - P0}{P_{suporte}} (1)$$

$$SVT = \frac{P1-P2}{P_{suporte}} (2)$$

Em função dos dados apresentarem comportamento não paramétrico, considerando $n = 3$ optou-se pelo teste de análise de variância de Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95%, para verificar se há diferença na contagem entre os microrganismos nos pontos de coleta (P1, P2 e P3), ao longo da altura do reator, utilizando o programa Bioestat, versão 5.3.

A hipótese para este caso foi:

H0 = Não há diferença na contagem entre os microrganismos

H1 = Há diferença na contagem entre os microrganismos

4.3 Análises Microbiológicas

O estudo microbiológico do RCAALF, empregado no tratamento de efluente bruto de abatedouro bovino, foi realizado pela quantificação de bactérias heterótrofas, bactérias nitrificantes e bactérias desnitrificantes, cujos métodos são descritos na sequência.

4.3.1 Bactérias Nitrificantes

A estimativa do Número Mais Provável (NMP) de bactérias nitrificantes foi realizada segundo o método descrito por Schmidt e Belser¹ (1984 apud MENDONÇA, 2002), adaptando-o para amostras de efluentes, visto que o método foi desenvolvido para amostras de solo.

Foram realizadas, conforme Quadro 1, coletas de amostras de material suporte, em 3 pontos distintos do reator, sendo efetuadas 5 diluições para cada amostra.

O processo de nitrificação ocorre em duas etapas: a nitrificação e a nitratação. A nitrificação é a formação de nitrito após consumo do nitrogênio amoniacal, pelas bactérias oxidadoras de amônia, enquanto que a nitratação é a formação de nitrato após consumo do nitrito, pelas bactérias oxidadoras de nitrito.

¹ SCHMIDT, E. L. & BELSER, L. W. Nitrifying Bacteria. In: Methods of Soil Analysis. **Chemical and Microbiological Properties**, Number 9, Part 2, 2^a ed., p.1027-1042, Wisconsin, Estados Unidos, 1984.

Assim, a determinação do NMP das bactérias nitrificantes será realizada também em duas etapas: o NMP das bactérias oxidadoras de amônia e o NMP das bactérias oxidadoras de nitrito, também segundo método descrito por Schmidt & Belser (1984).

- Bactérias Oxidadoras de Amônia:

1. Preparo do meio de cultura: O meio de cultura foi preparado, em um bécker, com as soluções listadas na Tabela 4.5, completando o volume para 500 mL, com água Milli-Q.

2. Correção do pH: Após o preparo, o pH do meio foi corrigido com gotas do sobrenadante da solução supersaturada de Na_2CO_3 para valor aproximadamente igual a 7,5.

- Procedimento:

1. Foram adicionados 9 mL do meio de cultura em cada tubo de ensaio, sendo utilizados 5 tubos para cada diluição;

2. Foi adicionada quantidade mínima de CaCO_3 , em cada tubo de ensaio, para tamponar a solução. Periodicamente os tubos eram agitados para a correção do pH;

3. Foram adicionados pequenos pedaços do carvão vegetal. A colocação do carvão deve-se ao fato que as bactérias nitrificantes oxidadoras de amônia possuem a tendência de aderir a meios suportes devido à liberação de polímeros extracelulares (Hagopian & Riley, 1998);

4. Os tubos foram tampados com rolhas de algodão envolto em gaze;

5. Foi feita a esterilização dos tubos, em autoclave, por 20 minutos sob pressão de 1atm e temperatura de 120°C ;

6. Foi adicionado 1mL de amostra previamente diluída, sob condição de assepsia, em cada tubo de ensaio contendo o meio de cultura. Esse procedimento foi realizado para cada diluição utilizada;

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

- Soluções-teste:

1. Solução 1: foi dissolvido 0,5 g de sulfanilamida em 100mL de ácido clorídrico (HCl) 2,4N. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração;

2. Solução 2: foi dissolvido 0,3 g de N-naftil-etilenodiamina hidrocloreto em

100 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,12N. A solução foi armazenada em frasco escuro, sob refrigeração.

- Determinação de nitrito após incubação:

Após a retirada do material incubado, foram feitos testes para verificar se o nitrogênio amoniacal tinha sido consumido.

1. De cada diluição, foram testados os 5 tubos separadamente;
2. Foi retirada septicamente uma alíquota de 0,5mL de cada tubo e colocada em um pequeno tubo;
3. Neste pequeno tubo, adicionou-se 2 a 3 gotas da Solução 1 e, em seguida, 2 a 3 gotas da Solução 2.

- Resultado:

Após a adição das soluções 1 e 2, a coloração de rosa a vermelho significa presença de nitrito e, portanto, pode haver a presença de bactérias oxidadoras de amônia (resultado positivo). Dos tubos positivos foi feita manutenção e isolamento das cepas nitritantes.

- Bactérias Oxidadoras de Nitrito:

1. Preparo do meio de cultura: O meio de cultura foi preparado, em um bécker, com as soluções listadas na Tabela 2, completando o volume para 500 mL, com água MilliQ.

2. Correção do pH: Após o preparo, o pH do meio foi corrigido com gotas de sobrenadante da solução supersaturada de Na_2CO_3 para valores compreendidos entre 7,2 e 7,5.

3. Procedimento: descrito no item 4.4.1

4. Soluções-teste: descritas no item 4.4.1.

5. Determinação de nitrato após incubação: descrita no item 4.4.1

6. Resultado:

Após a adição das soluções 1 e 2, 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. Dos tubos positivos foi feita manutenção e isolamento das cepas nitratantes.

4.3.2 Bactérias Desnitrificantes

O Número Mais Provável (NMP) de bactérias desnitrificantes foi estimado, seguindo o método descrito por Tiedje² (1984 apud MENDONÇA, 2002), adaptando-o para amostras de esgoto sanitário, pois o método foi desenvolvido para amostras de solo.

Após o período de incubação e adição da solução teste nos tubos a ausência de coloração nas amostras é indicativo de consumo de nitrato e possível presença de bactérias desnitrificantes, sendo então considerado resultado positivo.

Assim como no procedimento para determinação das bactérias nitrificantes, para as desnitrificantes também foram realizadas 3 coletas de amostras de material suporte em 3 pontos distintos do reator, sendo efetuadas 5 diluições para cada amostra.

- Meio de cultura:

Serão dissolvidos, em um bécker, 2g de meio nutriente genérico (*nutrient broth*-Acumedia) e 0,107g de NaNO₃ e o volume completado para 250mL com água Milli-Q.

- Procedimento:

1. Serão adicionados 4,5mL do meio de cultura em cada tubo de ensaio, sendo utilizados 5 tubos para cada diluição;
2. Os tubos serão tampados com rolhas de algodão envolto em gaze;
3. Será feita a esterilização dos tubos, em autoclave, por 20 minutos sob pressão de 1atm e temperatura de 120 °C;
4. Será adicionado 0,5mL de amostra previamente diluída, sob ambiente de assepsia, em cada tubo de ensaio contendo o meio de cultura. Esse procedimento será realizado para cada diluição utilizada;
5. Os tubos serão vedados com rolhas de borracha e incubados a 30 °C, durante 15 dias.

- Solução-teste:

Serão dissolvidos 0,2g de difenilamina [(C₆H₅)₂NH] em 100 mL de ácido sulfúrico

² TIEDJE, J. Denitrification. In: Methods of Soil Analysis. **Chemical and Microbiological Properties**, Number 9, Part 2, 2^a ed., p.1011-1026, Wisconsin, Estados Unidos, 1984.

(H₂SO₄) concentrado. A solução será armazenada em um frasco escuro, sob refrigeração.

- Determinação de nitrato remanescente após incubação:

Após a retirada do material incubado, serão feitos testes para verificar se o nitrato terá sido consumido.

1. De cada diluição, serão testados os 5 tubos separadamente;
2. Será retirada septicamente uma alíquota de 0,5mL de cada tubo e colocada em um pequeno tubo;
3. Neste pequeno tubo, será adicionado 2 a 3 gotas da solução de difenilamina (a reação é muito rápida).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Quantificação da biomassa aderida ao meio suporte

Os resultados da biomassa aderida ao meio suporte, analisados em termos de sólidos totais (ST) e Sólidos Voláteis Totais (SVT) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados da biomassa aderida ao suporte de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT).

PONTO	ST(g)			SVT(g)		
	Set	Out	Nov	Set	Out	Nov
P1	0,0282	0,0302	0,0310	0,0279	0,0301	0,0302
P2	0,0221	0,0270	0,0231	0,0261	0,0293	0,0281
P3	0,0207	0,0221	0,0219	0,0204	0,0263	0,0252

Fonte: autoria própria

Amostras do biocarvão retiradas nos respectivos pontos de coleta do reator, no mês de setembro de 2015, estão apresentadas na Figura 2.



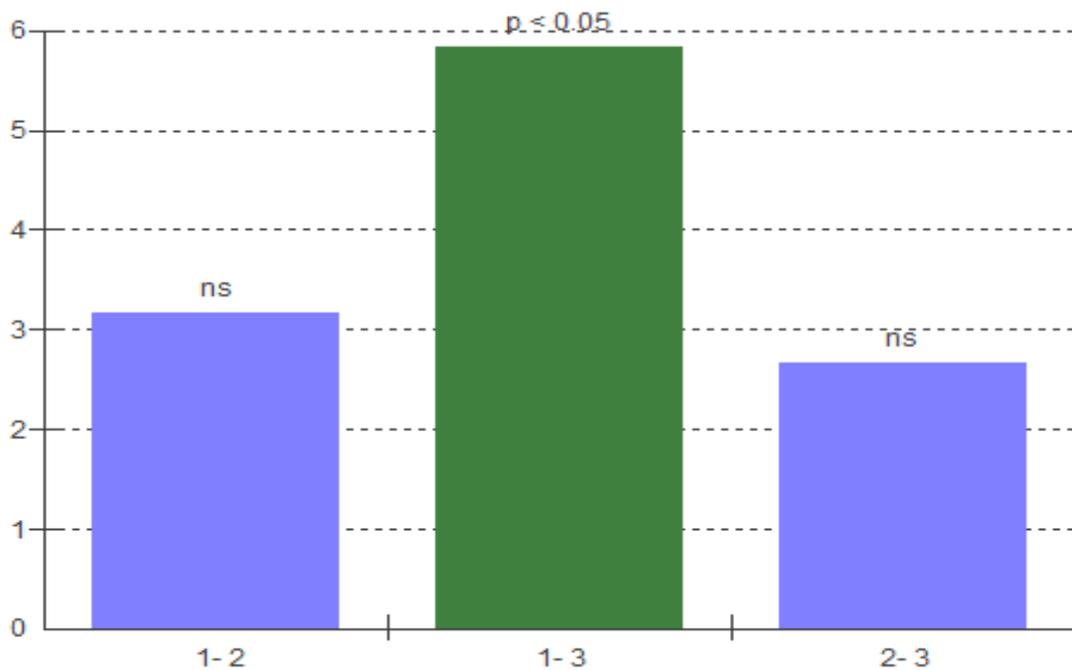
Figura 2: Amostras da primeira coleta do biocarvão no RCAALF.

Fonte: autoria própria

De acordo com as análises estatísticas mostradas nos gráficos 1 e 2, as médias de biomassa aderida ao meio suporte, somente apresentou diferença significativa entre os pontos 1-3 onde, para o p-valor $< 0,05$ rejeita-se a hipótese nula (H_0) e aceita-se (H_1) para os sólidos totais, onde a maior concentração de

biomassa foi observada nos pontos anaeróbios do reator (P1), os quais receberam a maior carga orgânica proveniente da alimentação do sistema. Com a recirculação interna de efluente tratado, estes pontos tornaram-se não apenas anaeróbios, mas também anóxicos, provavelmente contribuindo para o aumento do coeficiente de produção celular nesta zona.

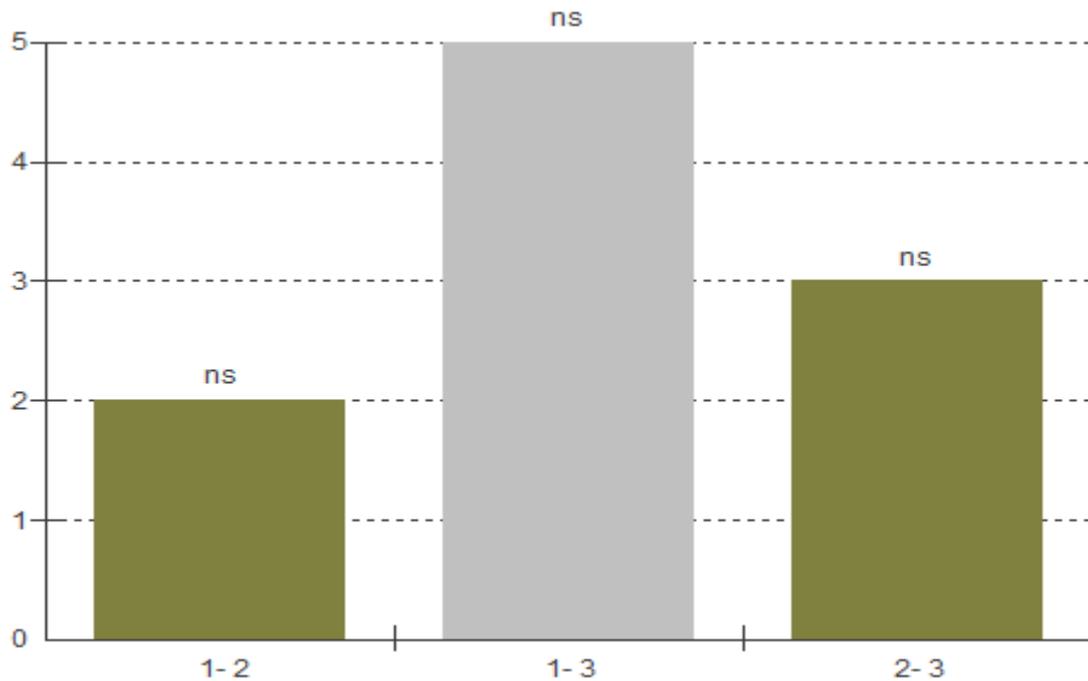
Gráfico 1: Diferença entre as médias nos pontos de coleta para sólidos totais (ST).



Fonte: autoria própria

Já para os sólidos voláteis totais, não houveram diferenças significativas, acreditando-se que principalmente para o P3, caracterizado por ser uma zona aeróbia, a baixa carga de matéria orgânica aplicada, remanescente do reator, e o baixo coeficiente de produção celular das bactérias nitrificantes, possivelmente contribuíram para uma menor concentração de biomassa neste ponto.

Gráfico 2: Diferença entre as médias nos pontos de coleta para sólidos voláteis totais (SVT).



Fonte: autoria própria

Segundo Jacobs (2013), que realizou experimentos com dois tipos de material suporte, bucha vegetal e espuma de poliuretano, o comportamento da biomassa seca aderida pode estar relacionado com a espessura do biofilme. Acredita-se que na bucha vegetal o biofilme era espesso, assim há um elevado crescimento microbiano e na espuma de poliuretano uma espessura intermediária, manteve um crescimento constante e baixo com média de 0,88g.

Para o carvão vegetal os valores mais altos de biomassa seca aderida foram de 0,0310g de ST e 0,0302g de SVT, valores baixos se comparados ao que foi citado acima.

5.2 Análises Microbiológicas

5.2.1 Bactérias Nitrificantes

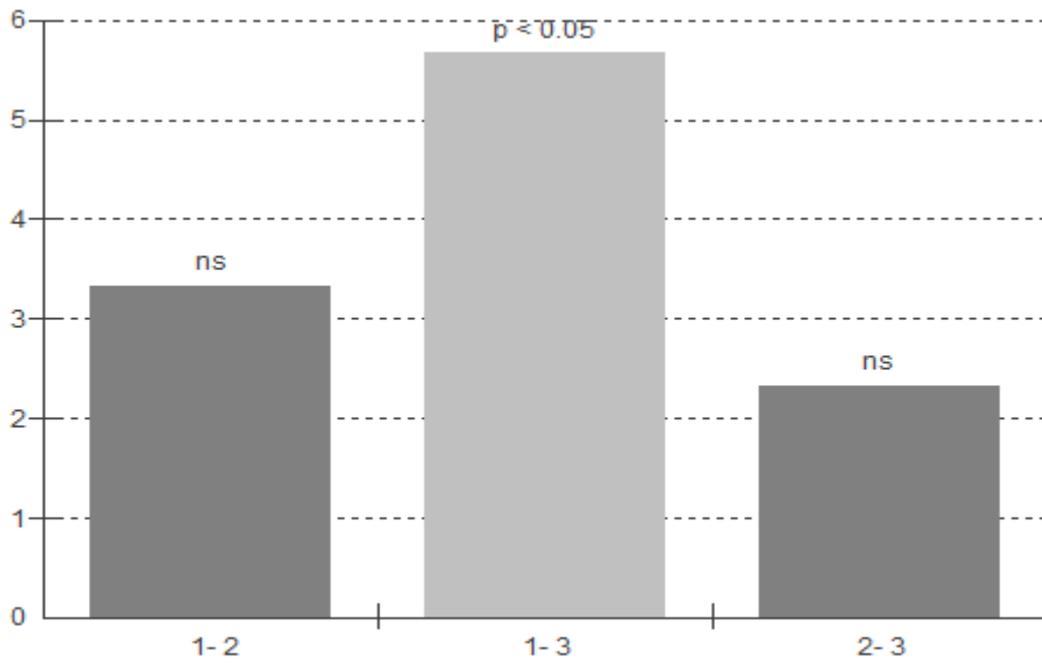
As estimativas do NMP das bactérias nitrificantes oxidadoras de amônia e de nitrito são apresentadas na Tabela 2 e nos gráficos 3 e 4, respectivamente, no qual é possível verificar a variação da população nitrificante ao longo do período experimental.

Tabela 2: Número mais provável de bactérias nitrificantes

NMP de bactérias nitrificantes			
Ponto	Intervalo de coleta	Bactérias oxidadoras de amônia (NMP/mL)	Bactérias oxidadoras de nitrito (NMP/mL)
P1	15 dias	$1,7 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3$
	30 dias	2×10^4	$3,2 \times 10^3$
	45 dias	$1,2 \times 10^4$	$9,2 \times 10^2$
P2	15 dias	$2,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$
	30 dias	$2,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$
	45 dias	$8,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$
P3	15 dias	$3,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$
	30 dias	$3,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^2$
	45 dias	$6,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$

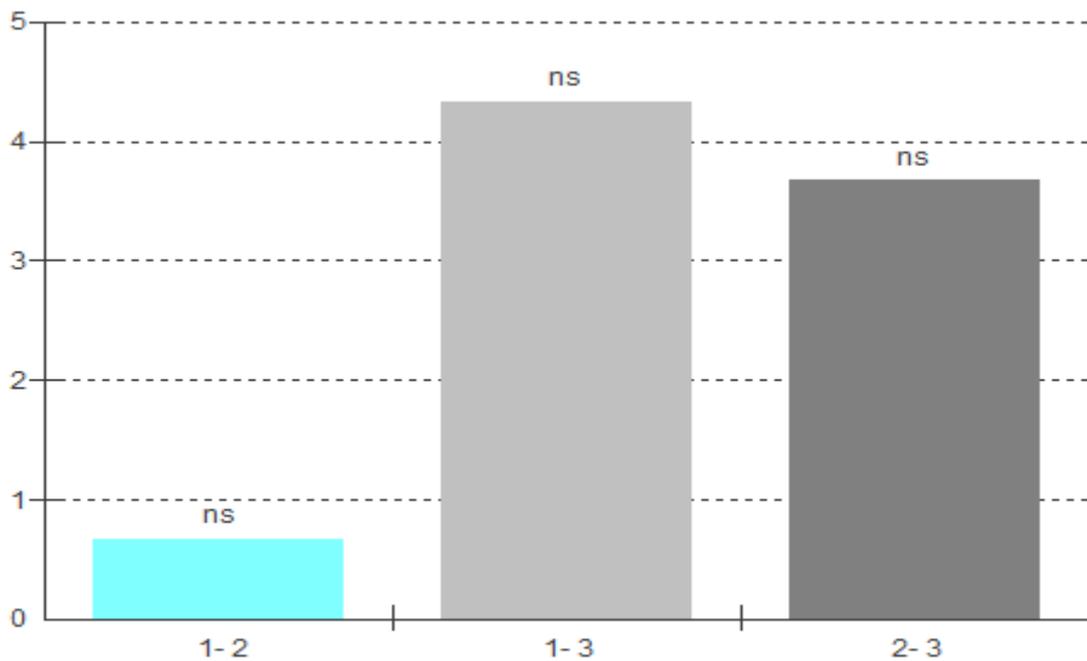
Fonte: autoria própria

Gráfico 3: Diferença entre as médias nos pontos de coleta para bactérias nitrificantes oxidadoras de amônia.



Fonte: autoria própria

Gráfico 4: Diferença entre as médias nos pontos de coleta para bactérias nitrificantes oxidadoras de nitrito.



Fonte: autoria própria

De acordo com os gráficos 3 e 4, pode-se verificar que os valores estimados das bactérias oxidadoras de nitrito foram menores que os das bactérias oxidadoras de amônia, em todos os meses de monitoramento, uma vez que para o p-valor < 0,05 é possível rejeitar a hipótese nula H_0 e aceitar H_1 .

Neste estudo, verificou-se que os valores (NMP/mL) das bactérias oxidadoras de nitrito, variaram entre $1,1 \times 10^2$ a $3,1 \times 10^3$ e que os das bactérias oxidadoras de amônia, variaram de $1,2 \times 10^4$ a $3,3 \times 10^6$, mostrando que as bactérias oxidadoras de nitrito apresentaram valores menores que das bactérias oxidadoras de amônia nos 3 meses de monitoramento.

Smorzewski e Schmidt (1991) constataram que a população de bactérias oxidadoras de amônia foi maior que a população de bactérias oxidadoras de nitrito, esse fato geralmente ocorre porque a reação de oxidação da amônia libera mais energia (por mol de amônia) para o crescimento celular que a da oxidação do nitrito.

O número estimado de bactérias nitrificantes oxidadoras de nitrito de todas as amostras coletadas apresentaram valores baixos de grandezas entre 10^2 e 10^3 NMP/mL, com isso, uma possível explicação deve-se a dificuldade da microbiota oxidar nitrito a nitrato. Já para as bactérias nitrificantes oxidadoras de amônia, observou-se uma diferença de grandeza, que variou de 10^4 a 10^6 NMP/mL.

Costa et al. (1999) estimaram a população de bactérias nitrificantes presentes em sistemas de lodos ativados de estágio único, que tratavam efluentes sintéticos de coqueria. Os autores observaram que, o NMP das oxidadoras de amônia foi da ordem de 10^5 a 10^7 NMP/100mL e das oxidadoras de nitrito variou da ordem de 10^5 a 10^6 NMP/100mL.

Araki et al. (1999), quantificou a população nitrificante no interior do reator de pós tratamento UASB e encontrou valores da ordem de 10^3 a 10^4 NMP/mL, tanto para as oxidadoras de amônia, quanto para as oxidadoras de nitrito.

As análises físico-químicas utilizadas para critérios comparativos de desenvolvimento das bactérias nitrificantes deste trabalho, foram realizadas no laboratório de saneamento ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão, por Cunha (2015) e dizem o seguinte:

- O pH do substrato obteve valor médio de 7,10 durante o período de monitoramento, com variações de 6,53 a 7,36.
- A temperatura apresentou variações de 16,96 °C a 28,31 °C.

De acordo com Dinçer e Kargi (2000), a nitrificação ocorre com um pH ótimo que deve estar entre 7,5 e 8,5, em valores inferiores à 6,5 a nitrificação praticamente não ocorre por escassez de amônia livre e elevação da concentração de ácido nitroso. De acordo com a média de pH de 7,10 para este estudo que foi apresentada acima, mesmo sendo pouco favorável houve o processo de nitrificação no reator.

De acordo com Environmental Protection Agency (1993) o processo de nitrificação ocorre com temperatura entre 4 – 45°C, o que pode explicar o número menor dessas bactérias no reator, uma vez que, a temperatura neste ficou na maior parte do experimento entre 16,96 e 28,31 °C não atingindo em nenhum dia temperatura superior a 30°C.

5.2.2 Bactérias Desnitrificantes

A variação do número mais provável (NMP) foi calculada de acordo com a Tabela Padrão de Probabilidade (Alexander 1984), demonstrado pela Tabela 3, a qual apresenta os valores do número de bactérias desnitrificantes para período analisado.

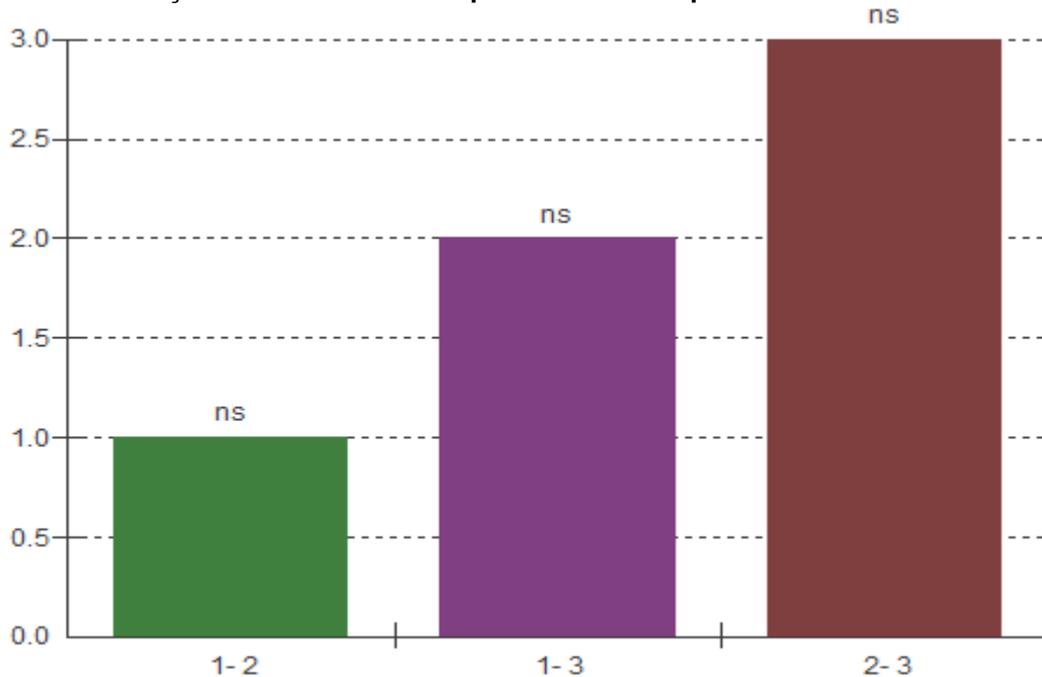
Tabela 3: Número mais provável de bactérias desnitrificantes

Ponto	Intervalo de coleta	Bactérias desnitrificantes (NMP/mL)
P1	15 dias	6,30E+06
	30 dias	4,80E+07
	45 dias	3,30E+07
P2	15 dias	3,90E+06
	30 dias	1,40E+06
	45 dias	2,60E+08
P3	15 dias	4,80E+08
	30 dias	1,40E+07
	45 dias	1,70E+08

Fonte: autoria própria

As análises do NMP mostraram a presença de bactérias desnitrificantes, variando entre os valores mais altos nos três meses de coleta entre $6,3 \times 10^4$ e $3,9 \times 10^5$ principalmente no material suporte que se localiza no ponto aeróbio do reator.

Gráfico 2: Diferença entre as médias nos pontos de coleta para bactérias desnitrificantes.



Fonte: autoria própria

As bactérias desnitrificantes, por serem heterótrofas facultativas, se adaptaram bem às condições anaeróbias e aeróbias do reator, mostrando valores estatísticos não significativos durante o monitoramento do reator. Essas bactérias utilizavam preferencialmente o oxigênio como aceptor de elétrons para a respiração celular, mas na ausência deste, podem utilizar o nitrato ou nitrito, reduzindo esses compostos a nitrogênio molecular e promovendo a desnitrificação.

Durante os 3 meses de coleta e monitoramento do reator anaeróbio/aeróbio, a estimativa das bactérias desnitrificantes não apresentou variação significativa, cuja ordem de grandeza variou entre 10^6 e 10^8 NMP/mL. Este valor se aproximou dos resultados obtidos por Marchetto et al. (1999) e Marchetto et al. (2002).

Marchetto et al. (1999) realizaram experimento, em escala de laboratório, composto por dois reatores em série, reator anaeróbio compartimentado e reator microaerado. Os autores observaram que o número de micro-organismos desnitrificantes foi da ordem de 10^8 NMP/mL.

Estes resultados foram pouco inferiores aos obtidos por Marchetto et al. (2002). Nesse trabalho, os autores realizaram a quantificação da população desnitrificante de um reator intermitente alimentado por efluente de reator anaeróbio

de leite fluidificado. O número estimado de micro-organismos desnitrificantes permaneceu praticamente na mesma ordem de grandeza durante o período do estudo, variando de 10^9 a 10^{10} NMP/mL.

Pode-se inferir que, valores de NMP de bactérias desnitrificantes dessa ordem de grandeza, que neste estudo apresentou maior valor de 10^8 NMP/mL, indicam a eficiência do processo de desnitrificação no sistema pesquisado e se comparado pelos estudos feitos por Marchetto et al. (1999) e Marchetto et al. (2002).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através das análises feitas neste trabalho apontam para as seguintes conclusões.

- O material suporte de carvão vegetal, não apresentou condições favoráveis ao estabelecimento do biofilme, mostrando valores entre 0,310g de ST e 0,302g de SVT, que foram considerados baixos quando comparados a outros autores quanto as taxas de matéria seca aderida. Acreditando-se que tais valores estatísticos pouco significativos estão relacionados a espessura do biofilme.
- O NMP das bactérias nitrificantes e desnitrificantes indicou que as condições ambientais e operacionais influenciaram no desenvolvimento destas, onde, apesar de ter havido os dois processos tanto de nitrificação como de desnitrificação no reator RCAALF, a conversão de nitrogênio amoniacal para nitrito se mostrou mais eficiente.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, M. I. Nutrient removal and sludge production in the coagulation-flocculation process. **Water Research**, v.36, p.2910-2919, 2002.

ALLEN, M.; EDBERG, S.C.; REASONER, D.J. **Heterotrophic plate count (HPC) bacteria - what is their significance in drinking water? In: NSF INTERNATIONAL/ WHO SYMPOSIUM ON HPC IN DRINKING WATER. PUBLIC HEALTH IMPLICATIONS?. 2002**, Genebra, Suíça. Conference Proceeding... [S.L.]: NSF:WHO, 2002. p. 29-45.

ALEXANDER, M. (1984). **Most Probable Number Method for Microbial Populations**, in: "*Methods of Soil Analysis – Chemical and Microbiological Properties*", Number 9, Part 2, 2^a ed., p.815-829, Wisconsin, Estados Unidos

ANUALPEC. **SISTEMAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DE MATADOURO BOVINO UTILIZANDO LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO**. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011b/ciencias%20ambientais/sistema%20de%20tratamento.pdf>> Acesso em: 16 mai. 2015.

ARAKI, N.; OHASHI, A.; MACHDAR, I. & HARADA, H. (1999). **Behaviors of Nitrifiers in a Novel Biofilm Reactor Employing Hanging Sponge-Cubes as Attachment Site**, *Water Science & Technology*, **39** (7), p.23-31

ARAUJO JUNIOR, M.M.; ZAIAT, M. (2006). **Reator combinado anaeróbio-aeróbio de leito fixo para remoção de matéria orgânica e nitrogênio de água residuária de indústria produtora de lisina**. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ARRUDA, Valmir Cristiano Marques. **Tratamento anaeróbio de efluentes gerados em matadouros de bovinos**. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Departamento Acadêmico de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

BARTRAM J. et al. (Eds). **Heterotrophic plate counts and drinking water safety: the significance of HPCs for water quality and human health**. Londres: WHO: IWA, Expert Consensus. Expert meeting group. 2003.

BERGEY (1989). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Section 20 – Aerobic Chemolithotrophic Bacteria and Associated Organisms**, p.1807-1834

BERK, S. G. & GUNDERSON, J. H. **Wastewater Organisms: A Color Atlas**. CRC Press, Inc., 25p., Boca Raton, Estados Unidos, 1993.

BITTON, G.. **Wastewater Microbiology**. 3^aed. Department of Environmental Engineering Sciences. University of Florida, Gainesville, Florida. Copyright by John Wiley & Sons, Inc. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005**. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/76f8a4804745865c8f88df3fbc4c6735/RDC_275_2005.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 31 mai. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria 518 de 25 de março de 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Disponível em : <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa9_agua.htm> Acesso em: 31 mai. 2015.

BITRÓN, G.; GONZÁLES, A. Characterization of the microorganisms an acclimated activates sludge degrading phenolic compounds. **Water Science and Technology**, v. 34, p.289-294, 1996.

CAMPOS, R.H.de. **Estudo da remoção de carbono e nitrogênio de efluentes urbanos em um reator de leito fluidizado operado em bateladas sequenciais**. 2006. 215 f. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2006.

CARVALHAL, M.L.C. Célula microbiana. **In: IV CURSO DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE RESÍDUOS**. Curso. Florianópolis / Santa Catarina, CBAB, MCT/CNPq, CPGEQ/UFSC, CDB, p.43., 1999.

CEBALLOS, B. S. O. Microbiología Sanitaria y Ambiental. **In: Sistemas de Lagunas de Estabilización Cómo Utilizar Aguas Residuales en Sistemas de Regadío**, Sérgio Rolim Mendonça (coord.), McGraw-Hill, p.68-106, Bogotá, Colômbia. 2001.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 246 p, 1997.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução Nº 357, 17 de Março de 2005**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> >. Acesso em: 27 mai. 2015.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução Nº 430, 13 de Maio de 2011**. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 17 mai. 2015.

COSTA, A. J. M. P.; RIVERA, I. N. G.; MORITA, D. M.; ALÉM SOBRINHO, P.; LIMA, C. A. P.; VILLAS BÔAS, D. M.. Acompanhamento Microbiológico de Lodos Ativados Utilizados no Tratamento de Despejos Líquidos Sintéticos de Coqueria. **In: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Anais, Salvador, BA, 1999.

CUNHA, C. C. **Remoção Biológica De Matéria Carbonácea, Nitrogenada e Fosforada, Utilizando Biocarvão Como Meio Suporte Em Reator Anaeróbio-Aeróbio**. 2015. 80f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

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

DOWNING, A.L. **Selected subjects in waste treatment**. 3 ed.: Delft, IHE., 1978.

Environmental Protection Agency (EPA). **Nitrogen control**. Washington (DC): US EPA; 1993.

FORESTI, E. **Sistemas de tratamento anaeróbio**. In: III Curso de tratamento biológico de resíduos. Santa Catarina, Florianópolis: UFSC, 1997.

FREITAS, B. de O. **Remoção de nitrogênio de lixiviado de resíduos sólidos urbanos por meio do processo nitrificação/desnitrificação via nitrito em reator em bateladas seqüenciais**. 95p. Tese (Mestrado) – Universidade de Brasília Faculdade Tecnologia - Departamento de engenharia civil e ambiental. Brasília, 2009.

GONÇALVES, R.F.; CHERNICARO, C.A.L.; ANDRADE NETO, C.O.; SOBRINHO, P.A.; KATO, M.T.; COSTA, R.H.R.; AISSE, M.M; ZAIAT, M. **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. Capítulo 4 – Pós-Tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. PROSAB 2, p.171-278, 2001.

GERALDI, M. H. (Org.). **Wastewater Biology: The life Processes**. Alexandria: Copyright, 184p. 1994.

HAANDEL, A. C. V; MARAIS, G. O Comportamento do Sistema de Lodo Ativado. Campina Grande: Epgraf, p. 488. 1999.

JACOBS, Ana C.P. **Tratamento de esgoto urbano em reator hídrico operado em batelada sequenciais (RHBS) submetido a variações de cargas**. 2013. 68 f. TESE (TCC em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2013.

JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGE, G. T. **Manual on the causes and control of active sludge bulking, foaming, and other solids separation problems**. 3 rd Edition. Iwa Publishing, 177p. 2003.

JEYANAYAGAM, S. True confessions of the biological nutrient removal process. **Water Resources Journal**, p. 37-46, 2005.

JOO, H.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.2, p.184-191, 2005.

LAMEGO N. L. G. **Tratamento de esgoto urbano em reator hídrico operado em batelada sequenciais (RHBS) submetido a variações de cargas**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC. 2008. 224p. Dissertação (Mestrado).

LI, M., NAKHLA, G., ZHU, J. Simultaneous Carbon and nitrogen removal with enhanced bioparticle circulation in a circulating fluidized bed biofilm reactor. **Chem. Eng. J.** 181-182, 35-44, 2012.

MADONI, P. et al. Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm. **Bioresource Technology**, Braga Codex, mai. 1997. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/34853/1/P_7.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2015.

MARCHETTO, M., GIANOTTI, E. P.; CAMPOS, J. R.. Estimativa do Número de Micro-organismos Desnitrificantes em Reator Microaerófilo Utilizando Efluente de Reator Anaeróbio Tratando Esgoto Doméstico. In: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Anais, Salvador, BA, 1999.

MARCHETTO, M., GIANOTTI, E. P. CAMPOS, J. R.; PIRES, R. C; MORAES, E. M. Estimate of Denitrifying Microbiota in Tertiary Sewage Treatment and Kinetics of the Denitrification Process Using Different Sources of Carbon. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2002.

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

METCALF, L.; EDDY, H. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. McGraw Hill. 4th edition. 1819p. Inc. 2003.

MORITA, M.; UEMOTO, H.; WATANABE, A. Nitrogen-removal bioreactor capable of simultaneous nitrification and denitrification for application to industrial wastewater treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.41, n.1, p.59-66, 2008.

MORRISON, G.; FATOKI, O. S.; PERSSON, L.; EKBERG, A. Assessment of the impact of point source pollution from the Keiskammahoeek Sewage Treatment Plant on the Keiskamma River – pH, electrical conductivity, oxygen demanding substance (COD) and nutrients. **Water SA.**, v.27, p.475-480, 2001.

ODJADJARE, E.; OKOH, A. Physicochemical quality of an urban municipal wastewater effluent and its impact on the receiving environment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.170, p.383-394, 2010.

OLIVEIRA, A. C. DEL G. **Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel**. 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina-PR, 2012.

PACHECO, J. A. S.; WOLFF, D. B. Tratamento dos efluentes de um frigorífico por sistema australiano de lagoas de estabilização. **Disc. Scientia**. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, v.5, p.67-85, 2004.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. New York, NY: McGraw-Hill; 2001.

RUIZ, G., JEISON, D., RUBILAR, O. Nitrification–Denitrification via Nitrite Accumulation for Nitrogen Removal from Wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 97, pp. 330-335, 2006.

SANT'ANNA JR, G.L. **Tratamento Biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2010. 398 p.

SCARASSATI, D.; CARVALHO, R.F.; DELGADO, V.L. CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; TONSO, S.; DOBRINHO, G.D.; PELEGRINI, R. **Tratamento de efluentes de Matadouros e Frigoríficos**. III Fórum de Estudos Contábeis. UNICAMP. Rio Claro, 2003.

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

SHARMA, B.; AHLERT, R. C. Nitrification and nitrogen removal. **Water Research**, v.11, n.10, p.897-925, 1977.

SILVA, O. A. L. **Remoção da Matéria Orgânica em Sistemas de Lagoas de estabilização no Nordeste Brasileiro**. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Sanitária da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 2011.

SMORCZEWSKI, W. T. ; SCHMIDT, E. L. Numbers, Activities, and Diversity of Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria in a Freshwater, Eutrophic Lake Sediment, **Can. J. Microbiol.**, 37, p.828-833. 1991.

SOARES, H.M. **Digestão anaeróbia de efluentes de fábricas de cervejas e refrigerantes em reator tipo fluxo ascendente com manta de lodo (UASB)**. Dissertação (mestrado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 1990

SOARES, H. M.; HIRATA, T. S. Práticas de laboratório. Florianópolis. In: III CURSO DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE RESÍDUOS. CBAB, MCT/CNPq, CPGEQ/UFSC, CDB, p.23. 1997.

SPEECE, R E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Vanderbilt University. Published by Archae Press. United States of America, 1996.

STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS. **The microbiology of drinking water: water quality and public health - part 1**. Nottingham: Environment Agency, 2002. Disponível em: < <http://www.environment-agency.gov.uk/science/>>. Acesso em: 27 mai. 2015.

VAN HAANDEL, A.C. e LETTINGA, G. **Tratamento anaeróbio de esgotos - um manual para regiões de clima quente**, p.208. Editora Epgraf., 1994.

VAN HAANDEL, A. C., MARAIS, G. V. R. **O Comportamento do Sistema de Lodo Ativado: Teoria e Aplicações para Projetos e Operações**. Campina Grande: epgraf, 472 p., 1999.

VON SPERLING, M. **Lodos Ativados**. Belo Horizonte: UFMG, p. 416, v. 4. 1997.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; 1996.

VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Vol. 4 Lodos Ativados. 2.ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, v.1. P.428, 2002.

VAZOLLÈR, R. F.; GARCIA, A. D.; CONCEIÇÃO NETO, J. **Microbiologia de Lodos Ativados – Série Manuais**. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo: CETESB, p.23, 1991.

VICTORIA, J.A.R. **Nitrificação de efluente de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) em filtro aeróbio**. 1993. 142 f. Tese (Mestrado) - Universidade de São Paulo. São Carlos-SP, 1993.