
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL
TECNOLOGIA AMBIENTAL E RECURSOS HÍDRICOS**



CÂNDIDA NATHALY CORDEIRO SOUTO

**ESTUDO DE REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS PARA A
REMOÇÃO SIMULTÂNEA DE NITROGÊNIO E FÓSFORO NO
TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO**

Recife
2017

CÂNDIDA NATHALY CORDEIRO SOUTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DE REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS PARA A
REMOÇÃO SIMULTÂNEA DE NITROGÊNIO E FÓSFORO NO
TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil com ênfase em Tecnologia Ambiental, pela Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florêncio dos Santos.

Área de concentração: Saneamento ambiental

Recife
2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária Valdicéa Alves, CRB-4 / 1260

S726e	<p>Souto, Cândida Nathaly Cordeiro. Estudo de reatores em bateladas sequenciais para a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo no tratamento de esgoto sanitário / Cândida Nathaly Cordeiro Souto - 2017. 75folhas, Il., Tab.; Abr. e Sigl.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2017. Inclui Referências.</p> <p>1. Engenharia Civil. 2. Remoção de nutrientes. 3. Tratamento biológico. 4. EBPR. 5. Nitrificação. 6. Desnitrificação. I. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos. (Orientadora). II. Título.</p> <p style="text-align: right;">UFPE</p> <p>624 CDD (22. ed.) BCTG/2017-188</p>
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

A comissão examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DE REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS PARA A REMOÇÃO
SIMULTÂNEA DE NITROGÊNIO E FÓSFORO DE ESGOTO SANITÁRIO**

defendida por

Cândida Nathaly Cordeiro Souto

Considera a candidata APROVADA

Recife, 20 de fevereiro de 2017

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos – UFPE
(orientadora)

Prof. Dr. Roque Passos Piveli – USP
(examinador externo)

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Amaral Pastich Gonçalves – UFPE
(examinadora externa)

*Aos meus pais e minhas irmãs, pelo
apoio e confiança incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Do início ao final de uma caminhada difícil, é impossível que a vitória venha sem as “mãos amigas” que nos apoiam.

Minha imensa gratidão aos meus primeiros amores e amigos, meus pais, que me motivam cada dia a ser melhor, construindo uma vida com base na educação e responsabilidade que me transferiram. Agradeço, principalmente, pela confiança em mim depositada. A minhas irmãs, avó e tias, por todas as palavras de incentivo desde o início.

Aos grandes amigos que o grupo LSA/UFPE me presenteou: Larissa Martins, Oucilane Alves, Poliana Januário, Mariana Nanes, Bárbara Moraes, Jucélia Tavares, Sofia Pimentel, Mariana Barbosa, Rhayssa Brito, Osmar Menezes, Carlos Pereira, Marcelo Guerra, Juliana Mello, Denise Santana, Bruno Linhares, vocês não imaginam o quanto foram importantes em todos os momentos e sempre vão estar nas minhas melhores memórias.

Ao grupo Renutres: Antônio Gustavo, pelas incansáveis discussões científicas e filosóficas durante as coletas e análises na ETE e no laboratório, trabalhar com você foi o melhor que me ocorreu neste projeto. À Valéria Trajano, que esteve presente desde o início; aos meus melhores ICs: Wladimir, Maira, Hortência e Luna, equipe que tanto me orgulha, obrigada pelo esforço, dedicação e competência, além da amizade que criamos.

À professora Lourdinha Florêncio, pela confiança, orientações e por toda a motivação transferida. Aos professores Mario Kato, Sávia Gavazza e Wanderli Pereira. À Tamilys, Marinalva, Andréa e Claudiane pela paciência e apoio em todas as questões acadêmico-burocráticas.

Aos técnicos Ronaldo e Danúbia, por todo o apoio extremamente necessário ao andamento da pesquisa e por toda a disponibilidade em ajudar, sempre. A Marcus Vinícius, Oucilane e Roberto pela contribuição na biologia molecular. Ao Edmilson, técnico da ETE Mangueira, por toda a dedicação e auxílio nas horas de maior dificuldade na operação em escala piloto.

À FACEPE pelo incentivo acadêmico, ao grupo Odebredcht, à COMPESA, UFPE e ao laboratório de saneamento ambiental (LSA) pelos espaços cedidos para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

A disponibilidade hídrica é uma das maiores preocupações ambientais a nível mundial. O aumento da demanda por água sugere uma necessidade maior do tratamento e reutilização das águas consumidas. A eutrofização dos corpos hídricos é um problema ambiental recorrente, causado pelas descargas excessivas de nutrientes nos corpos hídricos. Os reatores em bateladas sequenciais (RBS) possibilitam a remoção de nutrientes em esgotos através de processos biológicos. Uma vez que a população microbiológica é exposta a condições alternadas anaeróbia/aeróbia/anóxica, o fósforo é removido devido à atividade de micro-organismos que o acumulam; simultaneamente, o nitrogênio é removido por nitrificação e desnitrificação. Neste trabalho, um RBS de 140 L de volume útil foi operado recebendo esgoto doméstico de baixa carga orgânica proveniente do tratamento preliminar de uma ETE. O estudo foi dividido em duas fases, em que foram alterados os tempos de ciclos e das fases de reação. O sistema foi monitorado por meio de coletas semanais para análise das variáveis de interesse. Quando se atingiu o estado estacionário, foram traçados perfis do funcionamento do reator em cada fase operacional. Para isto, foram realizadas análises físico-químicas (fósforo, nitrogênio, sólidos, alcalinidade, DQO, AGV e PHA) e microbiológicas (microscopia óptica, testes de atividade da biomassa e teste de biologia molecular por PCR). Os resultados das variáveis físico-químicas mostraram eficiência na remoção de fósforo, nitrogênio e matéria orgânica; O processo EBPR se efetivou conforme o esperado em ambas as fases; sugerindo a atividade de PAOs e DPAOs no sistema. A remoção de nitrogênio amoniacal foi completa e efetiva. Os testes biomoleculares confirmaram a presença no sistema operado dos principais grupos de micro-organismos responsáveis pela remoção biológica de nutrientes: PAOs, Anammox, desnitrificantes e nitrificantes.

Palavras-chave: Remoção de nutrientes. Tratamento biológico. EBPR. Nitrificação. Desnitrificação

ABSTRACT

The water availability is one of the major environmental concerns worldwide. The increased demand for water suggests a greater need for treatment and reutilization of the wastewater. The eutrophication of the water bodies is a recurrent environmental issue, caused by the excessive discharge of nutrients in the water bodies. Sequencing batch reactors (SBR) allow the removal of nutrients from sewage by biological processes. Once the microbiological population is exposed to alternate anaerobic/aerobic/anoxic conditions, the phosphorus is removed due the activity of the microorganisms that accumulate it; at the same time, the nitrogen is removed by nitrification and denitrification. In this work, one SBR with 140 L of working volume was operated receiving a low organic load of domestic sewage from the preliminary treatment of a sewage treatment plant. The study was divided in two phases, in which the times of the cycles and of the reaction phases were changed. The system was monitored by weekly sampling for analysis of the parameter of interest. When the stationary state was reached, the operating profiles of the reactor in each operational phase were plotted. For this aim, physical-chemical (phosphorus, nitrogen, solids, alkalinity, COD, VFA and PHA) and microbiological (optical microscopy, biomass activity test and molecular biology test by PCR) analysis were performed. The physical-chemical results showed efficiency on the removal of phosphorus, nitrogen and organic matter; The EBPR process took effect as expected in both phases; suggesting the activity of PAO and DPAO in the system. The removal of ammonia nitrogen was complete and effective. The biomolecular tests confirmed the presence of the main microorganisms groups responsible for the biological removal of nutrients in the operated system: PAO, Anammox, denitrifying, nitrifying.

Keywords: Nutrients removal. Biological treatment. EBPR. Nitrification. Denitrification

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Estrutura polimérica de PHB (a) e micrografia eletrônica de uma célula bacteriana contendo grânulos de PHB(b).....	28
Figura 2 - (a) dimensões do reator; (b) reator instalado na unidade experimental	33
Figura 3 - Esquema da instalação dos reatores (tanque de alimentação e estrutura do sistema).....	34
Figura 4 - Metodologia para determinação de PHAs na biomassa	37
Figura 5 - Concentrações de DQO total ao longo da operação da Fase 1	42
Figura 6 - Concentrações de DQO solúvel ao longo da operação da Fase 1.....	42
Figura 7 - Concentrações de DQO total ao longo da operação da Fase 2	43
Figura 8 - Concentrações de DQO solúvel ao longo da operação da Fase 2.....	44
Figura 9 - Concentrações de NTK e N-NH ₃ no afluente ao longo da Fase 1	45
Figura 10 - Concentrações de nitrogênio no efluente ao longo da Fase 1.....	45
Figura 11 - Concentrações de NTK e N-NH ₃ no afluente ao longo da Fase 2	46
Figura 12 - Concentrações de nitrogênio no efluente ao longo da Fase 2.....	47
Figura 13 - Comportamento do fósforo total ao longo do período operacional da Fase 1	48
Figura 14 - Comportamento do ortofosfato ao longo do período operacional da Fase 1	48
Figura 15 - Comportamento do fósforo total ao longo do período operacional da Fase 2.....	49
Figura 16 - Comportamento do ortofosfato ao longo do período operacional da Fase 2.....	49
Figura 17 - Comparativo entre as remoções de DQO no período estável de cada fase	50
Figura 18 - Comparativo entre as concentrações de entrada e saída de nitrogênio.....	51
Figura 19 - Comparativo entre as concentrações de entrada e saída de fósforo	52
Figura 20 - Comparativo entre as remoções de fósforo e nitrogênio das fases operacionais..	53
Figura 21 - Crescimento da biomassa ao longo da Fase 1	54
Figura 22 - Crescimento da biomassa ao longo da Fase 2	55
Figura 23 - Taxas de consumo de oxigênio específicas - Fase 1.....	56
Figura 24 - Taxas de consumo de oxigênio específicas - Fase 2.....	57
Figura 25 - Variação da biomassa: (A) início da operação, floco pin-point; (B) floco intumescido; (C) início da estabilização, floco ideal – Fase 1	58
Figura 26 - Evolução da população de micro-organismos durante a primeira fase operacional.....	58
Figura 27 - Fase inicial de operação; Predominância de bactérias filamentosas e ciliados – Fase 2.....	59

Figura 28 - Evolução da população de micro-organismos durante a segunda fase operacional.....	59
Figura 29 - Imagens da análise de PCR para os grupos (a) Anammox; (b) Nitrosomonas; (c) Nitrospira; (d) PAOs; (e) Desnitrificantes.....	61
Figura 30 - Perfil temporal das fases de reação da batelada da Fase 1 (ciclo 8h)	63
Figura 31 - Perfil temporal das fases de reação da batelada da fase operacional 2 (ciclo 6h).....	66
Figura 32 - Relação entre a produção e consumo de DQO solúvel e PHB – Fase 1	68
Figura 33 - Relação entre a produção e consumo de DQO solúvel e PHB – Fase 2	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos esgotos sanitários em função das concentrações dos parâmetros	18
Tabela 2 - Relação entre a predominância de micro-organismos e as condições operacionais nos sistemas de lodos ativados	30
Tabela 3 - Condições experimentais aplicadas nas duas fases operacionais	34
Tabela 4 - Parâmetros analisados e métodos analíticos.....	36
Tabela 5 - Pontos de amostragem e análises realizadas nos perfis temporais	37
Tabela 6 - Grupos de micro-organismos e <i>primers</i> utilizados na reação PCR.....	39
Tabela 7 - Caracterização do esgoto afluyente	41
Tabela 8 - Comparativo entre as eficiências de remoção das fases operacionais em períodos com concentrações de biomassa aproximadas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGV** – Ácidos Graxos Voláteis
- BNR** - Remoção biológica de nutrientes
- BOA** - Bactérias oxidantes de amônia
- BON** - Bactérias oxidantes de nitrito
- CLP** - Controlador Lógico Programável
- COV** – Carga Orgânica Volumétrica
- DBO** – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DPAOs** – Organismos Acumuladores de Fósforo Desnitrificantes
- DQO** - Demanda Química de Oxigênio
- EBPR** – Enhanced Biological Phosphorus Removal
- ETE** – Estação de Tratamento de Efluentes
- GAOs** – Organismos Acumuladores de Glicogênio
- NTK** – Nitrogênio Total Kjeldahl
- OD** – Oxigênio Dissolvido
- PAOs** – Organismos Acumuladores de Fósforo
- PH2MV** Poli- β -hidroxi-2-metilvalerato
- PHAs** – Polihidroxiálcanoatos
- PHB** – Poli- β -hidroxibutirato
- PHV** - Poli- β -hidroxivalerato
- RBS** – Reator em Batelada Sequencial
- rpm** – Rotações por minuto
- SND** – Nitrificação e desnitrificação simultâneas
- SSV** – Sólidos Suspensos Voláteis
- SSVLM** – Sólidos Suspensos Voláteis do Licor Misto
- ST** – Sólidos Totais
- STPP** - Tripolifosfato de sódio
- TCO** – Taxa de Consumo de Oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO GERAL	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	QUALIDADE DAS ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO	17
2.2	ESGOTAMENTO SANITÁRIO	18
2.3	EUTROFIZAÇÃO	19
2.4	NUTRIENTES EM ESGOTOS DOMÉSTICOS	19
2.5	REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NUTRIENTES	22
2.5.1	Remoção de nitrogênio	23
2.5.2	Nitrificação e desnitrificação simultâneas (SND)	25
2.5.3	Remoção biológica de fósforo – Processo EBPR	26
2.5.4	O papel dos polihidroxialcanoatos (PHA) no processo EBPR	27
2.6	LODOS ATIVADOS E REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS	28
2.6.1	Aspectos microbiológicos em lodos ativados	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	32
3.1.1	Fase 1	34
3.1.2	Fase 2	35
3.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	35
3.2.1	Análise cromatográfica de PHA no lodo	36
3.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	38
3.3.1	Microscopia óptica	38
3.3.2	Técnicas de biologia molecular	39
3.3.3	Medição da taxa de consumo de oxigênio pela biomassa (respirometria)	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA	42
4.1.1	Fase 1	42
4.1.2	Fase 2	43
4.2	REMOÇÃO DE NITROGÊNIO	44
4.2.1	Fase 1	44
4.2.2	Fase 2	46

4.3	REMOÇÃO DE FÓSFORO	47
4.3.1	Fase 1	47
4.3.2	Fase 2	48
4.4	COMPARAÇÃO DA REMOÇÃO DE NUTRIENTES ENTRE AS FASES OPERACIONAIS	50
4.4.1	Matéria orgânica.....	50
4.4.2	Nitrogênio	51
4.4.3	Fósforo	52
4.5	CRESCIMENTO DA BIOMASSA E ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	54
4.5.1	Crescimento da biomassa.....	54
4.5.2	Teste de atividade da biomassa – respirometria.....	55
4.5.3	Análise microscópica - caracterização da biomassa.....	58
4.5.4	Testes de biologia molecular – reação em cadeia polimerase (PCR).....	60
4.6	AVALIAÇÃO DOS PERFIS TEMPORAIS DAS BATELADAS	62
4.6.1	Relação entre a produção e consumo de DQO/PHA	67
5	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

As atividades antrópicas são geradoras de resíduos e poluição, afetando a qualidade dos ecossistemas e promovendo o desequilíbrio ambiental. Os múltiplos usos da água têm afetado consideravelmente a qualidade dos corpos hídricos e a disponibilidade hídrica, especialmente pelo despejo de águas residuárias sem o devido tratamento.

A eutrofização é o processo de fertilização excessiva, permanente e contínua de um corpo hídrico, ocasionado pelas descargas excessivas de certos nutrientes básicos, tais como o fósforo e nitrogênio, que causa efeitos negativos como o desenvolvimento massivo de plantas aquáticas, algas e o consumo de oxigênio dissolvido.

A remoção biológica de nutrientes tem sido extensivamente aplicada aos esgotos. O processo pode ser atribuído à atividade simultânea de quatro principais grupos de micro-organismos: organismos autotróficos nitrificantes, que oxidam amônia a nitrito e nitrato aerobiamente, heterotróficos desnitrificantes, que reduzem o nitrato a nitrogênio gasoso anoxicamente, os organismos acumuladores de polifosfato (PAOs), que acumulam fósforo utilizando oxigênio como acceptor de elétrons e os organismos acumuladores de fósforo desnitrificantes (DPAOs), que acumulam fósforo utilizando nitrato ou nitrito como acceptor de elétrons.

O nitrogênio em esgotos sanitários se apresenta principalmente na forma amoniacal, que é removida pela nitrificação e desnitrificação. A oxidação da amônia é intermediada por dois grupos de bactérias de crescimento lento: bactérias oxidantes de amônia (BOA) e bactérias oxidantes de nitrito (BON). A aplicação de métodos moleculares revelou que o gênero *Nitrospira* é o principal responsável pela nitrificação na maioria das estações de tratamento (WAGNER e LOY, 2002).

Além disto, há um grupo específico de bactérias anaeróbias oxidantes de amônio, o grupo *Anammox* (anaerobic ammonium-oxidizing bacteria), que remove amônia e nitrito simultaneamente. Tais bactérias encontram condições ideais de crescimento nos reatores em bateladas sequenciais (KARTAL et al., 2013)

O processo denominado *Enhanced Biological Phosphorus Removal* (EBPR) é conhecido pela elevada eficiência na remoção de fósforo, prevenindo a eutrofização dos corpos hídricos. Este processo conta com a atividade metabólica dos PAOs, que capturam e armazenam o fósforo dentro das células (MESQUITA et al., 2014).

Basicamente, o processo EBPR consiste em expor a biomassa de lodos ativados a condições anaeróbias e aeróbias, fornecendo matéria orgânica durante a fase anaeróbia,

quando os micro-organismos utilizam, preferencialmente, acetato e propionato como fonte de carbono para a síntese de polihidroxialcanoatos (PHAs) e os armazenam dentro das células. Para isto, é utilizada energia obtida da hidrólise de polifosfatos e da oxidação de glicogênio, também armazenados nas células (KANG e NOGUERA, 2014).

Assim, em condições anaeróbias, ocorre a liberação de fosfato das células para o meio. Na fase aeróbia, os organismos metabolizam os PHAs e fornecem energia para o crescimento celular, ao mesmo tempo em que acumulam glicogênio e polifosfato. Nesta fase, todo o fosfato liberado anteriormente é capturado novamente e o fosfato afluente pode ser consumido, removendo-se o fósforo total (MARTÍN et al., 2006; ZENG et al., 2004).

Em escala laboratorial é comum a aplicação de reatores em batelada para o estudo do processo EBPR, uma vez que é possível fornecer as condições favoráveis à comunidade microbiológica específica e tem-se um melhor monitoramento.

A operação de reatores em série estabelecendo as condições ambientais para estimular o desenvolvimento de populações microbianas específicas, permite uma melhor eficiência da remoção de nutrientes. Alternativamente, o uso de um único reator sob diferentes condições em zonas distintas reduz os custos operacionais e a área requerida. Um reator em bateladas sequenciais (RBS) operado em condições alternadas anaeróbia, aeróbia e/ou anóxica pode ser utilizado com esta finalidade (FREITAS et al., 2005).

Neste estudo, um reator RBS alimentado com esgoto sanitário real, foi submetido a condições alternadas (anaeróbia/aeróbia/anóxica), em fases operacionais distintas, a fim de favorecer a atividade dos micro-organismos responsáveis pela remoção simultânea de nutrientes.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer as condições ambientais e operacionais para o crescimento de uma comunidade microbiana em reator biológico sequencial em batelada para a remoção simultânea de fósforo e nitrogênio.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a influência do tamanho das fases (tempo de reação) e intensidade de aeração nos sistemas em estudo
2. Avaliar a produção e consumo de PHAs para o desenvolvimento dos micro-organismos acumuladores de fósforo e de desnitrificantes acumuladores de fósforo

3. Caracterizar as populações microbianas através de técnicas de biologia molecular
4. Traçar um perfil do funcionamento e avaliar o desempenho do reator na remoção biológica simultânea de fósforo e nitrogênio de esgoto sanitário

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUALIDADE DAS ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO

A disponibilidade de água, recurso natural de uso comum e indispensável à sobrevivência das espécies, é uma das maiores preocupações ambientais a nível mundial.

A poluição hídrica é definida como qualquer alteração nas características físicas, químicas e/ou biológicas das águas, causando danos à saúde, à segurança e ao bem-estar da população, comprometendo a fauna ictiológica e a utilização das águas para fins comerciais, industriais, recreativos e de geração de energia (BRASIL, 2005a).

Após a utilização, a água passa por transformações em sua qualidade, constituindo-se em um despejo líquido, que necessita de tratamento. O crescimento populacional e consequente aumento da demanda por água sugere uma necessidade maior do tratamento e reutilização das águas consumidas.

O saneamento básico é extremamente importante para o desenvolvimento de uma sociedade e sua carência afeta diretamente a saúde pública e o meio ambiente.

A história do saneamento no Brasil pode ser dividida em três fases ao longo dos séculos XVI e XX: (1) do século XVI à metade do XIX, o Estado era ausente das questões sanitárias; (2) em meados do século XIX, o Estado assumiu as ações sanitárias, promovendo melhoria à saúde e produtividade no trabalho; (3) a partir da década de 1960, o saneamento passa a ser tratado como medida de infraestrutura. Na década de 1990 surge uma pressão para a privatização dos serviços de abastecimento de água e esgotamento sanitário, como modelo de concessão dos serviços à Parceria-Público-Privada - PPP (REZENDE e HELLER, 2008).

No Brasil, ainda existem situações de carência extrema no setor do saneamento. Apesar de mais pronunciado nas áreas rurais, o déficit em saneamento também é muito significativo nas grandes metrópoles. Outro grave problema é a iniquidade da frequência de distribuição e a qualidade da água distribuída. Especialmente nas áreas periféricas das grandes metrópoles existe um elevado índice de ineficiência dos sistemas de coleta e tratamento de esgotos.

Segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2015), o consumo per Capita de água no Brasil é de 154 L.hab.dia⁻¹. Em 2015, apenas 42,67% de esgoto referido à água consumida foi tratado. Os dados de coleta e tratamento de esgoto no

Brasil são preocupantes: 55,17% e 74,02%, respectivamente. Em Pernambuco, o índice de coleta foi ainda menor (27,41%) e o índice de tratamento foi de 78,75%, um pouco maior comparado aos anos anteriores.

O déficit no saneamento aliado às ocupações irregulares de áreas de proteção de mananciais tem causado um grande comprometimento da qualidade das águas, além da exposição da população a doenças. Apesar das iniciativas governamentais para ampliação e qualificação dos serviços de saneamento, os recursos investidos ainda são insuficientes, tendo em vista a necessidade da universalização do acesso aos serviços de saneamento (BRASIL, 2009).

2.2 ESGOTAMENTO SANITÁRIO

Define-se esgoto sanitário como o despejo líquido composto por esgoto doméstico, comercial e industrial, águas de infiltração e pluvial parasitária, sendo o esgoto doméstico aquele resultante do uso da água para higiene e necessidades fisiológicas (ABNT, 1986).

De acordo com Metcalf e Eddy (2003), a depender das concentrações dos poluentes, os esgotos são classificados em concentrado, médio e diluído. A Tabela 1 apresenta as concentrações de alguns poluentes para cada classe.

Tabela 1 - Classificação dos esgotos sanitários em função das concentrações dos parâmetros

Parâmetro (mg.L⁻¹)	Esgoto diluído	Esgoto intermediário	Esgoto concentrado
Sólidos totais	390	720	1230
Sólidos suspensos totais	120	210	400
DQO	250	430	800
Nitrogênio total	20	40	70
Orgânico	8	15	25
Amônia livre	12	25	45
Fósforo total	4	7	14
Orgânico	1	2	4
Inorgânico	3	5	10

Fonte: Adaptado de Metcalf e Eddy (2003).

2.3 EUTROFIZAÇÃO

A eutrofização é o processo de fertilização excessiva, permanente e contínua de um corpo hídrico, devido ao excesso de certos nutrientes básicos e pode causar efeitos negativos como o desenvolvimento massivo de plantas aquáticas, macrófitas, algas e o consumo de oxigênio dissolvido. Plantas aquáticas flutuantes podem cobrir todo o espelho d'água, dificultando a navegação, prejudicando instalações de bombeamento e turbinagens. O excesso de algas, além de causar mau odor e sabor, pode interferir nos processos de coagulação e filtração das águas de abastecimento, causando danos às instalações (AZEVEDO NETTO, 1988).

A eutrofização pode ser de dois tipos: (1) natural ou secular, um processo muito lento que ocorre naturalmente e está relacionado com o envelhecimento dos corpos hídricos; (2) cultural ou acelerada, que se deve às atividades humanas de lançamento de nutrientes nas águas, acelerando o processo e rompendo o equilíbrio biológico.

O excesso de fósforo e nitrogênio é a principal causa do fenômeno - porém, outras substâncias como matéria orgânica e microelementos podem contribuir. É importante lembrar que este fenômeno não está relacionado somente com o excesso de nutrientes, mas também sofre influência de várias condições de qualidade das águas, tais como aspectos ecológicos, características físicas dos corpos hídricos, velocidade de escoamento ou de renovação, tempo de residência, condições climáticas (intensidade dos ventos, temperatura, etc.), bem como a profundidade dos lagos e rios, que exerce uma forte influência (AZEVEDO NETTO, 1988).

Vollenweider (1968) destacou os detergentes como principais fontes pontuais de contribuição à carga de fósforo e que os fosfatos utilizados no abrandamento das águas duras contribuíam substancialmente para a carga total.

2.4 NUTRIENTES EM ESGOTOS DOMÉSTICOS

As fontes de nutrientes em esgotos sanitários são diversas e podem ter origem natural ou de atividades antrópicas. De acordo com Vollenweider (1968), a melhor maneira de distinguir tais fontes é classificando-as em pontuais e difusas. O termo “difusa” refere-se às fontes mais difíceis de quantificar e de controlar, tais como as que se originam de fenômenos naturais (erosão do solo, processos biológicos, etc.) e de fontes artificiais, como os fertilizantes agrícolas que são carregados no solo. As fontes pontuais seriam aquelas mais fáceis de avaliar e mais simples de tratar, como os esgotos domésticos e industriais.

Depois do carbono, o nitrogênio (N) é o nutriente mais abundante nas células, podendo ser encontrado na natureza nas formas orgânica ou inorgânica. A química do

nitrogênio é complexa, pois vários estados de oxidação são possíveis e estão relacionados com a atividade dos organismos vivos e das condições ambientais prevalentes (aeróbias ou anaeróbias).

O nitrogênio é mais comumente encontrado em esgotos na forma amoniacal. A soma das formas orgânica, amoniacal e aniônicas corresponde ao nitrogênio total. Os componentes da fração orgânica podem ser solúveis ou particulados e são facilmente convertidos a amônio pela ação de micro-organismos (MADIGAN et al., 2010).

A soma das frações orgânica e amoniacal corresponde à concentração de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) que, em esgotos domésticos, é da ordem de 40 a 60 mgN.L⁻¹, correspondendo a 6% - 12% da DQO afluente. Aproximadamente 75% estão sob a forma de nitrogênio amoniacal e 25% de nitrogênio orgânico.

Nos processos de tratamento biológico de esgotos, o nitrogênio orgânico é prontamente convertido pelas bactérias heterotróficas em nitrogênio amoniacal no processo de amonificação. O NH₄⁺ formado servirá como fonte de nitrogênio para a síntese da biomassa heterotrófica e fonte de energia para o crescimento de bactérias autotróficas nitrificantes (METCALF e EDDY, 2003; HENZE et al., 2000).

Devido à diversidade de fontes de nitrogênio, a redução do aporte deste nutriente para o controle da eutrofização torna-se mais difícil. Nos esgotos sanitários, as proteínas e a ureia (rapidamente hidrolisada à amônia) constituem as principais fontes. Além disso, esgotos industriais, escoamento das águas pluviais por solos fertilizados e drenagem das águas pluviais urbanas, contribuem para as descargas de nitrogênio nas águas (PIVELI e KATO, 2006).

A amônia é um composto tóxico, que restringe a vida de algumas espécies aquáticas, consumindo oxigênio dissolvido das águas naturais. A Resolução CONAMA N° 357 estabelece concentrações de emissão deste parâmetro com relação ao pH do meio, uma vez que a forma gasosa (NH₃) é mais tóxica do que a iônica (NH₄⁺) e prevalece em ambientes alcalinos. Desta forma, a resolução estabelece os seguintes limites de nitrogênio amoniacal total: 3,7 mg N.L⁻¹ para pH ≤ 7,5; 2,0 mg N.L⁻¹ para 7,5 < pH ≤ 8,0; 1,0 mg N.L⁻¹ para 8,0 < pH ≤ 8,5 e 0,5 para pH > 8,5, em águas de classe 1 (BRASIL, 2005).

Atualmente, não há um padrão de lançamento de esgotos para o nitrato e o nitrito, porém são estabelecidos padrões de qualidade das águas doces, cuja legislação estabelece a concentração máxima de nitrato em 10 mg N-NO₃.L⁻¹ e de nitrito em 1 mg N-NO₂.L⁻¹.

Assim como o nitrogênio, o fósforo é considerado um elemento vital para os sistemas biológicos de todos os seres vivos. Este elemento desempenha um importante papel nos processos metabólicos de armazenamento de energia, transporte ativo de moléculas, divisão celular, entre outros.

O fósforo é encontrado naturalmente em rochas fosfáticas sob a forma de ortofosfato (PO_4^{3-}) combinado com outros elementos. Também é na forma de ortofosfato que ele é encontrado em alimentos naturais e que pode ser absorvido e sintetizado pelos seres vivos. Estima-se que em meados de 2030 a disponibilidade de reservas deste elemento deverá ser reduzida gradativamente, extinguindo-se no período de 50 a 100 anos. Desta forma, devem ser adotadas ações para o reaproveitamento do nutriente, a fim de aumentar o tempo de vida útil de suas reservas (QUEVEDO, 2009).

Em águas e esgotos, o fósforo é encontrado principalmente na forma de fosfato: ortofosfatos, polifosfatos e fosfatos orgânicos. Podem ocorrer em solução ou particulados, ou ainda em corpos de organismos aquáticos. Nas águas naturais, o fosfato se apresenta sob diferentes frações. Esteves (1988) classifica estas frações em fosfato particulado, fosfato orgânico dissolvido e inorgânico dissolvido (ortofosfato), fosfato total e fosfato total dissolvido.

Sawyer et al., (2002) adotaram a classificação em grupos de fosfatos orgânicos, ortofosfatos (íons que se combinam com cátions e formam sais inorgânicos em meio aquoso) e polifosfatos.

As fontes de fosfato variam, podendo advir das águas de abastecimento (quando polifosfatos são adicionados durante o tratamento), de águas residuárias domésticas, uma vez que alguns produtos de limpeza utilizados contêm tais compostos, de fertilizantes utilizados na agricultura, que atingem os corpos d'água pelo carreamento causado pelas chuvas, além dos fosfatos orgânicos que se formam por processos biológicos (APHA, 2012). Os ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} e H_2PO_4) são as formas melhor absorvidas pelo fitoplâncton e outros seres aquáticos (QUEVEDO, 2009).

Apesar de sua essencialidade à manutenção da vida, as interações do fósforo com o meio ambiente em termos de fertilização das águas (eutrofização) têm motivado preocupações ambientais a seu respeito. Ações como o reúso de efluentes para irrigação de solos e a substituição ou restrição do uso de fosfato na fabricação de detergentes de uso doméstico são algumas das medidas que têm sido adotadas para impedir o aporte deste nutriente nos corpos hídricos.

A Resolução CONAMA 359 limita a quantidade de fosfato na forma de tripolifosfato de sódio (STPP) nos detergentes em pó fabricados e importados para consumo no território brasileiro, visando à redução e eventual eliminação do aporte de fósforo nos corpos hídricos (BRASIL, 2005b).

A limitação das concentrações de fosfato nos detergentes é fundamental para a redução dos níveis de eutrofização das águas. Em países como Suíça e Alemanha, a utilização de fosfatos em detergentes foi completamente banida desde 1980 (QUEVEDO, 2009).

2.5 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NUTRIENTES

A remoção biológica de nutrientes tem sido extensivamente aplicada aos esgotos. O processo de BNR pode ser atribuído à atividade de quatro principais grupos de micro-organismos: autotróficos nitrificantes, que oxidam amônia a nitrito e nitrato na presença de oxigênio, heterotróficos desnitrificantes, que reduzem o nitrato a nitrogênio gasoso anoxicamente, os organismos acumuladores de polifosfato (PAOs), que acumulam fósforo utilizando oxigênio como acceptor de elétrons e os organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes (DPAOs), que acumulam fósforo utilizando nitrato ou nitrito como acceptor de elétrons (FREITAS et al., 2005).

Sabe-se que neste processo, os micro-organismos responsáveis pela remoção, capturam os ácidos graxos voláteis (AGVs) disponíveis e os armazenam sob a forma de polihidroxicanoatos (PHAs) anaerobicamente. Nos períodos aeróbio e anóxico, os PHAs armazenados serão consumidos, servindo como fonte de carbono e energia para o crescimento da biomassa (CHEN et al., 2015).

Muitos estudos propõem que os PAOs são divididos em duas frações, onde um grupo está apto a utilizar apenas oxigênio como acceptor final de elétrons e o outro pode utilizar oxigênio ou nitrato. Este último é conhecido por PAOs desnitrificantes (DPAOs), que em meio anóxico comportam-se de maneira análoga aos PAOs em meio aeróbio, com a principal diferença sendo o acceptor final de elétrons. A presença de DPAOs no sistema permite a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo com benefícios como baixa demanda de DQO, baixo consumo de energia com aeração e menor produção de lodo.

As fontes de carbono disponíveis no meio estão diretamente relacionadas com o desempenho do processo BNR. Em geral, os AGVs são as fontes mais apropriadas.

A eficiência da remoção de nutrientes pode ser melhorada pela otimização das condições ambientais que favorecem cada grupo de micro-organismo. A operação de reatores em série, estabelecendo as condições ambientais para estimular o desenvolvimento de

populações microbianas específicas permite uma melhor eficiência da remoção de nutrientes. Alternativamente, o uso de um único reator sob diferentes condições em zonas distintas ou em tempos diferentes da operação reduz os custos operacionais e a área requerida (FREITAS et al., 2005).

2.5.1 Remoção de nitrogênio

A remoção biológica de nitrogênio é um dos métodos mais comuns aplicado para baixas quantidades de nitrogênio amoniacal, garantindo a estabilização das substâncias biodegradáveis. O processo aplicado nas estações de tratamento se assemelha ao que ocorre na natureza e se processa em três fases consecutivas: amonificação, nitrificação e desnitrificação.

O processo de nitrificação ocorre em duas etapas através da ação de dois grupos distintos de bactérias quimiolitotróficas. O primeiro grupo é o das nitritantes, bactérias que oxidam amônia a nitrito (BOA), e o segundo é o das nitratantes, que oxidam nitrito a nitrato (BON). Os principais gêneros de bactérias nitrificantes são *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, dos grupos BOA e BON, respectivamente (MADIGAN, et al., 2010).

Outras bactérias autotróficas são capazes de oxidar amônia a nitrito, tais como *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* e *Nitrosorobrio*. Do mesmo modo, outras bactérias podem oxidar o nitrito: *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitroeystis*. As equações 1 e 2 representam as reações sequenciais que ocorrem nas etapas do processo de nitrificação (METCALF e EDDY, 2003).

Etapa 1: Nitritação (*Nitroso* bactérias)



Etapa 2: Nitratação (*Nitro* bactérias)



Resultando na equação global da reação de nitrificação:



As condições para o crescimento das bactérias nitrificantes precisam ser garantidas para que o processo ocorra. Desta forma, alguns fatores que afetam a taxa de nitrificação necessitam de um maior controle, tais como temperatura, pH, alcalinidade, oxigênio dissolvido e a idade do lodo.

A taxa de nitrificação nos sistemas de lodos ativados decresce com a depleção da temperatura, cuja faixa ótima é de 25 °C e 35°C. Quanto ao oxigênio, maiores taxas de nitrificação ocorrem em concentrações de OD maiores que 2 mg.L⁻¹. A idade do lodo deve ser maior do que 1,25 dias para regiões de clima tropical (HAANDEL e MARAIS, 1999; SURAMPALLI, 1997).

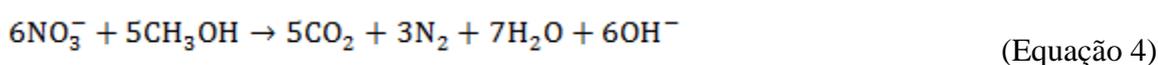
O pH ótimo para a nitrificação está entre 7,5 e 9,0. Durante as etapas de nitrificação e nitratação ocorre a produção de íons H⁺, provocando a diminuição do pH do processo. Para cada mol de amônio oxidado, dois moles de alcalinidade são consumidos. Considera-se o carbonato como o tamponante que neutraliza a produção de prótons durante a oxidação de amônio, sendo necessários 7,14 mg de alcalinidade, expressa como carbonato de cálcio, para cada 1,0 mg de nitrogênio amoniacal oxidado (AHN, 2006). Se não houver alcalinidade suficiente no sistema, os valores de pH podem cair a ponto de inibir a atividade dos nitrificantes (pH < 5,5).

Segundo Metcalf e Eddy (2003), a alcalinidade pode ser fornecida por fontes externas ou produzida a partir da combinação da nitrificação com outros processos, como a amonificação e a desnitrificação, que fornecem alcalinidade ao meio.

A oxigenação do sistema aparece como outro fator primordial para a ocorrência da nitrificação. Em geral, as unidades de tratamento de esgoto com nitrificação necessitam de grandes quantidades de oxigênio disponível, uma vez que este é utilizado tanto pelos organismos responsáveis pela remoção da matéria orgânica, como pelos organismos autótrofos nitrificantes. A nitrificação só se desenvolve quando a matéria orgânica facilmente biodegradável foi consumida. Durante o processo, consome-se cerca de 64 g de O₂/14g de N, aproximadamente 4,57 mg O₂/mg N (METCALF e EDDY, 2003).

A nitrificação é otimizada durante os processos em que são combinadas as reações anaeróbia/aeróbia, pois a quantidade de matéria orgânica é consumida na unidade anaeróbia, reduzindo a atividade das bactérias heterotróficas na aeróbia.

A remoção biológica convencional de nitrogênio se completa com a desnitrificação, processo de redução biológica do nitrato (NO₃⁻) a nitrogênio molecular (N₂) em meio anóxico, utilizando material orgânico como agente redutor (AHN, 2006). A reação da desnitrificação pode ser descrita através da Equação 4.



As bactérias desnitrificantes são, em sua maioria, organismos aeróbios facultativos (utilizam tanto oxigênio quanto nitrato como aceptor final de elétrons) e a sua velocidade de crescimento é maior do que a das nitrificantes. Em baixas concentrações ou ausência de oxigênio, as bactérias utilizam o oxigênio na forma de nitrito e/ou nitrato para metabolizar a matéria orgânica no processo de respiração anóxica (AHN, 2006).

A disponibilidade de uma fonte externa de carbono é um fator importante para a desnitrificação; as bactérias redutoras de nitrito e nitrato necessitam desta fonte doadora de elétrons. Para isto, pode-se aplicar a desnitrificação pré-anóxica, onde se utiliza carbono orgânico afluente - criando uma zona anóxica no reator - ou separando um reator anóxico no início do processo e recirculando o licor misto nitrificado. Alternativamente, pode-se adicionar uma fonte externa de carbono após a nitrificação ou utilizar a respiração endógena para reduzir o nitrato, pelo processo de desnitrificação pós-anóxica.

2.5.2 Nitrificação e desnitrificação simultâneas (SND)

Além do processo convencional de remoção de nitrogênio, muitos estudos demonstraram que os dois processos, nitrificação e desnitrificação, podem ocorrer simultaneamente em um único reator, com boa mistura e sob condições aeróbias - processo denominado SND (do inglês *simultaneous nitrification and denitrification*). Neste processo, o nitrogênio é removido pela oxidação parcial da amônia a nitrito com redução direta a nitrogênio gasoso.

Enquanto a nitrificação necessita de oxigênio, a desnitrificação é inibida na presença deste. Assim, em reatores aeróbios projetados para SND é necessário criar condições para que ambos os processos ocorram. Isto é possível a nível microscópico através da transferência de massa nos flocos de lodos ativados.

O oxigênio é transferido da fase líquida para os flocos. Se o consumo de O_2 na zona externa do floco for maior do que a difusão, cria-se uma zona aeróbia na parte externa, onde ocorre a nitrificação, e uma zona anóxica no interior do floco, onde as bactérias heterotróficas serão capazes de desnitrificar.

Uma vez que a difusão de DQO afluente da fase líquida para os flocos é insuficiente para a desnitrificação, a fonte de carbono exigida é obtida da DQO armazenada pelas

bactérias como produtos intracelulares, como os PHAs, que serão discutidos no próximo tópico (ZENG et al., 2004).

2.5.3 Remoção biológica de fósforo – Processo EBPR

O sistema de remoção biológica avançada de fósforo, do inglês *Enhanced Biological Phosphorus Removal* (EBPR), se caracteriza como o mecanismo mais econômico e de menor impacto ambiental para a remoção do nutriente. O modelo metabólico melhor definido na literatura aponta o gênero *Accumulibacter phosphatis* como principal PAO responsável pelo processo EBPR. Os PAOs removem fósforo inorgânico dos esgotos e o convertem em polifosfato, armazenando-o intracelularmente sob condições anaeróbias. As ligações fosfodiéster do polifosfato são quebradas para fornecer energia para a captura e armazenamento dos ácidos graxos voláteis (AGVs) disponíveis. Esta captura de AGV confere uma vantagem seletiva para o subseqüente crescimento e replicação na fase aeróbia, permitindo a dominância dos PAOs em lodos de EBPR (MARTÍN et al., 2006).

Os PAOs geram energia para a captura de AGV através da hidrólise do polifosfato intracelular e da degradação de glicogênio (glicólise). Sob condições aeróbias e/ou anóxicas, oxidam PHA para fornecer energia para o crescimento celular, reposição de glicogênio e armazenamento de polifosfatos (WINKLER et al., 2011).

Outro grupo de bactérias, conhecido por acumuladores de glicogênio (GAOs), é capaz de competir pelos mesmos substratos que os PAOs. Ambos são capazes de capturar AGVs e armazenar na forma de PHAs, mas os acumuladores de glicogênio não contribuem para a remoção de fósforo (OEHMEN et al., 2005). A configuração do EBPR (anaeróbia/aeróbia/anóxica) confere uma vantagem seletiva aos PAOs, principais responsáveis pelo processo.

Portanto, a fim de favorecer a remoção de fósforo, é preciso controlar os fatores que provocam a competição entre tais micro-organismos neste tipo de sistema biológico. A competição entre PAOs e GAOs pode ser influenciada por vários fatores, tais como: pH, temperatura, razão P/AGV e a composição de ácidos graxos do esgoto (CARVALHEIRA et al., 2014b)

As diversas fontes de AGV disponíveis no meio têm mostrado influência nesta competição. Os PAOs tendem a produzir poli- β -hidroxibutirato (PHB) a partir de acetato e principalmente poli- β -hidroxivalerato (PHV) e poli- β -hidroxi-2-metilvalerato (PH2MV) de propionato, enquanto os GAOs convertem acetato a PHB e PHV. Estudos recentes sugerem

que culturas contendo fonte de propionato favorecem o domínio dos OAPs (OEHMEN et al., 2005).

De acordo com Freitas et al. (2015), o PHA armazenado é oxidado e utilizado para o crescimento celular, síntese de polifosfato e produção de glicogênio. Inicialmente pensava-se que a presença de nitrato inibia a liberação de fósforo, mas isto não parece ter efeito negativo na remoção desse nutriente para concentrações abaixo de $8 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$, dependendo da concentração de DQO facilmente biodegradável no esgoto (VAN NIEL et al., 1998).

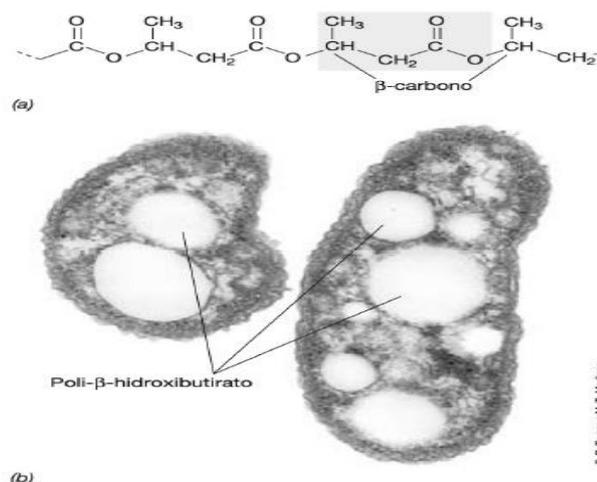
Somente quando a razão N/C é alta, a liberação anaeróbia de fósforo é reduzida e, a longo prazo, a remoção de fósforo pode ser completamente inibida. Além disso, altos níveis de acúmulo de nitrito podem resultar na inibição do metabolismo dos PAOs (SAITO et al., 2004).

2.5.4 O papel dos polihidroxialcanoatos (PHA) no processo EBPR

De acordo com Madigan et al. (2010), grânulos ou outras inclusões são frequentemente encontrados no interior das células, atuando ora no armazenamento de energia ora como reservatório de constituintes estruturais. Nos procariotas, um polímero de armazenamento de carbono, o ácido poli- β -hidroxibutírico (PHB), é um dos corpos de inclusão mais comuns. Os monômeros desse ácido são unidos por ligações éster, formando polímeros de PHB (Figura 1).

Cada polímero pode apresentar de 4 a 18 carbonos (C_4 a C_{18}). Assim, o termo poli- β -hidroxialcanoato (PHA) é utilizado para descrever essa classe de polímeros de armazenamento de carbono. Muitos procariotas, incluindo *Bacteria* e *Archaea* são produtores de PHAs. O glicogênio, polímero de glicose armazenado por procariotas, também é utilizado como reservatório de carbono e energia e é produzido quando há excesso de carbono no meio.

Figura 1 - Estrutura polimérica de PHB (a) e micrografia eletrônica de uma célula bacteriana contendo grânulos de PHB (b)



Fonte: Adaptado de Madigan et al., 2010.

Muitos micro-organismos acumulam polifosfatos na forma de grânulos, que podem ser utilizados como fonte de fosfato para a síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídios para o crescimento celular.

Nos estudos de Morgan-Sagastume, et al. (2015), testes de biologia molecular confirmaram a presença de bactérias filamentosas com habilidade de armazenar PHA, tais como *Actinobacteria* (por exemplo: *Candidatus Microthrix parvicella*) e bactérias da família *Nocardiaceae* (*Rhodococcus spp.*, *Gordonia sp.*) e *Tsukamurella sp.*

Assim como as reservas de polifosfato e carboidrato, o acúmulo de PHA ocorre em resposta a um desequilíbrio no crescimento celular devido às limitações de nutrientes. As bactérias produzem e acumulam estes biopolímeros quando os nutrientes limitantes estão ausentes; a limitação de nitrogênio aumenta ainda mais esta produção.

Para muitas bactérias, uma vez que o polímero é armazenado, servirá como fonte de carbono e energia enquanto os nutrientes estiverem escassos (“*famine phase*”). Os PHAs se caracterizam como materiais de armazenamento ideais de carbono/energia devido à baixa solubilidade e o alto peso molecular (SUDESH et al., 2000).

2.6 LODOS ATIVADOS E REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS

A fim de aumentar a eficiência do tratamento de esgotos, foi desenvolvido o tratamento secundário, caracterizado pelo uso de processos biológicos para a remoção completa de matéria orgânica. Lockett e Ardern, em 1914, notaram que a aeração resultava na remoção do material orgânico e, simultaneamente, formação de flocos macroscópicos de micro-organismos, que podiam ser separados da fase líquida através de decantação simples,

obtendo um lodo biológico. Constatou-se que o retorno deste lodo para a próxima batelada resultava na aceleração do processo de remoção e um crescimento adicional do lodo, o que levou ao uso do termo “lodo ativado”.

Inicialmente, o sistema de lodo ativado operava em regime de bateladas. Nas décadas seguintes, vários pesquisadores trouxeram contribuições que melhoraram o desempenho do sistema. O primeiro grande avanço foi a transformação do regime de bateladas para regime contínuo através da introdução de um decantador de lodo ao reator biológico (HAANDEL e MARAIS, 1999).

2.6.1 Aspectos microbiológicos em lodos ativados

O conhecimento da comunidade microbiológica é de extrema importância para avaliar os fatores que podem estar afetando positiva ou negativamente a estabilidade do sistema de tratamento, facilitando a sua operação e a efetividade.

A observação microscópica do lodo indica o estado em que se encontra o funcionamento dos sistemas de tratamento biológico por lodos ativados. Os micro-organismos responsáveis pela depuração agem sobre os contaminantes do esgoto e dependem de alguns fatores, tais como: composição do meio (matéria orgânica, temperatura, sais), características operacionais do sistema (tempo de retenção celular, aeração, tipo de tratamento), entre outras. Os principais organismos encontrados em lodos ativados são bactérias, protozoários e metazoários (VILASECA, 2001).

- Bactérias: população majoritária nos sistemas de tratamento de esgotos; metabolizam a maior parte da matéria orgânica. A capacidade de formar flocos confere maior sedimentabilidade ao lodo e clarificação do efluente.
- Protozoários (flagelados, amebas, ciliados livre-natantes e pedunculados): organismos mais abundantes em lodos ativados (constituem cerca de 5% do peso seco dos SSVLM) metabolizam a matéria orgânica solúvel e insolúvel; reduzem a concentração de bactérias dispersas; contribuem para a clarificação do efluente.
- Metazoários (rotíferos e nematoides): os rotíferos são encontrados em sistemas bem estabilizados e com excesso de OD; metabolizam partículas sólidas e se alimentam de protozoários e bactérias; contribuem para a clarificação do efluente; nematoides indicam idade de lodo alta.

Um bom desempenho do processo está correlacionado com a população de micro-organismos dominante no sistema. A Tabela 2 apresenta alguns dos principais organismos encontrados e o que sua presença no sistema pode indicar.

Tabela 2 - Relação entre a predominância de micro-organismos e as condições operacionais nos sistemas de lodos ativados

PREDOMINÂNCIA	CONDIÇÕES CARACTERÍSTICAS
Flagelados e amebas	Lodo recente, início de operação ou baixa idade de lodo
Flagelados	Deficiência de aeração, má depuração e sobrecarga orgânica
Ciliados pedunculados e livres; <i>Arcella</i> (tecameba)	Boa depuração
<i>Aspidisca costata</i>	Nitrificação, lodo ideal
Filamentosas	Lodo intumescido
<i>Epistylis</i> (pedunculados), rotíferos	Transição biológica, desempenho crescendo
<i>Vorticella convallaria</i>	Lodos ativados estabilizados
Ciliados pedunculados e rastejantes	Boa eficiência, uma vez que os flocos são utilizados como substrato
Ciliados livre-natantes	Fase inicial de operação, durante a formação de flocos. A predominância em lodo bem formado indica anomalias como sobrecarga ou pouca oxigenação

Adaptado de Figueiredo et al. (1997) e Vilaseca (2001)

Entre a partida da operação e a estabilização do sistema ocorrem modificações sucessivas nas populações de micro-organismos. Na fase inicial, dominam as bactérias dispersas e os protozoários que entram com o afluente; aumenta o número de bactérias e aparecem os ciliados livre-natantes. Os flocos vão se formando e diminui o número de bactérias livres e protozoários flagelados. Desenvolvem-se os ciliados pedunculados capazes de capturar alimentos, extinguindo os ciliados natantes. Finalmente, aparecem os metazoários, que se encontram no final da cadeia (VILASECA, 2001).

Comunidades bacterianas específicas presentes em lodos ativados são capazes de promover a remoção de carbono e nutrientes do esgoto e, por isso, são os elementos-chave de qualquer tratamento biológico de efluentes. Por outro lado, certas espécies influenciam negativamente o processo de tratamento, afetando as propriedades de sedimentação do lodo ativado.

Os sistemas EBPR também se caracterizam como um processo de lodos ativados, pois a remoção de fósforo é alcançada pela recirculação de lodo através da promoção de condições anaeróbias e/ou anóxicas para o enriquecimento do lodo com os PAOs.

Um reator em bateladas sequenciais (RBS) operado em condições alternadas anaeróbia, aeróbia e/ou anóxica pode ser utilizado para favorecer a remoção simultânea de nutrientes e matéria orgânica (FREITAS et al. 2005; CARVALHEIRA et al., 2014 a, b).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Para avaliar o processo de remoção simultânea de nutrientes (fósforo e nitrogênio) em escala piloto e trabalhando com esgoto doméstico real, monitorou-se um reator em bateladas sequenciais (RBS) instalado na área experimental do Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA/UFPE) da estação de tratamento de efluentes (ETE) Mangueira, na cidade de Recife-PE.

A ETE é composta por tratamento preliminar por gradeamento, caixa de areia e calha parshall; tratamento secundário com reatores anaeróbio do tipo UASB e tratamento terciário por meio de lagoa de polimento.

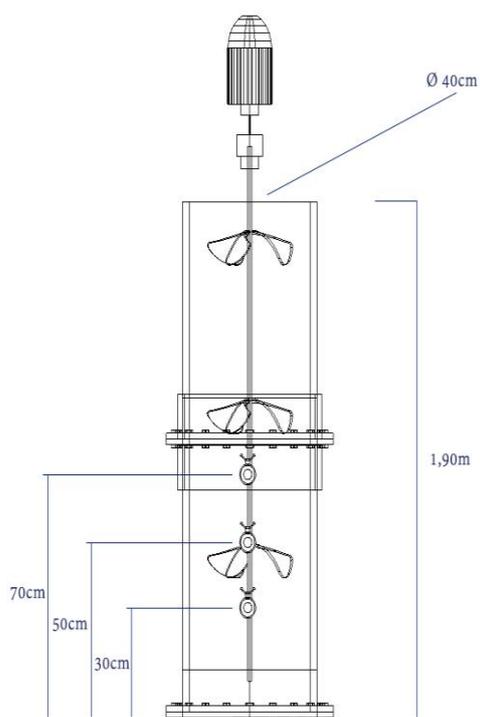
O reator construído em PVC, com 140 L de volume útil e troca volumétrica de 50% (Figura 2) foi monitorado durante este estudo, que foi dividido em duas fases em que foram aplicadas condições operacionais distintas a fim de avaliar a influência dos tempos de reação na eficiência do tratamento. O sistema foi alimentado com esgoto doméstico proveniente do tratamento preliminar da ETE Mangueira. Baseado em estudos anteriores, optou-se pela configuração de fases de reação na sequência anaeróbia/aeróbia/anóxica para promover a remoção simultânea dos nutrientes e da matéria orgânica.

A operação do reator foi automatizada com duas válvulas solenoides normalmente fechadas, uma para enchimento e outra para esvaziamento, conectadas a um Controlador Lógico Programável (CLP). A cada batelada, um comando era enviado do CLP para as válvulas conectadas a um reservatório superior, que alimentava o reator por gravidade a partir do comando de abertura da válvula solenoide para entrada do esgoto. Uma boia de nível instalada no reator informava ao CLP quando se atingia o volume útil; neste momento um agitador mecânico era acionado e permanecia agitando (130 rpm) até o final da fase anóxica. Na Figura 3 é apresentado um esquema da instalação do sistema experimental.

Para promover a aeração no sistema, um compressor de ar modelo CSA 8,2/25 – 2,0 HP (Schulz) foi acionado e fornecia ar para o sistema durante toda fase reacional aeróbia. A vazão de ar foi medida através de um rotâmetro instalado no reator. O fornecimento de ar foi feito em fluxo ascendente, através de uma mangueira perfurada (bolhas finas) localizada no fundo do reator.

Neste estudo, o mesmo reator foi monitorado em ambas as fases de operação. As divergências entre cada operação estão resumidamente descritas na Tabela 3 e serão detalhadas na seção seguinte.

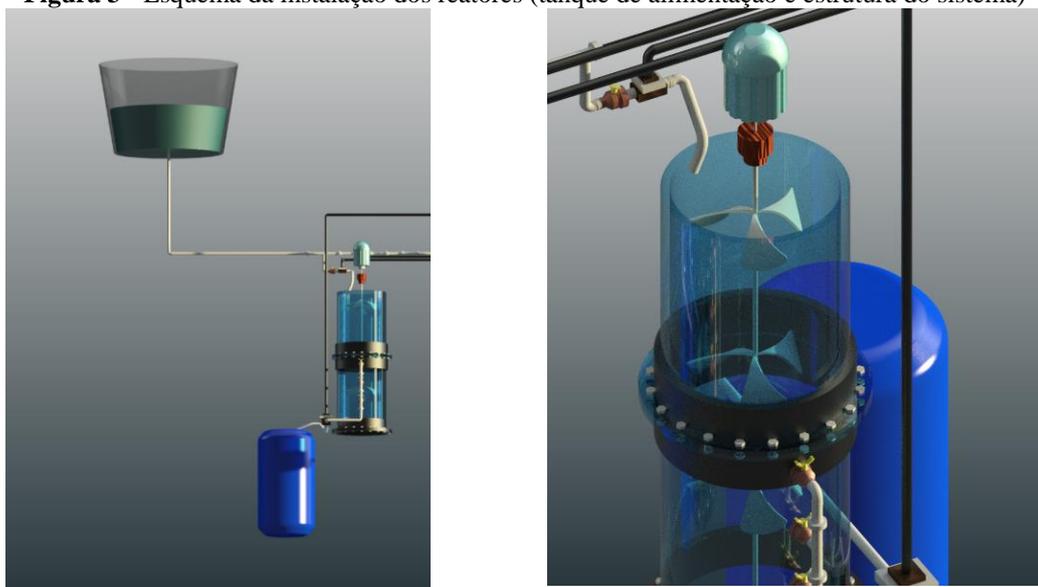
Figura 2 - (a) dimensões do reator; (b) reator instalado na unidade experimental



(a)



(b)

Figura 3 - Esquema da instalação dos reatores (tanque de alimentação e estrutura do sistema)**Tabela 3** - Condições experimentais aplicadas nas duas fases operacionais

Condição	Fase 1	Fase 2
Regime de aeração	Contínuo	Contínuo
Faixa de concentração de OD	3 – 5 mg.L ⁻¹	3 – 7 mg.L ⁻¹
Tempo de ciclo	8 h	6 h
Fases de reação	Duração (min)	
	Fase 1	Fase 2
Enchimento + Anaeróbia	120	120
Aeróbia	240	120
Anóxica	75	95
Sedimentação + Esvaziamento	45	25

3.1.1 Fase 1

Nesta fase operacional, o reator RBS foi monitorado durante 216 dias. O sistema foi operado com ciclos de 8 horas e períodos de reação divididos conforme a Tabela 3.

Em média, a carga orgânica volumétrica aplicada foi de 0,46 kgDQO.m³.dia⁻¹ com vazão diária de esgoto de 0,210 m³.dia⁻¹, considerando a troca volumétrica de 50% por batelada. Não foi adicionado inóculo ao meio, optou-se por acompanhar o desenvolvimento natural da biomassa.

As fases de reação seguiram a ordem anaeróbia/aeróbia/anóxica. O esgoto que alimentava o reator é considerado diluído, de acordo com a classificação de Metcalf & Eddy

(2003). Desta forma, considerou-se necessário o fornecimento de fonte de carbono na fase anóxica a fim de promover a desnitrificação. Para isto, foi adicionada uma entrada de 3,5 L de esgoto bruto após vinte minutos do início da fase.

3.1.2 Fase 2

A partir dos resultados verificados na Fase 1, foram determinadas as condições que seriam aplicadas na segunda fase operacional (Tabela 4). O tempo de ciclo foi reduzido para 6 horas a fim de verificar a possibilidade de se obter uma boa eficiência com bateladas de durações mais curtas. O tempo operacional foi de 54 dias; a duração da primeira fase foi maior a fim de acompanhar o crescimento natural dos micro-organismos, sem adição de inóculo. Já na segunda fase, o reator foi inoculado com lodo da Fase 1 na concentração SSVLM de 200 mg.L^{-1} .

A carga orgânica volumétrica média foi de $0,60 \text{ kgDQO.m}^3.\text{dia}^{-1}$ com vazão diária de esgoto de $0,280 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$, considerando a troca volumétrica de 50% por batelada. Devido aos resultados obtidos na fase anterior, optou-se por não adicionar fonte de carbono na fase de desnitrificação (anóxica).

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para avaliar a remoção simultânea de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, bem como para a caracterização do esgoto, foram realizadas análises físico-químicas ao longo do período de operação. Uma vez que se atingiu a estabilização do sistema, perfis temporais das bateladas foram realizados em cada fase de operação a fim de avaliar as fases de reação de todo o processo de tratamento e os possíveis caminhos metabólicos dos micro-organismos.

Foram realizadas análises semanais em amostras de afluente e efluente ao longo do período de operação e em pontos definidos durante as fases de reação para os perfis das bateladas em cada reator. Fósforo total, ortofosfato (P-PO_4^{3-}), nitrogênio amoniacal, nitrato e nitrito (N-NH_3 , N-NO_3^- , N-NO_2^-), demanda química de oxigênio (DQO), ácidos graxos voláteis (AGV), alcalinidade, polihidroxialcanoatos (PHA) e sólidos suspensos voláteis (SSV) do afluente, efluente e do licor misto; os parâmetros foram determinados pelos métodos analíticos indicados na Tabela 4.

Para a determinação da DQO solúvel foi utilizada membrana com porosidade de $1,2 \mu\text{m}$. Já para ortofosfato, nitrato e nitrito, as amostras foram filtradas em membranas de porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. Todas as análises realizadas no perfil foram feitas com as amostras filtradas na membrana de $1,2 \mu\text{m}$ e, para as determinações de fósforo, na de $0,45 \mu\text{m}$. A

Tabela 5 apresenta os pontos e tempos de coleta das amostras para traçar o perfil das bateladas.

Tabela 4 - Parâmetros analisados e métodos analíticos

Parâmetros	Método analítico (Referência)
DQO	Colorimétrico SM 5220D*
Alcalinidade	Titulométrico SM 2320*
AGV	Cromatografia gasosa SM 6200B*
PHA	Cromatografia gasosa (Comeau et al., 1988; Oehmen et al., 2015)
P-PO ₄	Colorimétrico (ácido ascórbico) SM 4500PE*
N-NH ₃	Titulométrico SM 4500C*
N-NO ₃ ⁻	UV/Visível e cromatográfico SM 4500B*
N-NO ₂ ⁻	Cromatográfico e colorimétrico SM 4500B *
SSV	Gravimétrico*
pH, potencial redox, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido	Potenciométrico * (multiparâmetro HACH HQ40d)

*APHA, 2012.

3.2.1 Análise cromatográfica de PHA no lodo

A análise de PHA (Figura 4) foi realizada em três etapas principais: (1) liofilização da biomassa coletada, (2) conversão dos PHAs em metil-ésteres e (3) detecção por cromatografia.

Para a amostragem, foram coletados 100 mL de licor misto durante os perfis de batelada e centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos. Após centrifugar, descartou-se o sobrenadante e as amostras foram congeladas e liofilizadas até completa secagem.

O processo de liofilização foi realizado no liofilizador SP Scientific – Advantage Pro aplicando as condições de -54°C e pressão de 0,1 mbar.

Para a conversão em ésteres metílicos, 20 mg de lodo liofilizado foram adicionados a tubos de 10 mL com tampas teflon hermeticamente fechados. Cada amostra de lodo foi combinada com 2 mL de uma solução acidificada de metanol (10% ácido sulfúrico), contendo

ácido benzoico como padrão interno e 2 mL de clorofórmio. As amostras foram digeridas a 100°C durante 3 h 30 min.

Após a digestão, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 mL de água ultrapura (Milli-Q®) às amostras para eliminar partículas e estas foram homogeneizadas em agitador *vortex* por 5 minutos e centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos. Com a separação das fases, a fase orgânica (localizada no fundo do tubo) foi extraída para análise em cromatógrafo gasoso Agilent 7890 A, operado com uma coluna DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), injeção split razão 1:15 e hidrogênio como gás de arraste (1 mL.min⁻¹). O detector de ionização de chama foi operado a 300 °C com temperatura de injeção de 210 °C. A rampa de temperatura do forno foi configurada a 100 °C por 1 min, aumentando a 8 °C.min⁻¹ até 160 °C, e, por fim, a 270 °C a 45 °C.min⁻¹ mantida por 3 min. O volume de amostra injetada foi de 1 µL.

Figura 4 - Metodologia para determinação de PHAs na biomassa

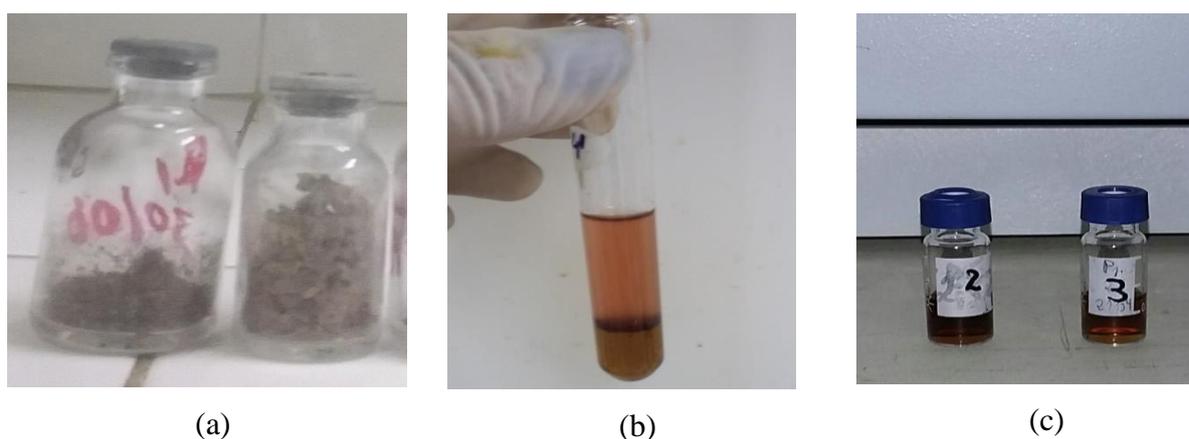


Tabela 5 - Pontos de amostragem e análises realizadas nos perfis temporais

Fase 1	T	DQO	AGV	PHA	Fósforo	Nitrogênio	Alcalinidade
Afluente	0h	X	X		X	X	X
Mistura	1min	X	X	X	X	X	X
Anaeróbia	1h	X	X	X	X	X	X
	2h	X	X	X	X	X	X

Continuação Tabela 5 – Pontos de amostragem e análises realizadas nos perfis temporais

Aeróbia	3h	X		X	X	X	X
	4h	X		X	X	X	X
	5h	X		X	X	X	X
	6h	X		X	X	X	X
Anóxica	6,3h	X		X	X	X	X
	7,25h	X		X	X	X	X
Sedimentação	7,75h	X			X	X	X
Efluente	8h	X			X	X	X
Fase 2							
Afluente	0h	X	X		X	X	X
Mistura	1min	X	X	X	X	X	X
	0,5h	X	X	X	X	X	X
Anaeróbia	1h	X	X	X	X	X	X
	2h	X	X	X	X	X	X
	2,5h	X		X	X	X	X
Aeróbia	3h	X		X	X	X	X
	4h	X		X	X	X	X
Anóxica	5h	X		X	X	X	X
	5,25h	X		X	X	X	X
Sedimentação	5,41h	X		X	X	X	X
Efluente	6h	X			X	X	X

3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.3.1 Microscopia óptica

Para avaliar a população de micro-organismos envolvida no processo de tratamento estudado, foram realizadas análises microscópicas utilizando um microscópio óptico binocular da marca Leica-DME equipado com objetiva de 10, 20, 40 e 100 vezes e ocular de medição acoplada. Amostras frescas de licor misto foram coletadas dentro do reator ao final da fase de reação aeróbia.

Na amostragem, foram utilizadas lâminas e lamínulas de vidro para a visualização óptica, analisando-se a estrutura, identificação e predominância de micro-organismos. Para registrar a diversidade microbiana encontrada, foram capturadas imagens utilizando uma câmera BEL view 7.1 photonics acoplada ao microscópio.

3.3.2 Técnicas de biologia molecular

Amostras de licor misto foram coletadas no reator para aplicação das técnicas de biologia molecular de reação em cadeia polimérica (PCR). Para isto, o DNA das amostras foi extraído utilizando um kit Power Soil™ DNA Isolation (Laboratório MoBio). A amplificação da PCR foi realizada em um termociclador “My cycle” (Bio-Rad), empregando-se iniciadores (*primers*) específicos para avaliar a ocorrência dos principais grupos de interesse na remoção de nitrogênio e fósforo. Na Tabela 6 são apresentados os *primers* utilizados e as referências dos métodos aplicados na PCR.

Tabela 6 - Grupos de micro-organismos e *primers* utilizados na reação PCR

Grupo de micro-organismos	Primer (Referência)
Bactérias oxidadoras de ammonia	NSO190F/NSO1225R (Hikuma et al. 2002)
<i>Nitrospira</i>	NTS232F/NTS1225R (Lim et al. 2008)
Bactérias desnitrificantes	NirS 2F-GC/NirS 3R (Nittami et al. 2003)
<i>Anammox</i>	AMX368F/AMX820R (Schmid et al. 2003)
PAO	651F/846R (Crocetti et al. 2000)

3.3.3 Medição da taxa de consumo de oxigênio pela biomassa (respirometria)

A atividade da biomassa foi avaliada em três etapas, em que se calcula a taxa de consumo de oxigênio (TCO) para: a respiração basal, a nitrificação e para o consumo de matéria orgânica. A análise foi realizada utilizando um respirômetro Beluga®.

Para isto, foi coletado 1 L de licor misto do reator, que era submetido à aeração num período de 24h a 48h antes da análise. Este era o tempo suficiente para a oxidação máxima da matéria orgânica e nitrificação.

Durante as 3 etapas, o licor misto era aerado até atingir a saturação de oxigênio dissolvido (OD); após saturado, a aeração era interrompida para que fosse medido o consumo de OD.

Na primeira etapa, a respiração basal, a TCO era calculada para o meio sem adição de substrato a fim de avaliar a ocorrência da endogenia.

A segunda etapa, a nitrificação, consistia na medição da TCO para o meio com as condições ideais de alcalinidade e amônia para oxidação. A alcalinidade parcial do meio era calculada para verificar a quantidade de bicarbonato de sódio que seria adicionada ao meio para favorecer a nitrificação, considerando que 2 mol de H⁺ são produzidos por mol de nitrato (HAANDEEL e MARAIS, 1999). Como fonte de nitrogênio amoniacal, foi adicionada uma solução de cloreto de amônio (0,15 g.L⁻¹).

Finalmente, para medição da TCO de consumo de matéria orgânica, era adicionado um inibidor da nitrificação (solução de N-allylthiourea 0,03 g.L⁻¹) e como fonte de carbono, uma solução de acetato de sódio (0,24 g.L⁻¹).

Com as TCO medidas nas três etapas, foi determinada a taxa de consumo específica (TCO_e) através da Equação 5.

$$TCO_e = \frac{TCO}{SSVLM}$$

Equação 5 – Taxa específica de consumo de oxigênio.

TCO= taxa de consumo de oxigênio; SSVLM = concentração de SSV do licor misto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização do esgoto afluyente realizada por meio de coletas semanais está representada na Tabela 7. De acordo com a classificação de Metcalf e Eddy (2003), o esgoto doméstico estudado é classificado como diluído, considerando o valor médio dos parâmetros avaliados.

A composição do esgoto avaliado é variável, o que leva a desvios padrões elevados. Tais variações ocorrem em função dos hábitos de consumo de água e consequente produção de esgoto pela população, além das contribuições de águas pluviais na rede coletora, resultando em um efluente bastante diluído.

Tabela 7 - Caracterização do esgoto afluyente

Parâmetro	Fase 1	Fase 2
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	646,9 ± 131,8	733,7 ± 171,0
DQO _{total} (mg.L ⁻¹)	309,5 ± 174,8	299,5 ± 129,9
N total (mg.L ⁻¹)	32,2 ± 6,0	34,4 ± 6,8
N-amoniaco (mg.L ⁻¹)	20,9 ± 3,6	24,7 ± 7,3
P total (mg.L ⁻¹)	3,1 ± 1,2	3,3 ± 1,3
pH	6,8 ± 0,2	7,4 ± 0,2
Temperatura (°C)	29,6 ± 0,9	29,9 ± 0,1
Condutividade (µS.cm ⁻¹)	913,5 ± 89,6	972,3 ± 54,1

Os parâmetros pH e temperatura estiveram na faixa ideal para o tratamento por lodos ativados e remoção de nutrientes.

A estabilidade do pH está relacionada com a alcalinidade, cujo valor médio no esgoto bruto foi de 197,7 ± 35,7 mgCaCO₃.L⁻¹ (Fase 1) e 238,5 ± 22,0 mgCaCO₃.L⁻¹ (Fase 2). Em ambas as fases o valor mínimo da alcalinidade total afluyente foi superior ao mínimo necessário para manter a biomassa estável em reator de lodos ativados (70 mgCaCO₃.L⁻¹) de acordo com Metcalf e Eddy (2003). O valor do pH influencia também o mecanismo EBPR; Oehmen et al. (2007) sugerem que os sistemas EBPR são favorecidos em pH superior a 7,25.

As remoções dos nutrientes e de matéria orgânica serão apresentadas por fase operacional para fins de comparação entre as eficiências e evolução do tratamento ao longo de cada período.

Vale ressaltar que, para a primeira fase, o período de operação foi maior, devido ao acompanhamento do crescimento natural dos micro-organismos, sem adição de inóculo. Além disso, a primeira fase consistiu em adaptar as condições operacionais do sistema, tais como a aeração e configurações das bateladas. Na segunda fase, a biomassa estável foi mantida em

condições anaeróbias e depois inoculada para avaliar a capacidade de readaptação dos micro-organismos e a evolução do tratamento.

4.1 REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA

4.1.1 Fase 1

A remoção da matéria orgânica é o primeiro resultado a ser observado em sistemas de tratamento biológico de esgotos, pois as bactérias, principais decompositores, crescem em intervalos de tempo mais curtos do que outros micro-organismos heterótrofos. As Figuras 5 e 6 apresentam os resultados de DQO total e solúvel ao longo da primeira fase.

Figura 5 - Concentrações de DQO total ao longo da operação da Fase 1

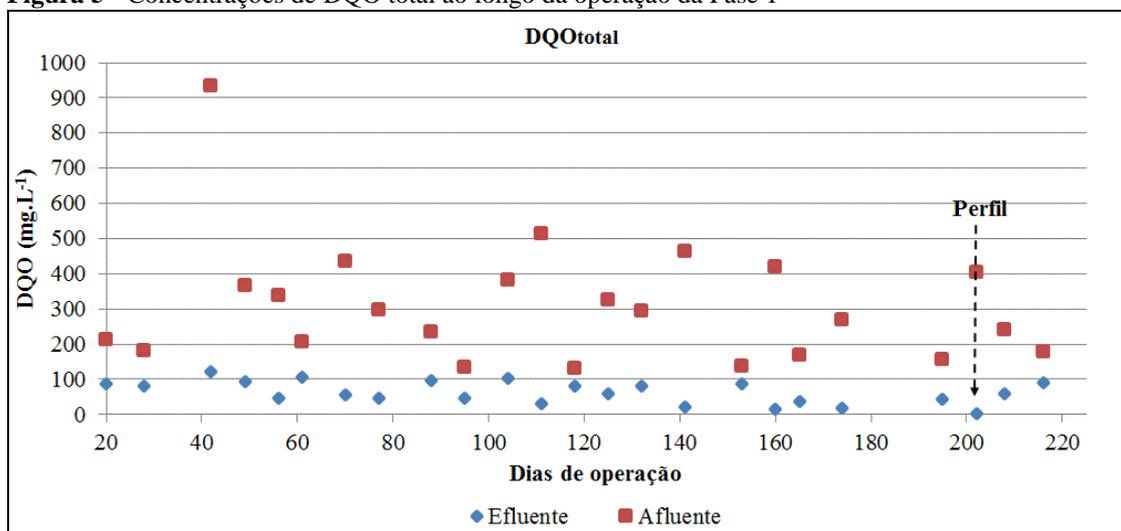
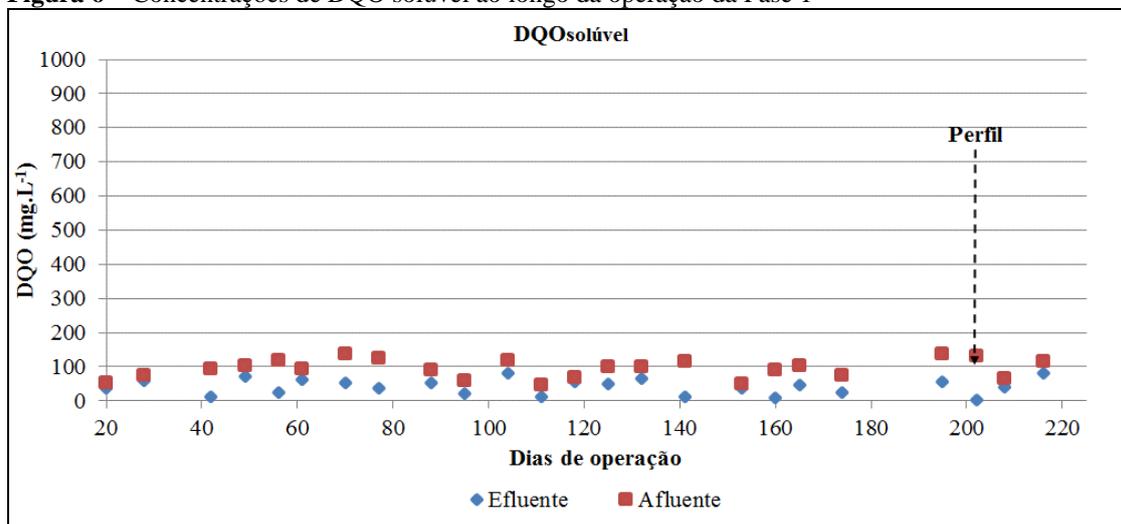


Figura 6 – Concentrações de DQO solúvel ao longo da operação da Fase 1



A DQO total afluente apresentou uma concentração média de $309,5 \pm 174,8 \text{ mg.L}^{-1}$. A concentração elevada de DQO afluente no 42º dia de operação ocorreu devido a uma manutenção realizada no sistema de tratamento da ETE, que ocasionou uma elevação do material particulado no esgoto afluente ao sistema. Comparando com os resultados para material orgânico solúvel (fração facilmente biodegradável), pode-se perceber que a maior parte da fração orgânica do afluente se apresentou na forma particulada.

A remoção de DQO total foi o primeiro parâmetro a apresentar remoções satisfatórias já nos primeiros 30 dias de operação. Entretanto, ocorreram muitas oscilações até a estabilização do sistema, que ocorreu a partir de 160 dias de operação.

Considerando, para o cálculo de remoção de matéria orgânica, a DQO total afluente e a solúvel efluente ao longo de todo o período operacional, obteve-se remoção média de $81,4 \pm 13,3 \%$ da matéria orgânica.

No período de estabilização, o efluente apresentou valores muito próximos de DQO solúvel e total, o que indica boa sedimentação do lodo e clarificação do efluente.

4.1.2 Fase 2

Na segunda fase, o reator foi inoculado com a biomassa da fase anterior, que foi mantida sob condições anaeróbias antes do *start-up* do sistema e, por isso, necessitou de um período para readaptação (aclimação), que foi relativamente curto. As Figuras 7 e 8 apresentam as concentrações de DQO total e solúvel ao longo desta fase.

Figura 7 - Concentrações de DQO total ao longo da operação da Fase 2

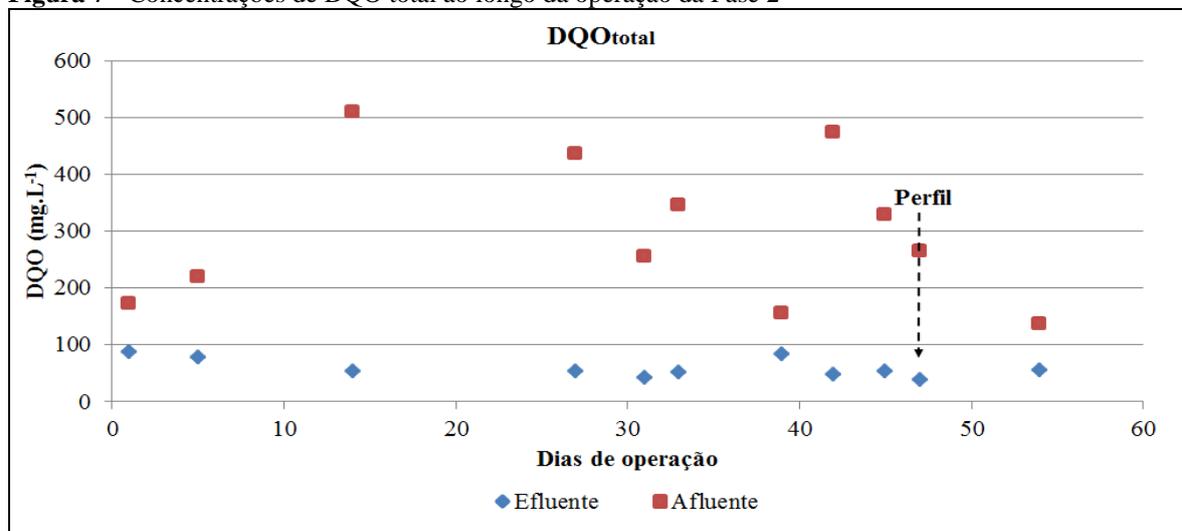
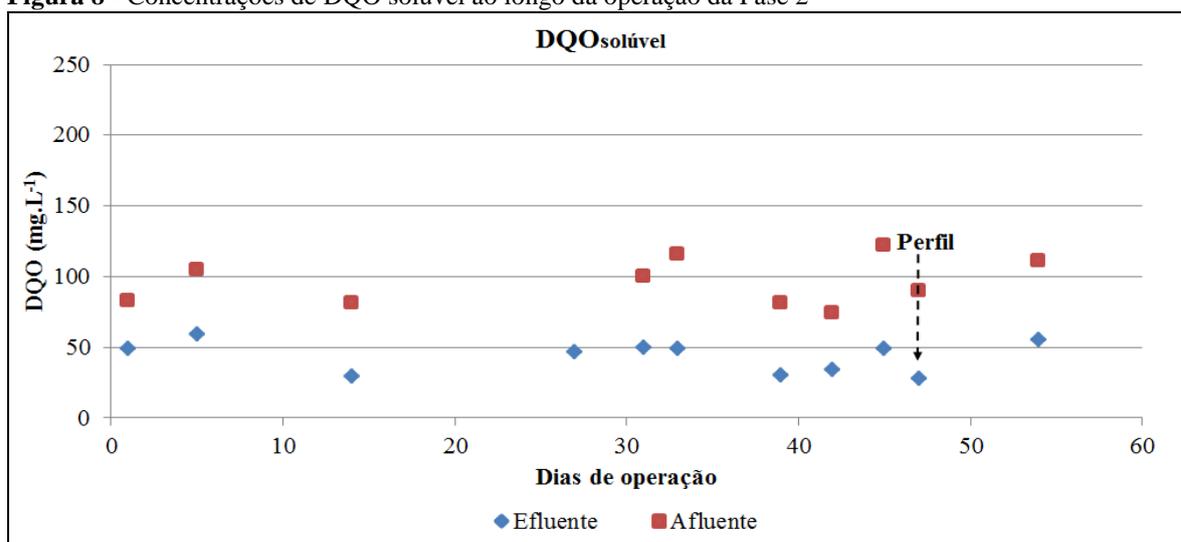


Figura 8 - Concentrações de DQO solúvel ao longo da operação da Fase 2

Com o fornecimento de aeração ao meio, o sistema se estabilizou rapidamente, mantendo as concentrações de saída de DQO total e solúvel muito próximas a partir do 27º dia de operação.

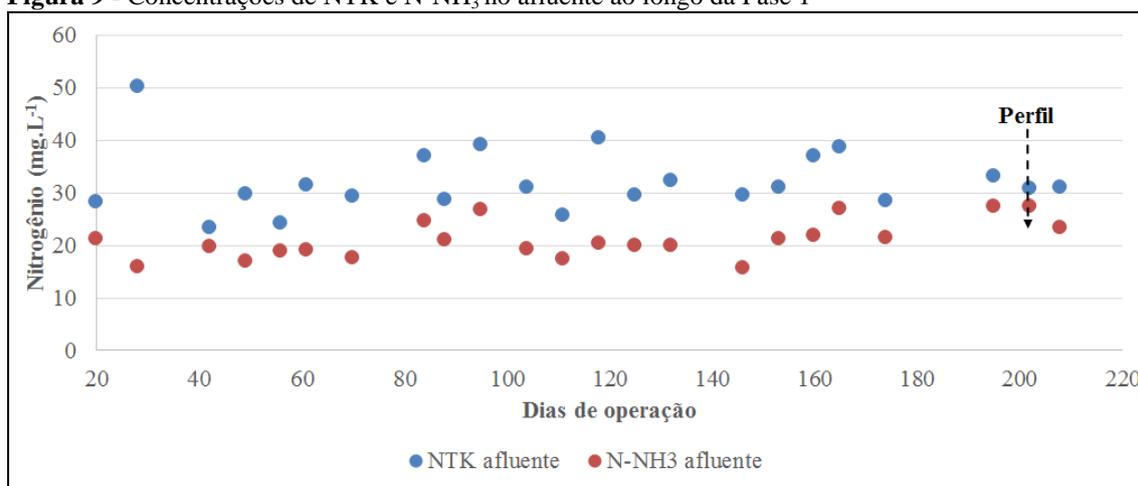
Considerando os valores de DQO total afluente e DQO solúvel efluente ao longo do período operacional, a remoção média de matéria orgânica foi de $81,8 \pm 10,2\%$ de remoção da matéria orgânica.

Nesta fase foi observada uma otimização na remoção da matéria orgânica, bem como na sedimentação do lodo e clarificação, que se refletiu nos valores muito próximos para o efluente total e solúvel.

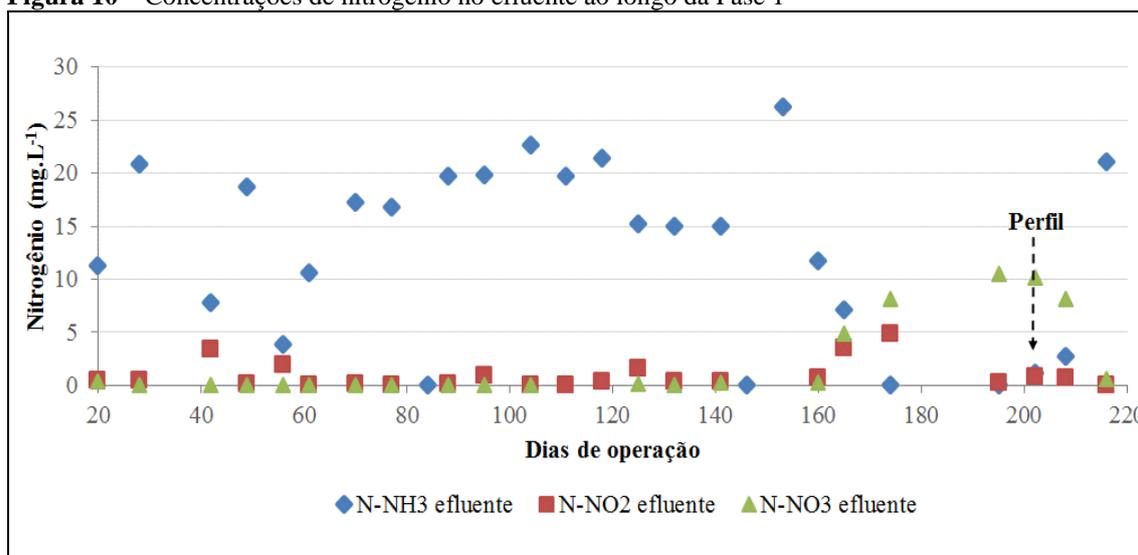
4.2 REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

4.2.1 Fase 1

Na Figura 9 é apresentada a caracterização do afluente quanto ao nitrogênio ao longo do período operacional. Percebe-se que a maior parte do afluente é constituída de nitrogênio amoniacal, como é típico em esgotos domésticos.

Figura 9 - Concentrações de NTK e N-NH₃ no afluente ao longo da Fase 1

Na Figura 10 são apresentados os resultados da remoção de nitrogênio por meio das concentrações no efluente.

Figura 10 – Concentrações de nitrogênio no efluente ao longo da Fase 1

A partir dos valores de nitrogênio no efluente, verificou-se que após o período de 160 dias, começou a ser observada a estabilização do sistema, com a oxidação completa do nitrogênio amoniacal. Neste período o sistema apresentou remoção de $88,3 \pm 8,5$ % de nitrogênio amoniacal e $55,1 \pm 11,0$ % de remoção de nitrogênio total.

A relação de DQO/NTK para o período de operação foi de 9,6.

A nitrificação foi bem-sucedida. Entretanto, a desnitrificação foi pouco observada, com concentrações de nitrato no efluente na faixa de $5 - 10$ mg.L⁻¹. Estes resultados sugerem que a fase anóxica do processo poderia ser otimizada para promover a desnitrificação.

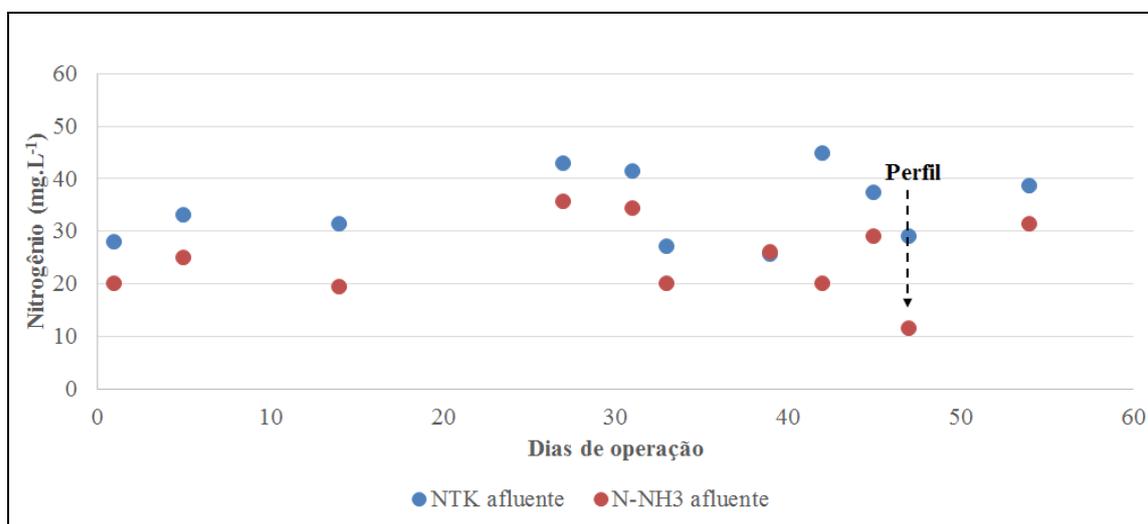
Barnard (1991) relatou que a desnitrificação completa pode ser atingida em esgoto sanitário com relação DQO/NTK de 7. Os resultados do perfil temporal que serão apresentados na seção 7 apresentam uma discussão mais detalhada desta observação.

4.2.2 Fase 2

Na Figura 11 são apresentados os dados de nitrogênio afluente na segunda fase.

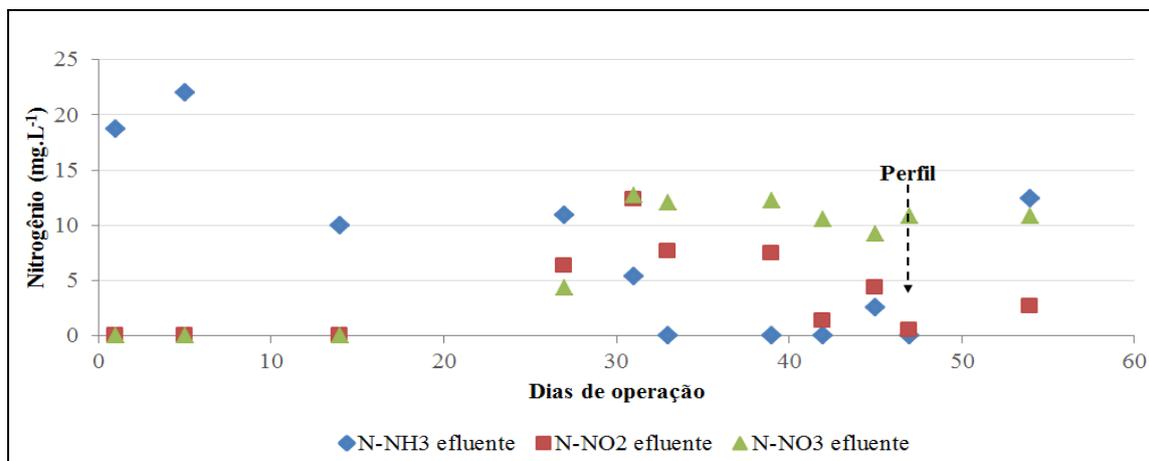
Do mesmo modo, na segunda fase operacional a composição do esgoto afluente apresentou predominância da forma amoniacal. A relação DQO/NTK foi de 8,8.

Figura 11 – Concentrações de NTK e N-NH₃ no afluente ao longo da Fase 2



Na Figura 12 apresentam-se os resultados da remoção de nitrogênio por meio das concentrações no efluente.

Figura 12 - Concentrações de nitrogênio no efluente ao longo da Fase 2



O período requerido para estabilização do sistema para remoção de N também foi menor do que para a Fase 1, podendo ser observada a nitrificação a partir do 27º dia de operação e oxidação completa da amônia a partir do 32º dia. Entretanto, a desnitrificação completa não foi observada, mesmo com a prolongação da fase anóxica, sugerindo uma necessidade de otimização desta fase. O efluente final ainda apresentou concentrações de nitrato na faixa de 5 – 12 mg.L⁻¹.

O fato de não ter sido adicionada a fonte de carbono na fase anóxica não prejudicou a operação nesta fase, cuja adição não foi suficiente para a completa desnitrificação na Fase 1.

Os resultados sugerem que a estabilização para a remoção de nitrogênio ainda estava em sua fase inicial. Após a realização do perfil, onde se obteve uma oxidação completa de amônia, na coleta realizada no 47º dia de operação, observou-se saída de amônia com o efluente. Isto pode ser reflexo de deficiência de aeração no sistema no dia analisado, o que diminui a atividade das bactérias nitrificantes, que são sensíveis a variações de OD.

4.3 REMOÇÃO DE FÓSFORO

4.3.1 Fase 1

Na Figura 13 é apresentado o comportamento do fósforo total afluente e efluente ao longo do período operacional. Valores constantes de remoção de P foram obtidos também após 160 dias de operação, período necessário para o crescimento e estabilização da biomassa, com eficiência média de $88,3 \pm 8,5\%$. O comportamento da fração solubilizada (ortofosfato) é apresentado na Figura 14 e apresentou o mesmo perfil do fósforo total.

Os resultados demonstram que a maior parte do fósforo afluente se apresentou na forma particulada. A relação DQO/P para esta fase operacional foi de 99,8.

Figura 13 - Comportamento do fósforo total ao longo do período operacional da Fase 1.

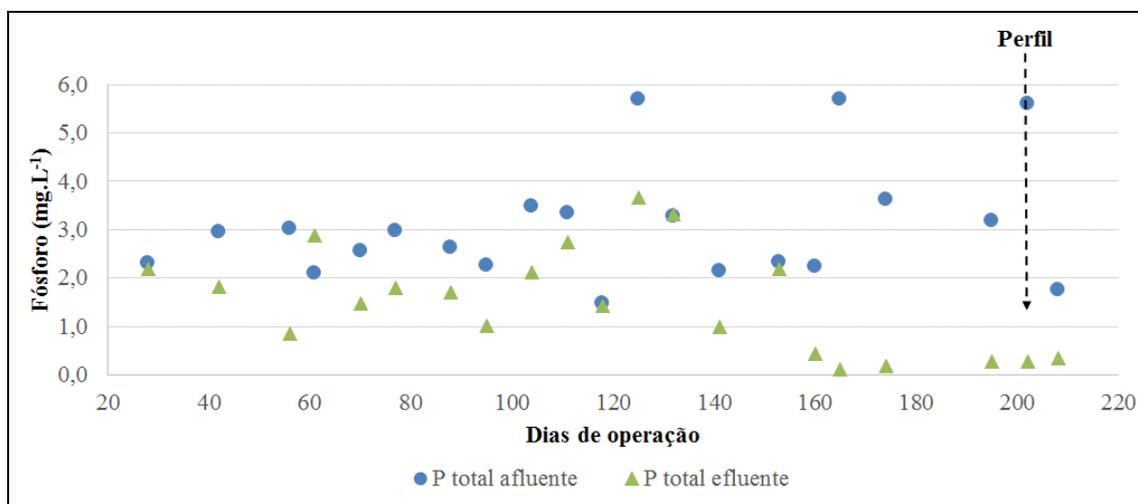
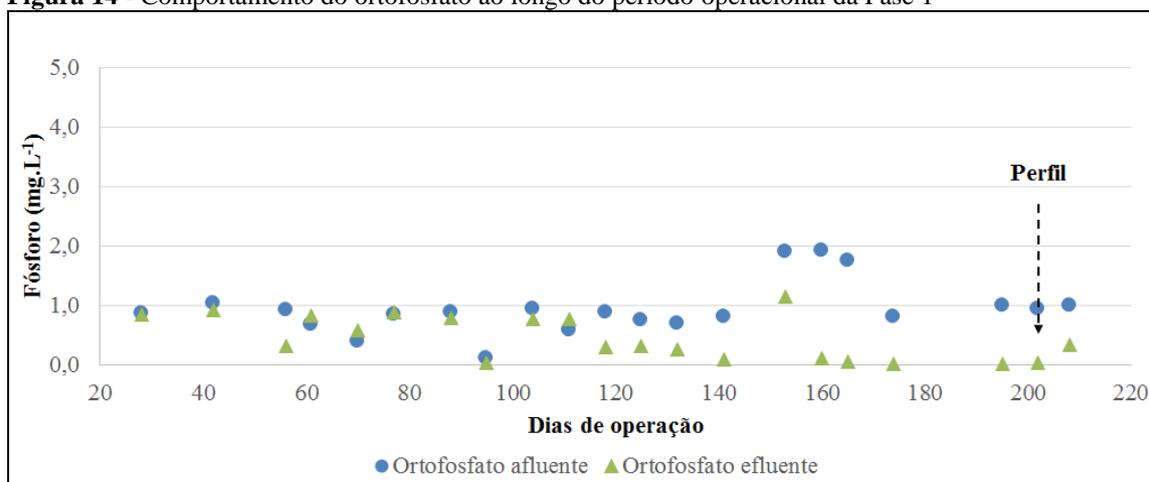


Figura 14 - Comportamento do ortofosfato ao longo do período operacional da Fase 1



As eficiências de remoção obtidas indicaram a ocorrência do processo EBPR no reator. A partir dos resultados obtidos através do perfil da batelada (que serão demonstrados adiante), foi possível avaliar e discutir mais detalhadamente acerca da remoção ao longo de um ciclo.

4.3.2 Fase 2

Na segunda fase operacional, o comportamento das formas de fósforo e ortofosfato afluente foram similares ao da primeira fase (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Comportamento do fósforo total ao longo do período operacional da Fase 2

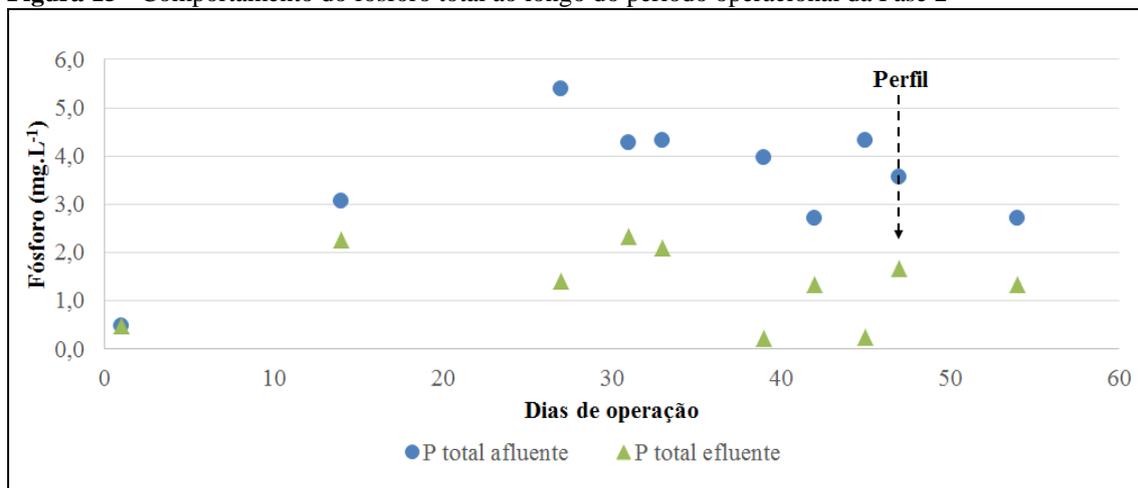
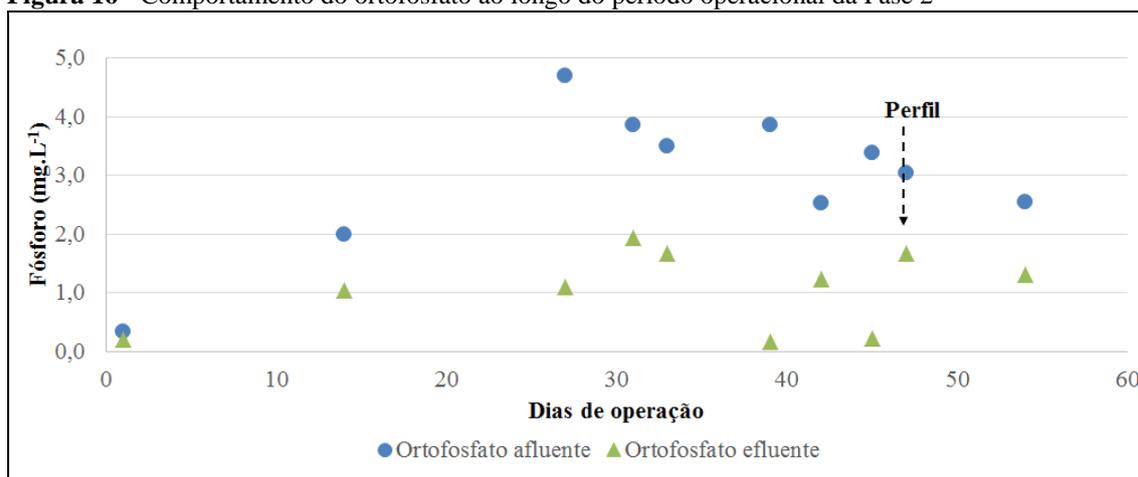


Figura 16 - Comportamento do ortofosfato ao longo do período operacional da Fase 2



A estabilização do sistema para a remoção de fósforo se iniciou em 27 dias de operação. A eficiência de remoção do fósforo total no período considerado estável foi de $71,1 \pm 18,0 \%$.

É importante salientar, que nesta fase de operação a concentração de sólidos suspensos voláteis no licor misto (SSVLM) foi maior e manteve-se estável em todo o período avaliado; diferentemente do ocorrido na Fase 1, em que houve muitas perdas de biomassa, problemas operacionais, especialmente nos compressores, prejudicando a aeração do sistema e, consequentemente a atividade dos micro-organismos.

Uma parada no sistema devido a problemas com a automação ocorrida nos primeiros dias de operação não causou grandes prejuízos ao sistema, que se readaptou em pouco tempo.

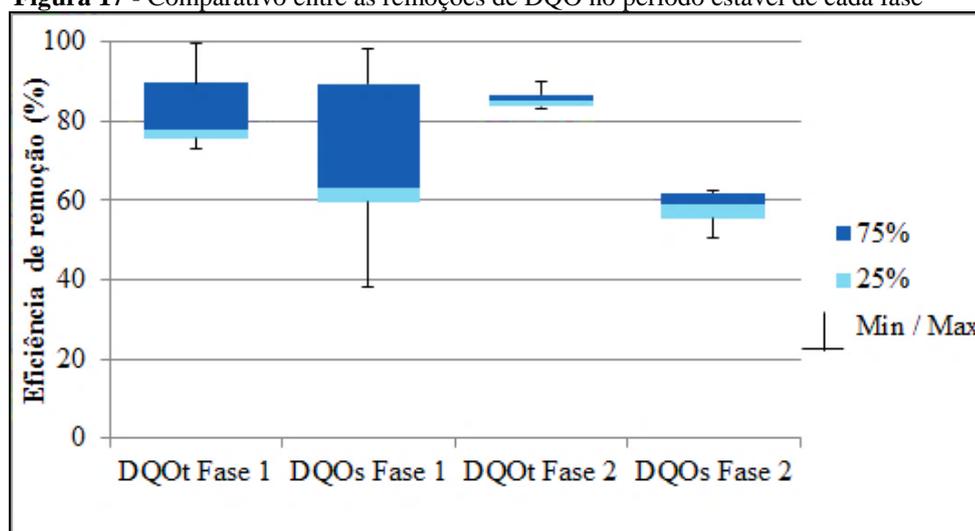
4.4 COMPARAÇÃO DA REMOÇÃO DE NUTRIENTES ENTRE AS FASES OPERACIONAIS

Neste tópico será feita uma avaliação geral para comparar a remoção de nutrientes no período estacionário de cada fase operacional (Fase 1: 160-216 dias; Fase 2: 27–54 dias). Serão discutidas as eficiências de remoção dos principais parâmetros para este estudo (matéria orgânica, nitrogênio e fósforo). Além disso, será apresentada uma caracterização da entrada de nutrientes ao sistema e as razões de DQO/N e DQO/P afluentes.

4.4.1 Matéria orgânica

Na Figura 17 apresenta-se um comparativo entre a remoção de DQO total e solúvel entres as duas fases operacionais em seu período estável.

Figura 17 - Comparativo entre as remoções de DQO no período estável de cada fase



Para a primeira fase, a remoção de DQO total esteve na faixa de 73,1 – 99,4 %.

A fração solúvel apresentou maior variação, estando na faixa de 38,2 – 98,2 %.

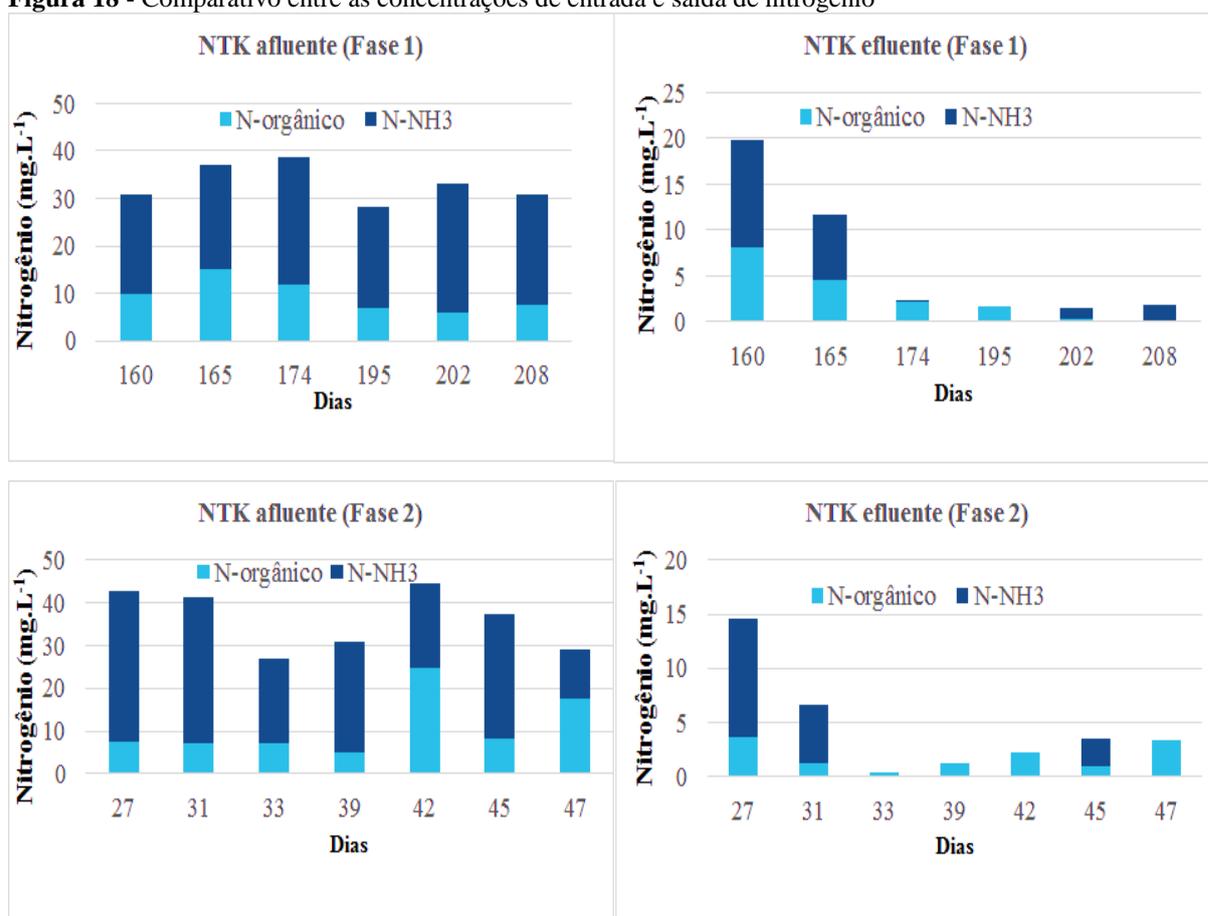
Maiores eficiências foram obtidas na Fase 2 para a DQO total, apresentando pouca variação entre os resultados (83,5 – 89,9 %).

Para a fração solúvel, na Fase 2, a remoção esteve na faixa de 50,4 – 68,5%.

4.4.2 Nitrogênio

Na Figura 18 é apresentado um comparativo entre as concentrações de nitrogênio de entrada e saída durante as duas fases operacionais para o período estável.

Figura 18 - Comparativo entre as concentrações de entrada e saída de nitrogênio



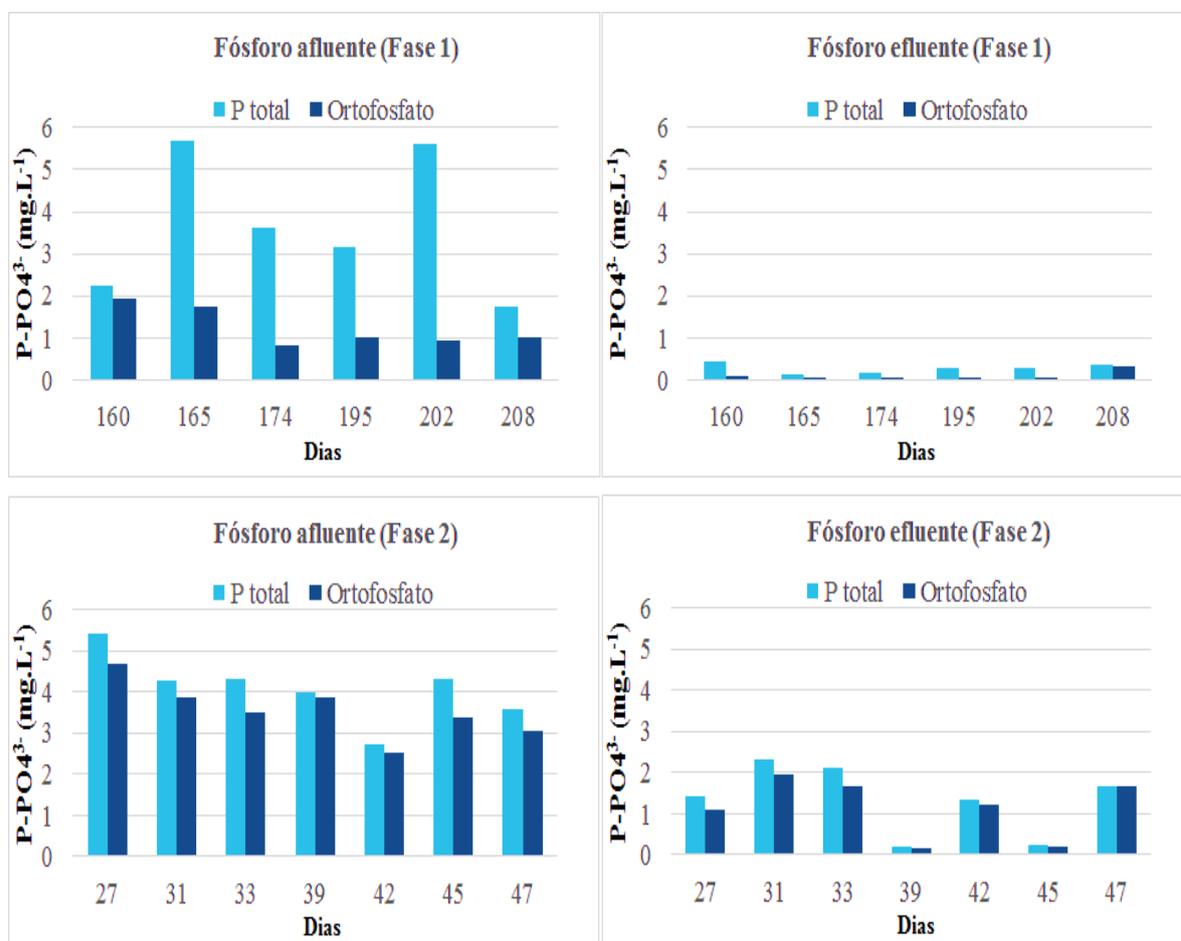
A maior parte da fração de nitrogênio afluente da Fase 1 era composta por nitrogênio amoniacal. A evolução da remoção do nutriente foi satisfatória, de modo que ao final do monitoramento da Fase 1, todo o nitrogênio orgânico foi removido.

Na Fase 2, percebeu-se uma maior variação na composição afluente e a completa oxidação da amônia no final do monitoramento. Entretanto, uma parcela orgânica ainda deixava o efluente.

4.4.3 Fósforo

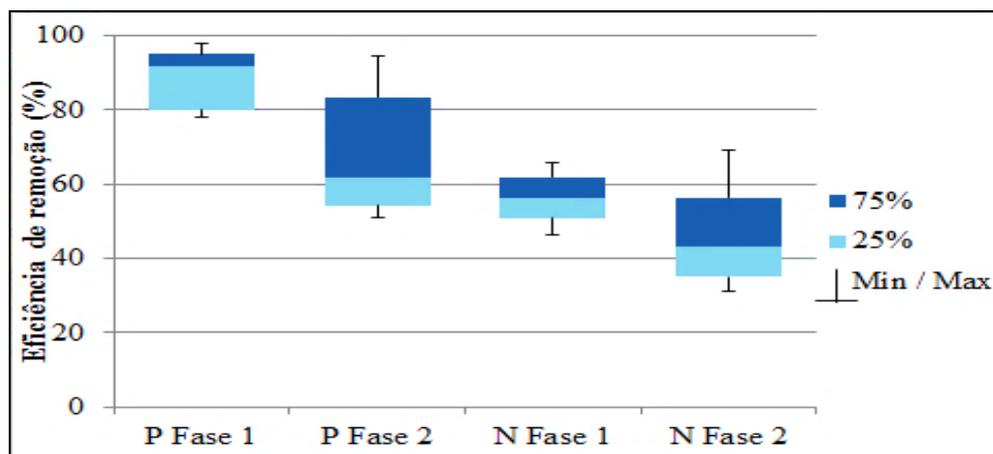
Na Figura 19 são apresentados os resultados de fósforo total afluente e efluente entre os períodos estacionários das fases estudadas.

Figura 19 - Comparativo entre as concentrações de entrada e saída de fósforo



Durante a primeira fase operacional, o sistema alcançou remoções elevadas tanto da fração total, quanto da fração hidrolisada (ortofosfato), o que caracterizou a ocorrência do processo EBPR.

Na Figura 20 é mostrado um comparativo da remoção de P e N entre as duas fases que foram discutidas.

Figura 20 - Comparativo entre as remoções de fósforo e nitrogênio das fases operacionais

Considerando a remoção de fósforo total para o estado estacionário, foi obtida uma faixa de 78,2 – 97,9%, com média de $88,3 \pm 8,5\%$ (Fase 1) e 54,6 – 94,6 % e média de $71,1 \pm 18,8\%$ (Fase 2).

Para o nitrogênio total, a faixa de remoção no período estável da Fase 1 foi de 46,3 – 65,6% e para o período estável da Fase 2 obteve-se uma faixa de 31,1 – 69,1%. As remoções médias foram de $54,5 \pm 11,0\%$ e $47,5 \pm 14,0\%$ nos períodos de estabilidade das fases 1 e 2, respectivamente.

As remoções médias sugerem que a Fase 1 apresentou melhores condições à remoção de P e N. Entretanto, deve-se considerar que para o tempo de operação da segunda fase, o sistema estava evoluindo para uma otimização.

As remoções médias de nitrogênio apresentaram valores muito próximos e as de fósforo foram variáveis.

Na Tabela 8 é apresentada a comparação entre as fases operacionais levando em consideração o período em que o reator apresentou aproximadamente a mesma concentração de SSVLM (início da estabilização em cada fase), para avaliar a capacidade do sistema em remover simultaneamente matéria orgânica, nitrogênio e fósforo.

Tabela 8 - Comparativo entre as eficiências de remoção das fases operacionais em períodos com concentrações de biomassa aproximadas

	Dias	SSVLM (g.L ⁻¹)	DQO/N	DQO/P	Remoção (%)		
					DQO	N	P
Fase 1	160	0,96	13,2	186,0	78,5	33,9	80,3
	165	0,79	4,5	29,8	77,4	46,3	97,9
	174	0,71	6,9	74,5	93,2	61,0	94,9
Fase 2	27	0,90	9,8	80,9	87,9	43,0	79,8
	31	0,91	6,0	59,8	83,5	26,2	54,6
	33	1,07	11,9	107,9	85,0	31,1	54,6

Com base nestes dados, podemos sugerir que para este sistema, operando nas condições da primeira fase, as relações $DQO/N = 6,9$ e $DQO/P = 74,5$ favoreceram a remoção simultânea dos três componentes de interesse. Enquanto que na segunda fase, $DQO/N = 9,8$ e $DQO/P = 80,9$ foram mais favoráveis.

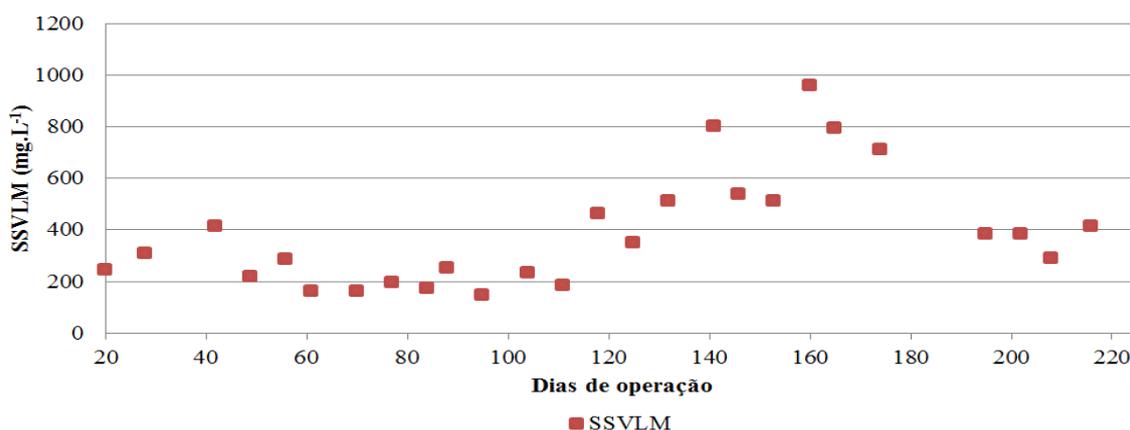
4.5 CRESCIMENTO DA BIOMASSA E ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

4.5.1 Crescimento da biomassa

Na Figura 21 é mostrado o crescimento da biomassa através dos resultados da concentração de SSV no licor misto da primeira fase, em que não foi adicionado inóculo. O tempo de operação de 20 dias foi aguardado para a adaptação do sistema e início do monitoramento de todos os parâmetros. A biomassa atingiu a concentração de $0,2 \text{ gSSV.L}^{-1}$ neste período.

O período de melhores condições de biomassa no sistema foi entre os dias 118 e 202, quando a mesma se manteve acima dos $0,35 \text{ gSSVLM.L}^{-1}$. A ocorrência de vazamentos de lodo do sistema ocasionou uma variação da concentração e impossibilitou a determinação da idade do lodo, visto que a quantidade descartada não era contabilizada.

Figura 21 - Crescimento da biomassa ao longo da Fase 1

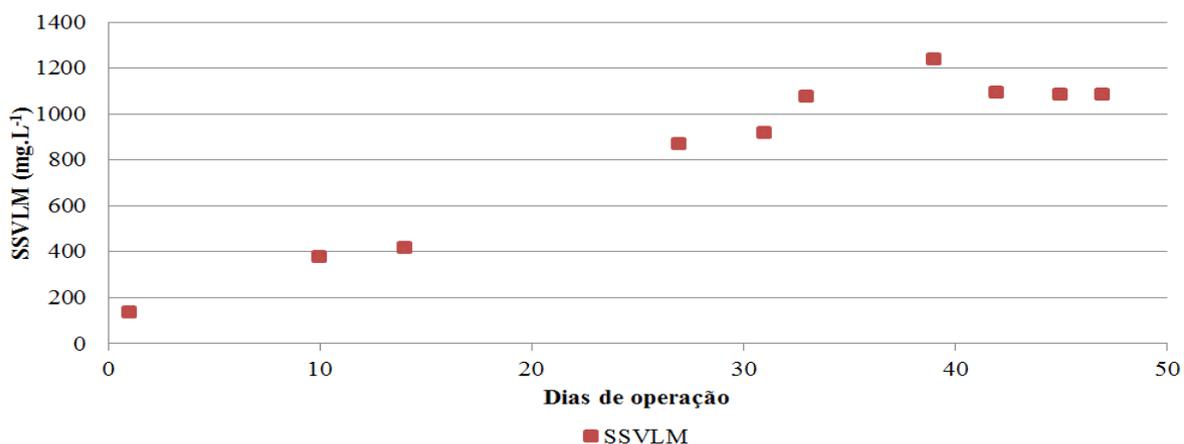


Na Figura 22 é apresentado o crescimento da biomassa em termos de concentração de SSVLM para o período da segunda fase operacional. Optou-se por iniciar o sistema com, aproximadamente, a mesma concentração de SSV em que se iniciou o monitoramento da Fase 1. O fato da biomassa inoculada já está adaptada às condições da Fase 1, aliado a um melhor

fornecimento de oxigênio e o controle dos vazamentos de lodo do sistema permitiu que esta biomassa se estabilizasse em menor tempo. Em apenas 27 dias de operação, a concentração esteve igual a $0,87 \text{ gSSVLM.L}^{-1}$, enquanto foram necessários 140 dias na primeira fase para esta mesma concentração.

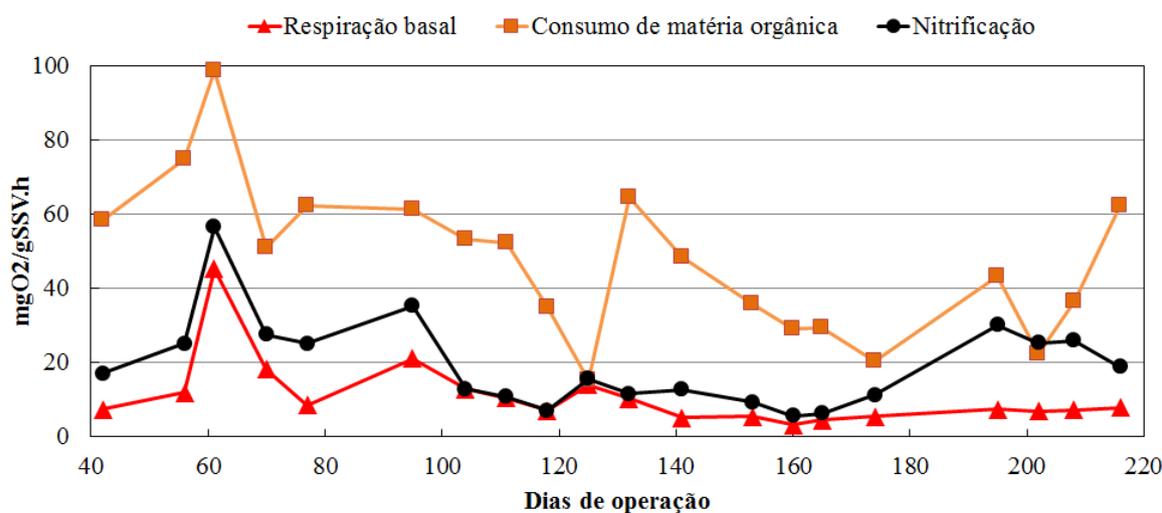
Apesar da ocorrência de problemas na automação, o que submeteu o sistema a uma pausa de 8 dias (15º ao 22º dia), a recuperação e readaptação da biomassa não demorou a ocorrer, visto que no 27º dia duplicou para a concentração de $0,87 \text{ gSSVLM.L}^{-1}$. A partir de então, a concentração estabilizou-se na faixa de $0,9 - 1,2 \text{ gSSVLM.L}^{-1}$.

Figura 22 - Crescimento da biomassa ao longo da Fase 2



4.5.2 Teste de atividade da biomassa – respirometria

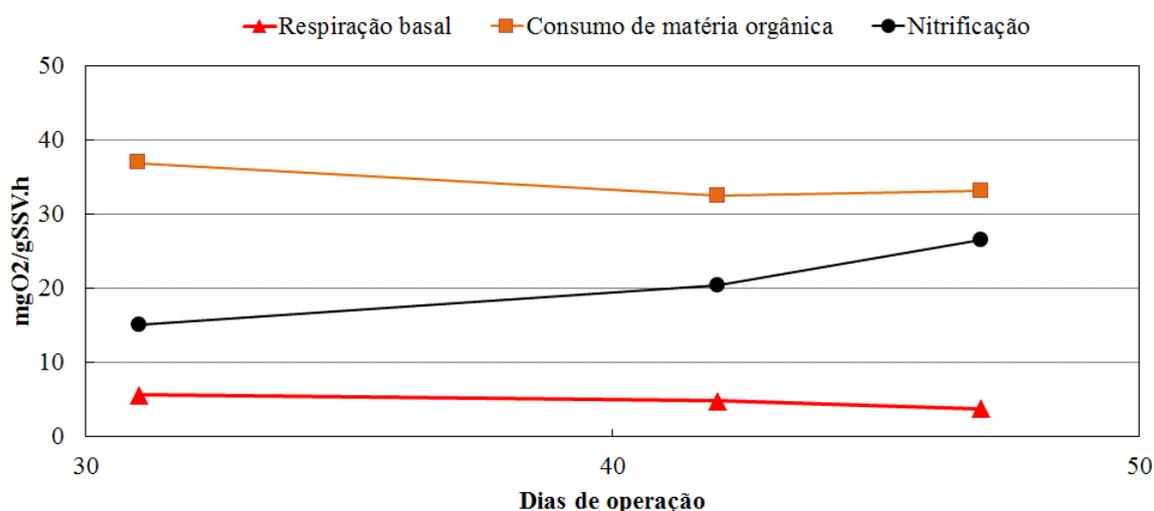
Na Figura 23 são apresentados os resultados das taxas de consumo específicas ao longo da primeira fase operacional a partir do período em que foi observada a ocorrência de nitrificação no sistema (40º dia).

Figura 23 - Taxas de consumo de oxigênio específicas - Fase 1

O sistema apresentou melhores condições de oxidação de matéria orgânica entre os dias 160 e 216 (TCO_e média de $34,7 \text{ mgO}_2.\text{gSSVLM}.\text{h}^{-1}$). Para a nitrificação, a melhor estabilidade foi entre os dias 174 e 216 (TCO_e média de $18,0 \text{ mgO}_2.\text{gSSVLM}.\text{h}^{-1}$). Bueno (2016) em seu experimento com lodos ativados, obteve taxas de consumo para oxidação da matéria orgânica e nitrificação de $71 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $32 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente, com concentração de SSVLM de $3,069 \text{ g}.\text{L}^{-1}$, resultando em taxas específicas de $23 \text{ mgO}_2.\text{gSSVLM}.\text{h}^{-1}$ e $10 \text{ mgO}_2.\text{gSSVLM}.\text{h}^{-1}$.

As taxas específicas de consumo tiveram grande variação antes do período de estabilização, pois está associada à concentração de SSVLM, que sofreu muita variação devido às perdas de biomassa ocasionadas no sistema durante a primeira fase.

Na Figura 24 são apresentados os resultados para a respirometria da segunda fase. Assim como na primeira fase, os testes de atividade da biomassa só foram iniciados a partir do momento em que se observou a oxidação de amônia associada a alguma nitrificação (em 31 dias).

Figura 24 - Taxas de consumo de oxigênio específicas - Fase 2

Neste período, considerado como estabilização do sistema, as taxas específicas médias foram de 34,1 mgO₂.gSSVLM.⁻¹h⁻¹ para o consumo de matéria orgânica e 20,7 mgO₂.gSSVLM.⁻¹h⁻¹ para nitrificação. Nesta fase, a atividade da biomassa foi um pouco aumentada para a nitrificação e em menor espaço de tempo.

O maior controle da manutenção da biomassa no sistema durante a segunda fase operacional permitiu efetuar uma estimativa do tempo de retenção celular (idade do lodo) - TRC - neste período de estabilização, a partir da Equação 6.

$$TRC = \frac{SSVLM_r \times V_r}{SSV_{ef} \times V_{ef} \times n}$$

Equação 6

Onde: SSVLM_r = concentração de SSV no licor misto, V_r = volume útil do reator, SSV_{ef} = SSV na saída (efluente), V_{ef} = volume de efluente descartado, n= número de ciclos.

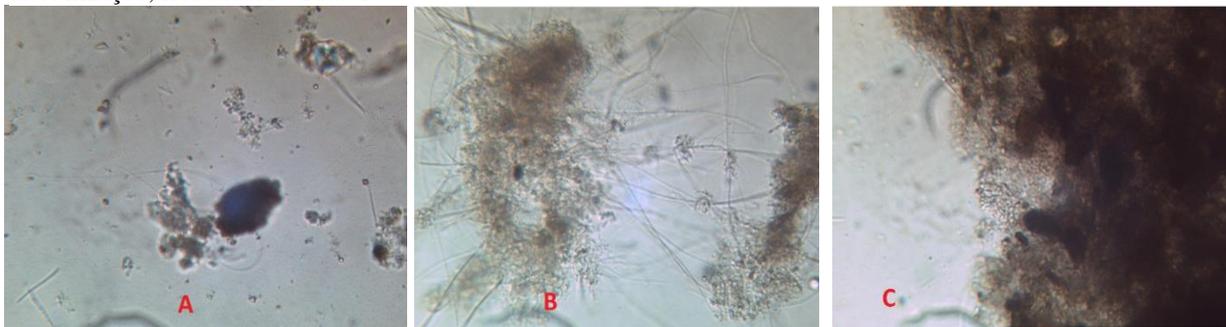
A idade de lodo média para este período foi de 19,6 dias.

Li e Wu (2014) avaliaram os efeitos de diferentes idades de lodo na remoção biológica de nutrientes em reatores RBS avaliando TRC de 5, 10, 20 e 40 dias. Os autores concluíram que a remoção de DQO não foi afetada por este parâmetro, atribuindo-se ao fato de que as bactérias heterotróficas possuem uma taxa mais rápida de crescimento e são privilegiadas na competição com os outros micro-organismos. Enquanto a eficiência de remoção de amônia e nitrificação foram maiores para TRC mais elevado, devido ao tempo de retenção ter sido longo o suficiente para o desenvolvimento das bactérias nitrificantes e o fornecimento de oxigênio ter sido adequado. Os resultados mostraram que a eficiência de nitrificação teve seu ponto ótimo para idade do lodo de 20 dias.

4.5.3 Análise microscópica - caracterização da biomassa

A Figura 25 mostra a variação das características do lodo do início da operação até a estabilização da Fase 1.

Figura 25 - Variação da biomassa: (A) início da operação, floco pin-point; (B) floco intumescido; (C) início da estabilização, floco ideal – Fase 1



As Figuras 26 e 27 apresentam a evolução da população de micro-organismos em cada fase. Para a caracterização do sistema foram consideradas as classificações de Figueredo et al. (1997) e Vilaseca (2001).

Figura 26 - Evolução da população de micro-organismos durante a primeira fase operacional.

(a). Biomassa em evolução, flocos ideais e predominância de ciliados pedunculados – Fase 1



Vorticella ; 49 dias
(ampliação 400x)



56 dias
(ampliação 100x)



88 dias
(ampliação 400x)

(b). Estabilização da biomassa, flocos ideais, predominância de ciliados pedunculados e metazoários (rotíferos)



Vorticella; 118 dias
(ampliação 400x)

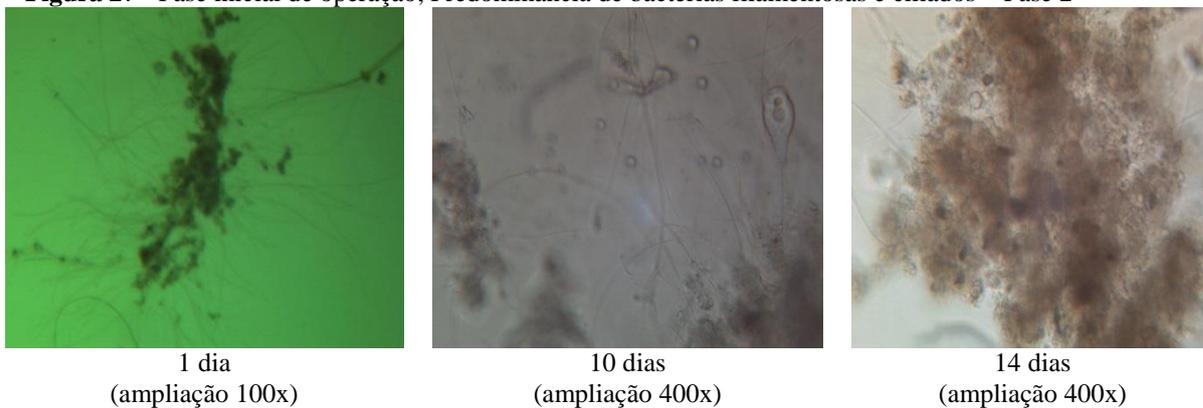


Ciliados pedunculados; 165 dias
(ampliação 400x)



Rotíferos; 200 dias
(ampliação 100x)

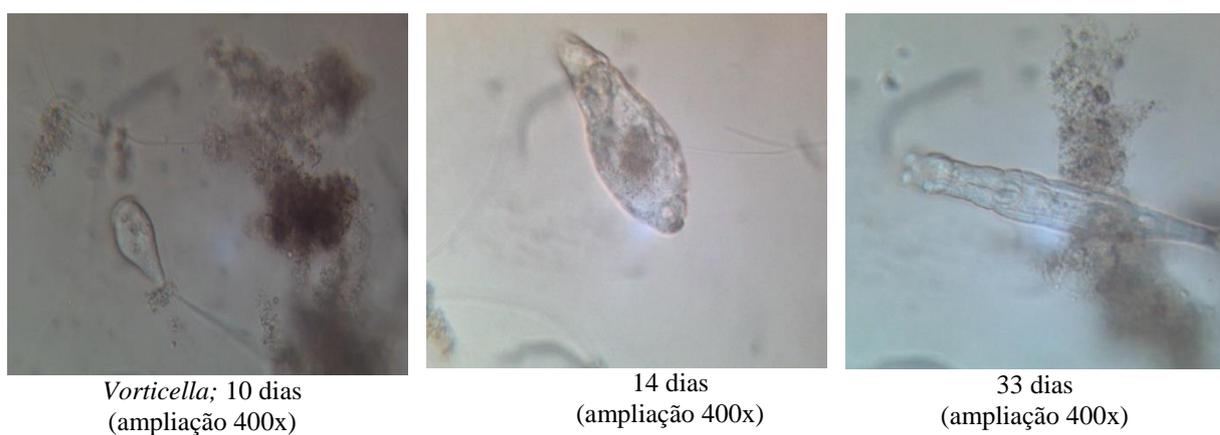
Figura 27 - Fase inicial de operação; Predominância de bactérias filamentosas e ciliados – Fase 2



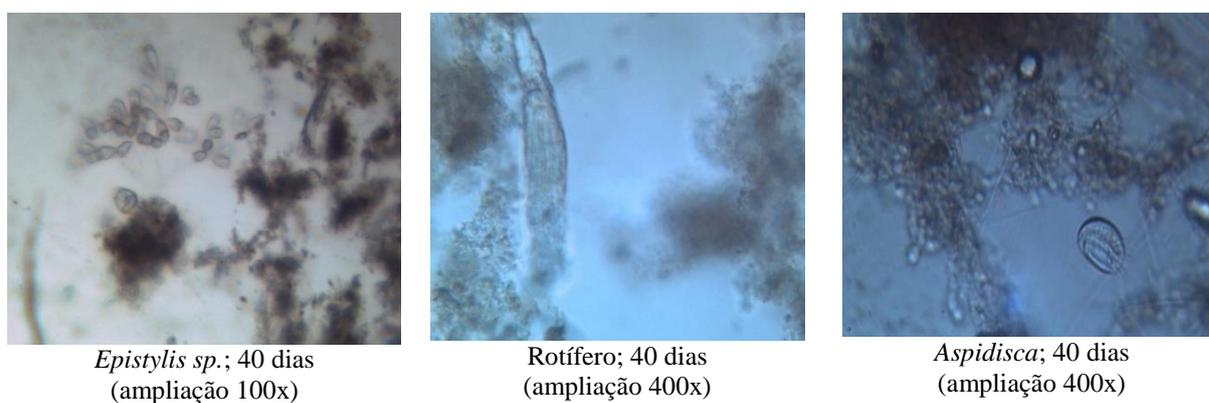
A Figura 28 apresenta a evolução da população de micro-organismos ao longo do período operacional da Fase 2.

Figura 28 - Evolução da população de micro-organismos durante a segunda fase operacional

(a) Biomassa em estabilização, floco ideal, predominância de pedunculados e rotíferos



(b) Biomassa em estabilização; Predominância de rotíferos, aparecimento de *Aspidisca* e poucos ciliados pedunculados



O crescimento da biomassa seguiu, basicamente, o processo descrito em Vilaseca (2001). Na fase inicial de operação de ambas as fases, dominaram as bactérias dispersas e os protozoários flagelados, com o crescimento do número de bactérias, apareceram os ciliados livre-natantes. Com o início da floculação, houve o declínio das bactérias livres e dos protozoários flagelados, os ciliados livre-natantes começaram a diminuir passando a ocorrer o desenvolvimento dos ciliados pedunculados.

Por fim, nos períodos considerados de estabilização da biomassa, apareceram os metazoários, especialmente rotíferos, que se encontram no final da cadeia e indicam estabilização do sistema.

Em ambas as fases, os micro-organismos observados foram típicos de sistemas de lodos ativados. Na segunda fase foi possível observar um crescimento mais acelerado destes micro-organismos, o que deve estar associado às melhores condições de aeração a que foi submetido o sistema.

As bactérias heterotróficas são as principais decompositoras de matéria orgânica dos esgotos por crescerem em intervalos de tempo mais reduzidos.

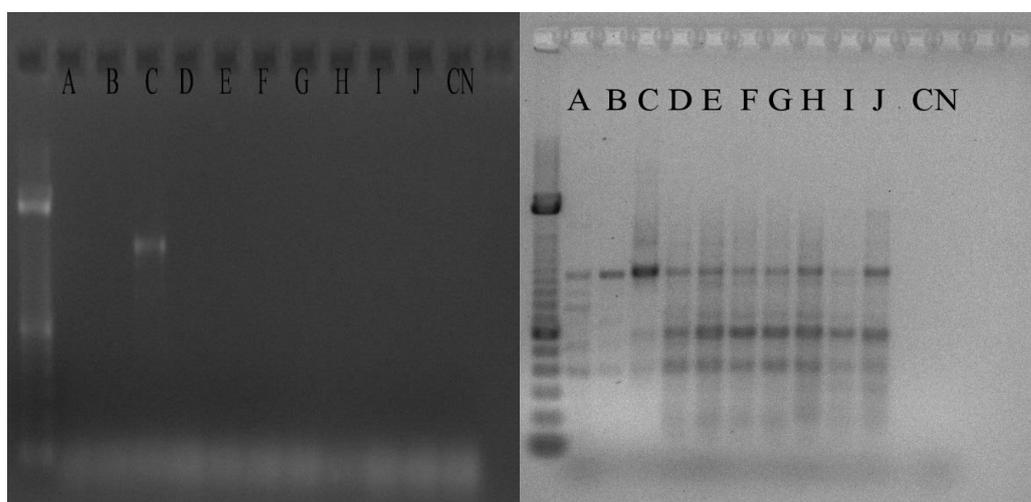
Além das bactérias, os protozoários são importantes em sistemas de lodos ativados pois, também além do consumo de matéria orgânica, são predadores de bactérias dispersas, contribuindo para o polimento do efluente.

Os protozoários fixos aparecem primeiro; na sequência surgem os ciliados, indicando boas condições do lodo. A presença de protozoários determina a evolução do processo, caminhando em direção ao aparecimento de micrometazoários, tais como os rotíferos.

4.5.4 Testes de biologia molecular – reação em cadeia polimerase (PCR)

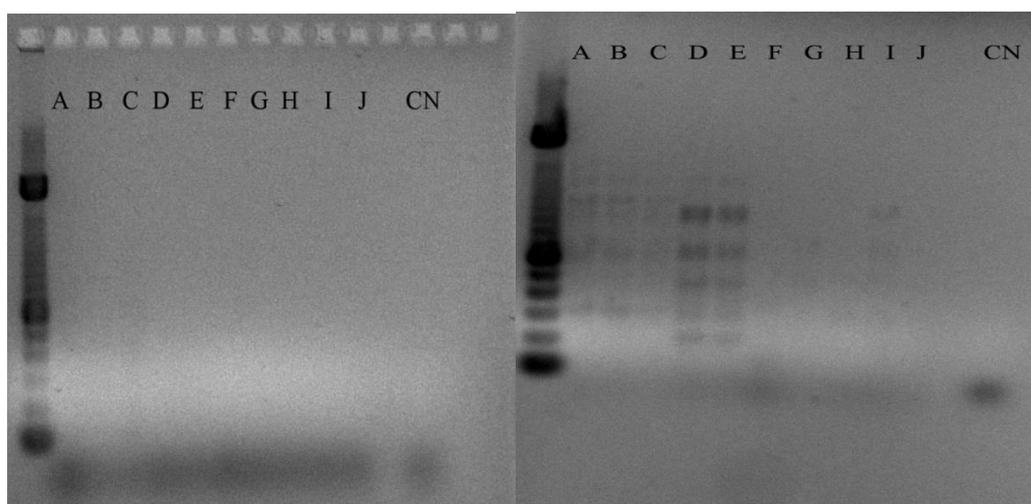
Na Figura 29 são apresentadas as imagens obtidas da reação em cadeia polimerase para os grupos específicos: *Anammox*, o grupo bactérias oxidadoras de amônia (BOA) *Nitrossomonas*, bactéria oxidadora de nitrito (*Nitrospira*), Organismos Acumulados de Polifosfato (PAO) e bactérias desnitrificantes.

Figura 29 - Imagens da análise de PCR para os grupos (a) Anammox; (b) Nitrosomonas; (c) Nitrospira; (d) PAOs; (e) Desnitrificantes. Onde: A, B e C = Fase 1; D, E, F, G, H, I, J = Fase 2



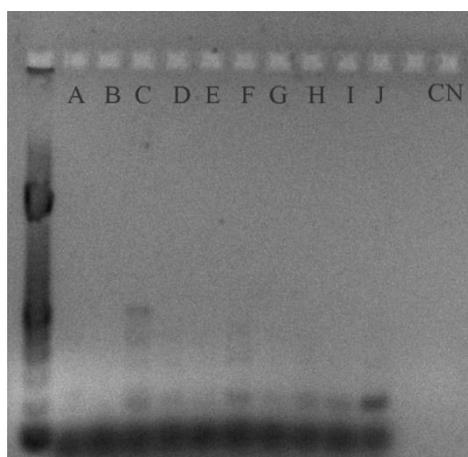
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

Na primeira fase de operação, foi confirmada a presença do grupo *Annamox* apenas no final do monitoramento da fase, o que sugere a remoção de nitrogênio amoniacal também por oxidação da amônia utilizando NO_2^- como acceptor de elétrons em condições anaeróbias. De acordo com Kartal et al. (2013), os reatores do tipo RBS são favoráveis ao crescimento das bactérias *Anammox*, estritamente anóxicas, uma vez que as células são mantidas no reator por um longo período de tempo para enriquecimento da biomassa através de ciclos contínuos de sedimentação, remoção do sobrenadante e suplementação do meio com esgoto fresco, condições essenciais para o crescimento destas bactérias.

Também foi confirmada a presença dos grupos *Nitrossomonas*, desnitrificantes e PAOs nos dois períodos operacionais. A confirmação de bactérias desnitrificantes em todas as amostras indica que o sistema operado foi favorável ao seu desenvolvimento.

O gênero *Nitrospira* não foi detectado em nenhuma das amostras, o que sugere a ocorrência de nitrificação por outro grupo específico.

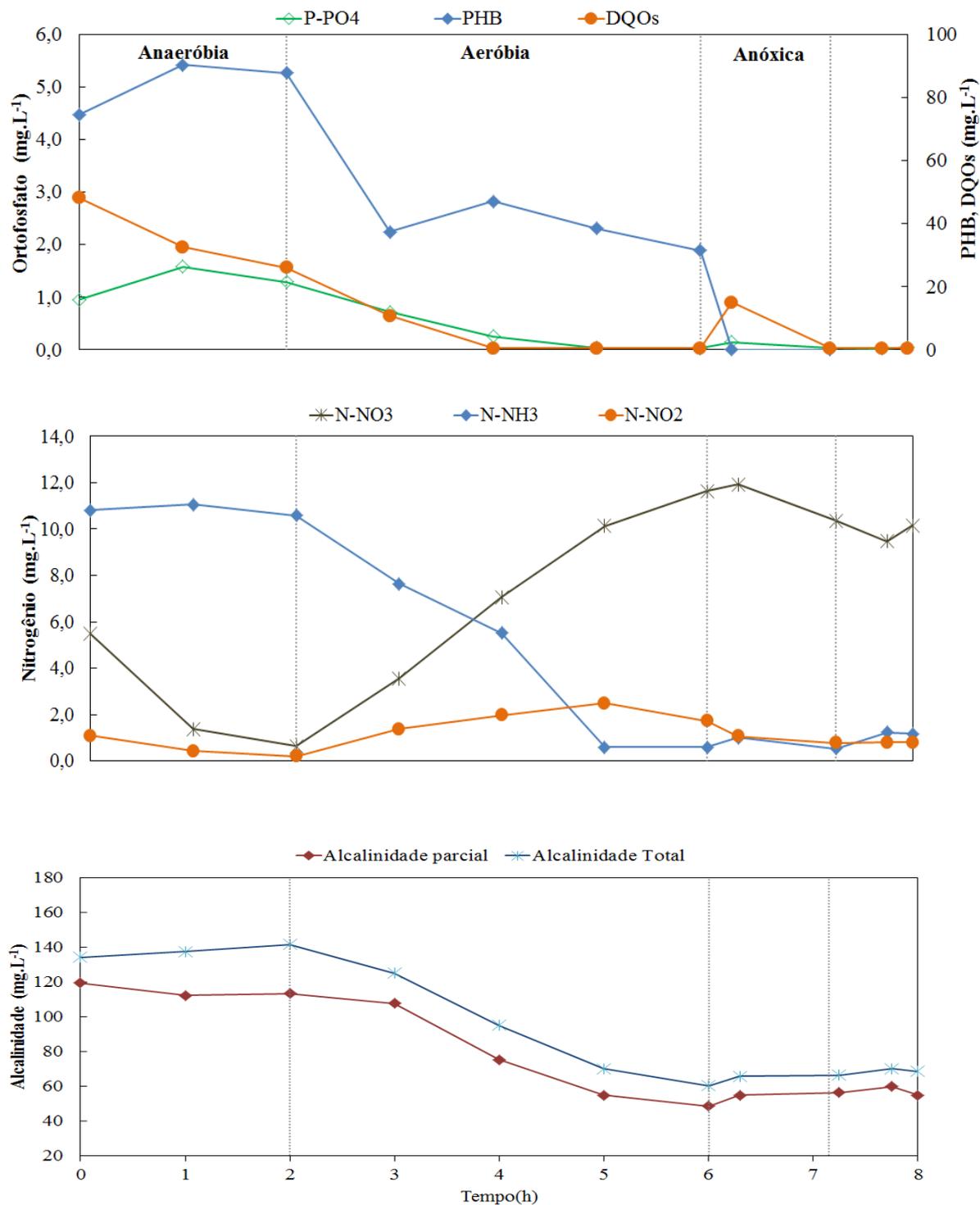
A confirmação da presença de acumuladores de polifosfato no meio caracteriza a ocorrência do processo EBPR. Entretanto, verificou-se uma menor frequência de observação de PAOs na segunda fase.

4.6 AVALIAÇÃO DOS PERFIS TEMPORAIS DAS BATELADAS

Na Figura 30 é apresentado o perfil traçado através das análises ao longo de uma batelada na estabilização da primeira fase operacional.

Os dados apresentados no ponto 0 dos gráficos das Figuras 30 e 31 correspondem às concentrações dos componentes no primeiro minuto da mistura do esgoto afluyente com o licor misto que permanecia no reator após a batelada anterior (70 litros).

Figura 30 - Perfil temporal das fases de reação da batelada da Fase 1 (ciclo 8h)



Na Fase 1 (Figura 30), a remoção de matéria orgânica em termos de DQO solúvel (DQOs) foi monitorada. No primeiro momento, a DQO foi removida rapidamente na fase anaeróbia.

Na fase seguinte do ciclo (aeróbia), a matéria orgânica remanescente foi totalmente removida antes do final da fase. A elevação da concentração de DQO para cerca de 20 mg.L^{-1} no início da fase anóxica ocorreu devido à adição de esgoto bruto adicionado como fonte de carbono para a desnitrificação.

O comportamento do fósforo seguiu o esperado para o processo EBPR. Percebe-se a liberação imediata do ortofosfato no início da fase anaeróbia; à primeira hora do ciclo, o fósforo atingiu sua concentração máxima, sendo consumido do início da segunda hora até o final da fase aeróbia. A produção e a metabolização do PHB (analisado na biomassa) estiveram relacionadas com o perfil do ortofosfato, uma vez que os PAOs utilizam polifosfato como fonte de energia ao mesmo tempo em que liberam ortofosfato para o meio líquido, assimilam os AGVs e os acumulam na forma de PHAs (fase anaeróbia).

Na fase aeróbia, não havendo mais fonte de carbono de fácil degradação disponível, os mesmos micro-organismos obtêm energia dos PHAs acumulados anteriormente, removendo o PO_4^{3-} do meio líquido, que é armazenado intracelularmente.

A maior parcela do nitrogênio entra no meio já amonificada. Por isso, nota-se uma elevação discreta da amônia na fase anaeróbia, que é prontamente oxidada aerobiamente, ao mesmo tempo em que são formados NO_2^- e NO_3^- . A baixa eficiência de desnitrificação que o reator apresentou justificou-se pela fonte de carbono adicionada na fase anóxica não ter sido suficiente. Além disso, houve um acúmulo das formas oxidadas de nitrogênio para o próximo ciclo, criando uma zona anóxica no início da batelada; deste modo, não havendo limitação de matéria orgânica, a desnitrificação ocorreu nesta fase.

A redução do tempo de fase aeróbia e aumento da anóxica poderiam favorecer a remoção de nitrogênio sem prejudicar a remoção de fósforo, uma vez que esta foi alcançada com três horas de aeração, ficando fósforo disponível para promover a desnitrificação pelos organismos acumuladores de fósforo desnitrificantes, estratégia esta que foi adotada para a Fase 2.

O perfil da alcalinidade acompanhou o processo de amonificação/nitrificação/desnitrificação, de modo que pouca alcalinidade foi produzida na primeira fase de reação, seguindo-se de um consumo durante a nitrificação e pouca produção também na última fase, justificada pela baixa desnitrificação.

O acúmulo de NO_2^- é uma possível explicação para a oxidação anaeróbia da amônia junto à confirmação da presença do grupo *Anammox* pela reação da PCR.

A razão AGV/N-NH_3 apresenta influência na ocorrência do processo EBPR e remoção de nitrogênio. Como se sabe, a concentração de nitrogênio amoniacal em esgoto real é

variável. Coats et al. (2011) sugeriram que uma razão maior do que 4,1 é desejável. Razões mais altas indicam que os AGVs estão disponíveis para conduzir o processo EBPR e que a amônia afluente não é tão alta a ponto de produzir excesso de nitrato para ser transferido ao ciclo posterior.

Nesta fase operacional a razão AGV/N-NH₃ foi de 1,8, que pode ter prejudicado a desnitrificação, apesar da concentração de AGVs ter sido suficiente para conduzir a remoção de P.

Os gráficos da Figura 31 demonstram o perfil do reator para a segunda fase operacional.

Para o perfil da batelada da segunda fase, o comportamento do processo biológico de remoção de fósforo apresentou um mecanismo diferente do ocorrido na primeira fase.

No início da fase anaeróbia houve uma elevação da DQO solúvel (DQOs), acompanhada do consumo de PHB e desnitrificação. A concentração de AGV no afluente foi de 30,6 mg.L⁻¹ de acetato e 2,0 mg.L⁻¹ de propionato. O consumo dos ácidos graxos foi percebido nos primeiros 30 minutos de ciclo, restando ainda 7,0 mg.L⁻¹ de acetato em 1 h de fase anaeróbia.

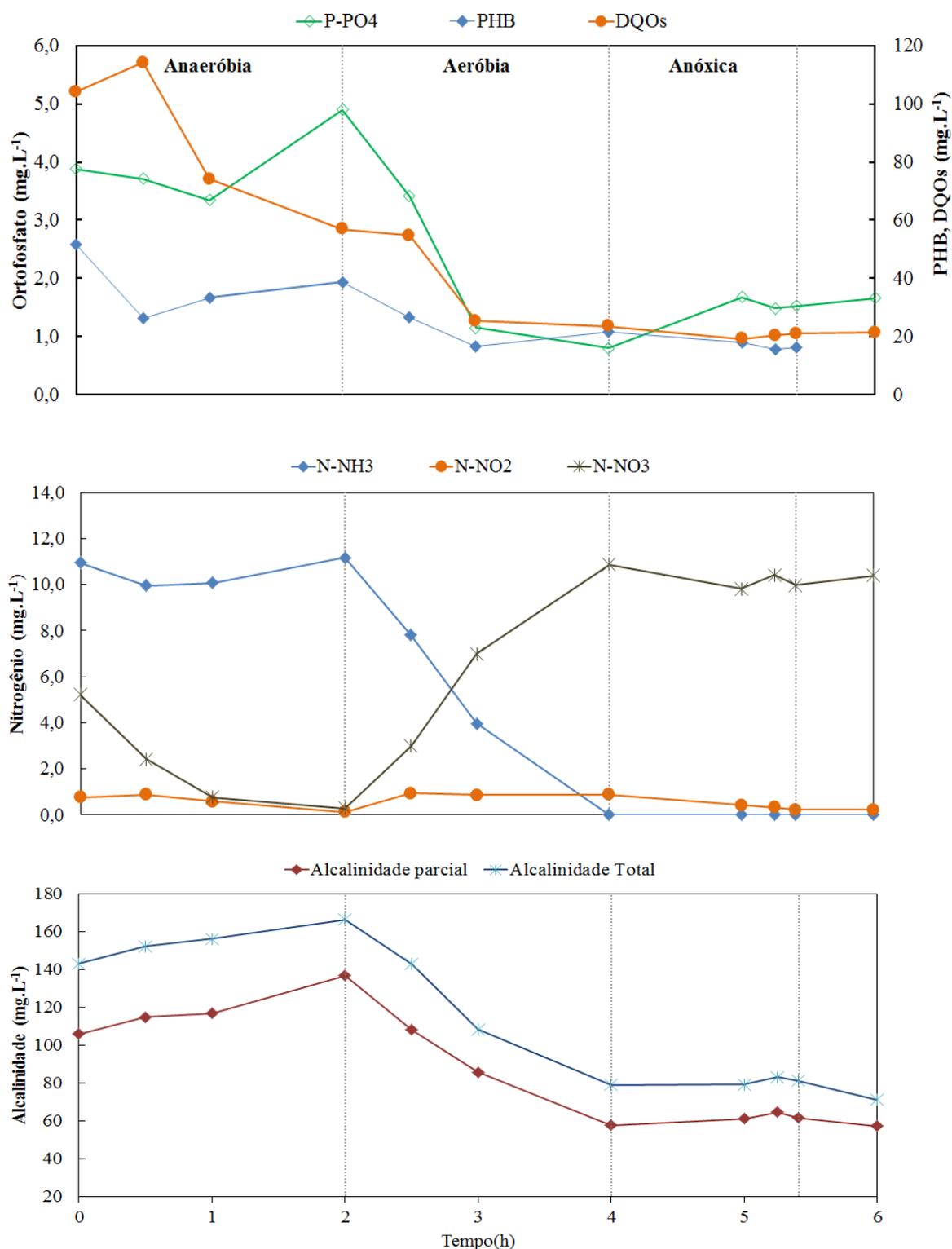
Uma provável explicação é a de que os organismos acumuladores de fósforo desnitrificantes tenham se desenvolvido, devido às concentrações de fósforo e nitrato remanescentes ao final do ciclo. Entretanto, as fontes de carbono utilizadas para a desnitrificação podem ter sido tanto os AGVs, quanto os PHAs armazenados dentro das células.

O acúmulo de PHB também foi evidenciado no final do ciclo, diferentemente do ocorrido na Fase 1, em que os biopolímeros foram completamente consumidos.

De acordo com Zeng et al. (2004), uma vez que a quantidade de DQO afluente não é capaz de suprir a necessidade energética para ocorrência da desnitrificação, o mais provável é que as bactérias utilizem os produtos intracelulares armazenados como fonte de carbono, tais como os PHAs.

A análise de PCR não indicou a presença do grupo *Anammox* nesta fase experimental, o que sugere que a desnitrificação que ocorreu no início da batelada esteve relacionada à atividade dos DPAOs. A indisponibilidade do *primer* para PCR deste grupo específico não permitiu a confirmação desta hipótese.

Figura 31 - Perfil temporal das fases de reação da batelada da fase operacional 2 (ciclo 6h)



A concentração de ortofosfato afluente foi somada à remanescente do final do ciclo anterior e consumida ao mesmo tempo em que ocorreu a desnitrificação pelos DPAOs,

utilizando nitrato e nitrito como acceptor de elétrons. A liberação de fosfatos para o meio apenas foi possível quando todo o nitrato foi consumido.

Freitas et al. (2005) relataram a inibição do acúmulo anaeróbio de fosfato enquanto houver nitrato no meio (condição anóxica). No estudo, apesar da concentração de PHA não ter sido esgotada, o acúmulo de fosfato não ocorreu. Enquanto a captura anóxica de P foi estacionada, a remoção de nitrato continuou, concomitantemente com a degradação de PHA. Os autores sugeriram que houve favorecimento da atividade dos GAOs no sistema.

Winkler et al. (2011) consideraram em seu estudo de desnitrificação pós-anóxica que as formas de NO_x residuais foram transferidas para o ciclo subsequente, levando ao consumo de AGV para a redução de NO_2^- e, especialmente, de NO_3^- . No estudo foi considerada a razão de 3,54 mgDQO consumida por mgN- NO_3^- reduzida, considerando o acetato como a fonte de AGV preferencial para a desnitrificação; os PAOs do sistema foram capazes de hidrolisar polifosfato apenas na ausência de nitrato/nitrito, o que também foi observado em nosso perfil.

Assim, a prolongação da fase anóxica ainda se faz necessária para a ocorrência da desnitrificação completa. A estratégia de diminuição da fase aeróbia e não adição de uma fonte de carbono externa foi positiva, sugerindo que o processo pode ser otimizado desta maneira. A presença de DPAOs no meio permite a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo, com algumas vantagens como menor demanda por oxigênio em termos de DQO, redução dos custos de energia por aeração e produção de lodo mais baixa (Freitas, 2005).

A concentração de PHB produzida e consumida foi bem menor em comparação à Fase 1. Neste caso também pode ter ocorrido uma competição entre PAOs e GAOs no sistema, especialmente porque a quantidade de oxigênio disponível no meio após a aeração foi maior do que na Fase 1. Isto favoreceu a nitrificação, mas pode ter afetado a remoção de fósforo. Entretanto, esta foi compensada pela desfosfatação desnitrificante.

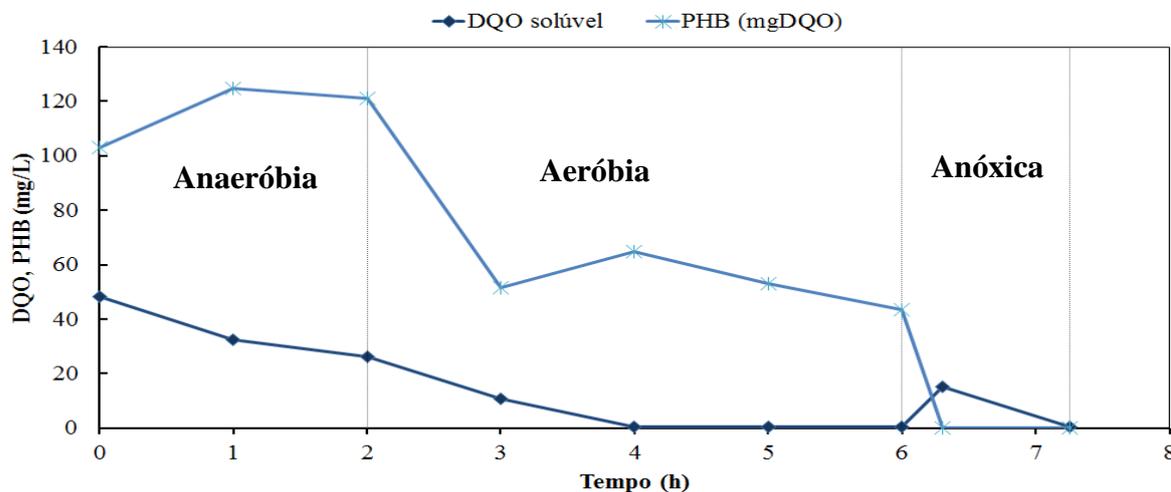
O comportamento da alcalinidade esteve em conformidade com o esperado para os processos de amonificação/nitrificação/desnitrificação.

4.6.1 Relação entre a produção e consumo de DQO/PHA

As análises dos perfis temporais levaram a uma associação quanto às fontes de carbono preferenciais para os micro-organismos atuantes neste sistema. Os cálculos foram realizados considerando a relação estequiométrica sugerida por Freitas et al. (2005), que considera a equivalência de $1,00 \text{ gPHB} = 1,38 \text{ gDQO}$. Também foi aplicada a relação estequiométrica para ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), principal fonte de AGV disponível no meio, considerando que $1,00 \text{ gC}_2\text{H}_4\text{O}_2$ corresponde a $1,07 \text{ gDQO}$.

Na Figura 32 é apresentado o perfil da produção e consumo de PHB em unidades de mgDQO e as concentrações de DQO solúvel no perfil da primeira fase.

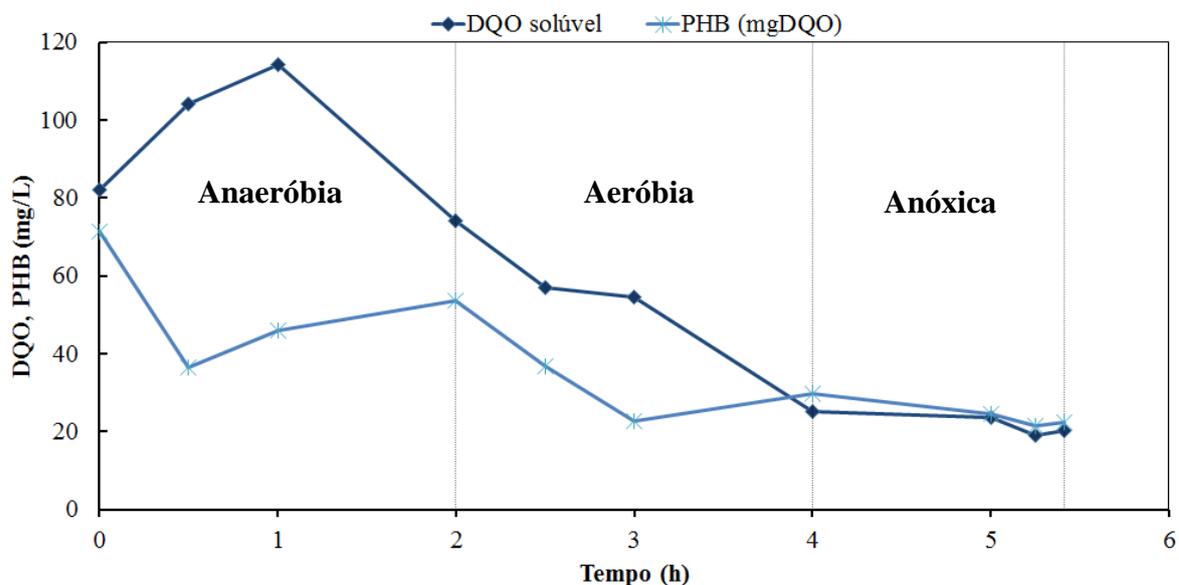
Figura 32 - Relação entre a produção e consumo de DQO solúvel e PHB – Fase 1



Neste primeiro perfil, a concentração de ácido acético afluente foi de $22,9 \text{ mg.L}^{-1}$. No ponto da mistura (1 min) do afluente com o licor misto do ciclo anterior, a concentração detectada foi de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$, o que mostra o rápido consumo desta fonte de carbono disponível no meio. Nos próximos pontos de coleta, não foram detectadas concentrações de AGV. A produção de PHB foi imediata, estando associada ao consumo de ácido acético. O cálculo teórico fornece que $22,9 \text{ mg}$ de ácido acético equivalem a $24,4 \text{ mgDQO}$. Na fase anaeróbia (Figura 32), percebe-se que foram consumidos $22,1 \text{ mg}$ de DQO e $22,0 \text{ mgDQO}$ de PHB foram produzidos. Estes resultados se aproximam do valor teórico e explicitam a utilização preferencial do ácido acético como fonte para o acúmulo do polihidroxialcanoato analisado.

Na Figura 33 apresenta-se o perfil da produção e consumo de PHB em unidades de mgDQO e as concentrações de DQO solúvel no perfil da segunda fase.

Figura 33 - Relação entre a produção e consumo de DQO solúvel e PHB – Fase 2



No segundo perfil, a concentração de ácido acético afluente foi de $30,6 \text{ mg.L}^{-1}$; o consumo do AGV foi mais lento, de modo que em 30 minutos da fase anaeróbia ainda restavam $7,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Da relação teórica, $23,6 \text{ mg}$ de ácido acético correspondem a $25,18 \text{ mgDQO}$.

Na prática, no intervalo de 30 minutos, foram produzidos $22,3 \text{ mgDQO}$ e consumidos $25,2 \text{ mgDQO}$ de PHB.

No intervalo de 1h a 2h da fase anaeróbia, produziu-se 10 mgDQO , consumiu-se 7 mgDQO de PHB e não houve concentração detectável de AGV.

O perfil traçado na Figura 31 demonstrou que houve desnitrificação no início do ciclo, cuja fonte de carbono pode ter sido tanto AGV como PHB, visto que ambos foram consumidos. Supõe-se que os ácidos graxos, por serem compostos de metabolização mais rápida, tenham sido fontes preferenciais; entretanto, a necessidade energética pode ter sido tão alta a ponto de a utilização da reserva polimérica de PHB ter sido efetuada.

Após a primeira hora anaeróbia até o final das fases reacionais do ciclo, o consumo de DQO e PHB ocorreu conforme o esperado para o processo EBPR quando dominam os PAOs no meio.

A análise de PCR mostrou uma menor incidência de PAOs nesta fase de operação. A ausência de um *primer* específico para a detecção de DPAOs não nos possibilitou confirmar a hipótese da atividade destes micro-organismos, apesar de o perfil traçado sugerir esta ocorrência.

5 CONCLUSÕES

Na primeira fase operacional deste estudo a remoção da matéria orgânica foi o primeiro aspecto observado, com eficiência média de 81,4%, caracterizando o sistema de tratamento como efetivo para a remoção de compostos orgânicos. No que concerne à remoção de fósforo e nitrogênio foi necessário o período de 160 dias para a adaptação da biomassa e estabilização do sistema para remoção dos nutrientes (N e P). O processo de nitrificação ocorreu, entretanto, a desnitrificação não se completou, levando à necessidade de uma otimização das configurações para a fase seguinte.

Na segunda fase, o período requerido para estabilização do sistema para a remoção dos nutrientes foi menor (27 dias), o que se justificou pela inoculação da biomassa que já estava adaptada ao reator. A eficiência média de remoção de matéria carbonácea foi de 81,8%. A prolongação do período anóxico não foi suficiente para promover a desnitrificação completa; entretanto, a estratégia adotada ofereceu condições para a atividade dos DPAOs no sistema.

O processo EBPR ocorreu em ambas as fases, mas com melhor eficiência na primeira.

A remoção de fósforo total para o estado estacionário esteve na faixa de 78,2 – 97,9%, com média de $88,3 \pm 8,5\%$ (Fase 1) e 54,6 – 94,6 % e média de $71,1 \pm 18,8\%$ (Fase 2).

Para o nitrogênio total, a remoção foi de 46,3 – 65,6% (Fase 1) e 31,1 – 69,1% (Fase 2). As remoções médias foram de 54,5% e 47,5% nos períodos de estabilidade das fases 1 e 2, respectivamente.

As remoções médias sugeriram que a primeira fase apresentou melhores condições para a remoção de nutrientes. Entretanto, deve-se considerar, para a segunda fase, que o sistema estava evoluindo para uma otimização.

Quanto à caracterização da população microbiana, a confirmação da presença do grupo *Annamox* na primeira fase, sugeriu a remoção de nitrogênio amoniacal também pelo processo anaeróbio. Os grupos *Nitrossomonas*, desnitrificantes e PAOs ocorreram nos dois períodos de operação. A confirmação de bactérias desnitrificantes em todas as amostras indica que o sistema operado foi favorável ao seu desenvolvimento. O gênero *Nitrospira* não foi detectado em nenhuma das amostras, o que sugere que a nitrificação ocorreu pela atividade de outro grupo. A presença de acumuladores de polifosfato no meio caracterizou a ocorrência do processo EBPR; entretanto, verificou-se uma menor frequência de PAOs na segunda fase. Os perfis temporais realizados ao final de cada uma das fases operacionais tiveram muita relevância para o conhecimento dos caminhos metabólicos dos principais grupos de microorganismos atuantes no processo de remoção simultânea dos nutrientes estudados.

Na primeira fase, o perfil do PHB apresentou relação com a produção e consumo de ortofosfato, conforme o esperado para o processo EBPR. A atividade dos PAOs foi confirmada pelo perfil delineado para ortofosfato e PHB. Quanto ao nitrogênio, notou-se que a fração nitrificada não foi completamente desnitrificada, o que resultou em um acúmulo de NO_3^- para o ciclo subsequente, criando uma zona anóxica no início da batelada e, conseqüentemente, a desnitrificação ocorreu nesta fase do ciclo.

Na segunda fase operacional, o processo biológico de remoção de fósforo apresentou um mecanismo diferente do ocorrido na primeira fase. Ao invés da ocorrência de remoção de matéria orgânica na fase anaeróbia do ciclo, houve uma elevação da DQO acompanhada do consumo de PHB e desnitrificação. Este comportamento sugeriu que os organismos acumuladores de fósforo desnitrificantes tenham se desenvolvido, devido às concentrações de fósforo e nitrato remanescentes ao final do ciclo. As fontes de carbono utilizadas para a desnitrificação podem ter sido tanto os AGVs quanto os PHAs armazenados intracelularmente.

Também foi observado o acúmulo de PHB ao final do ciclo, enquanto que na Fase 1 os biopolímeros foram completamente consumidos. A justificativa mais provável é que as bactérias utilizaram os produtos intracelulares armazenados como fonte de carbono.

REFERÊNCIAS

- AHN, Y.H. **Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review.** Process Biochemistry, v.41, p. 1709-1721. 2006
- APHA, AWWA, and WPCF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 22th ed. Port City Press, Baltimore. 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, NBR 9648: Estudo de concepção de sistemas de esgoto sanitário. Rio de Janeiro, 1986.
- AZEVEDO NETTO, J.M. **Novos conceitos sobre a eutrofização.** Revista DAE, v.48 , 151. 1988
- BARNARD J. L. **Design of nitrification/denitrification process. Design for nitrogen removal and guarantees for aeration.** Braunschweig. 1991.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Brasília, DF, 2005a.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução N° 359, de 29 de abril de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Brasília, DF, 2005b.
- BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Programa de Modernização do Setor Saneamento (PMSS). **Instrumentos das políticas e da gestão dos serviços públicos de saneamento.** Brasília, v.1. 239p. 2009.
- BUENO, Rodrigo de Freitas. Avaliação na nitrificação e desnitrificação simultânea em estação de tratamento de esgoto em escala real. 2016. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Engenharia Civil, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- CARVALHEIRA M.; OEHMEN A., CARVALHO G.; EUSÉBIO M.; REIS M.A.M. **The impact of aeration on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms.** Water Research. v. 66. p 296-307. 2014a.
- CARVALHEIRA M.; OEHMEN A., CARVALHO G.; REIS M.A.M. **The effect of substrate competition on the metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs).** Water Resarch. v. 64 p.149-159, 2014b.
- CHEN, H.; WANG, D.; Li, X. **Enhancement of post-anoxic denitrification for biological nutrient removal: effect of different carbon sources.** Environmental science and pollution research international. v22. p.5887-5894, 2015.
- COATS, E.R., MOCKOS, A., LOGE, F.J. **Post-anoxic denitrification driven by PHA and glycogen within enhanced biological phosphorus removal.** Bioresour. Technol. 102,p1019-1027. 2011.
- COMEAU, Y.; HALL, K. J.; OLDHAM, W. K. **Determination of Poly-beta-Hydroxybutyrate and Poly-beta-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography.** Applied and environmental microbiology. v54, p 2325-2327. 1988.

CROCETTI G.R., HUGENHOLTZ P., BOND P.L., SCHULER A., KELLER J., JENKINS D., BLACKALL L.L. **Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection And Quantitation.** Applied and Environmental Microbiology 2000, 66: 1175-1182

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos da Limnologia.** Rio de Janeiro: FINEP, 1988.

FIGUEIREDO, M. G.; DOMINGUES, V. B. **Microbiologia de Lodos Ativados.** CETESB, 1997

FREITAS F., TEMUDO M., REIS M.A.M. **Microbial population response to changes of the operating conditions in a dynamic nutrient-removal sequencing batch reactor.** Bioprocess Biosyst. Eng. v.28 p.199-209. 2005.

HENZE, M., GUJER, W., MINO, T., van LOOSDRECHT, M.C.M. **Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2D and ASM3.** IWA Scientific and Technical Report No. 9. IWA Publishing, London, UK. 2000.

HIKUMA et al. **Rapid Detection of Ammonia-oxidizing Bacteria in Activated Sludge Based on 16S-rRNA Gene by Using PCR and Fluorometry.** Biotechnol. Bioprocess Eng. 2002, 7: 323-326

KARTAL B., ALMEIDA N.M., MAALCKE W.J., O. H.J.M, JETTEN M.S.M., Keltjens J.T. **How to make a living from anaerobic ammonium oxidation.** Federation of European Microbiological Societies. Microbiology reviews. 2013, 428-461.

LI, B.; WU, G. **Effects of sludge retention times on nutrient removal and nitrous oxide emission in biological nutrient removal processes.** International Journal of Environmental Research and Public Health. v 11, p 3553-3569. 2014.

LIM et al. **Primer and Probe Sets for Group-Specific Quantification of the Genera Nitrosomonas and Nitrospira Using Real-Time PCR.** Biotechnology and Bioengineering, Vol. 99, No. 6, April 15, 2008

MADIGAN, T.M., MARTINKI, J.M., PARKER, J. **Brock biology of microorganisms.** Prentice Hall, Inc., N.Y., 2010.

MARTÍN H.G.; IVANOVA N.; KUNIN V.; WARNECKE F.; KERRIE W.B.; McHardy A.C.; YEATES C.; HE S.; SALAMOV A.A.; SZETO E.; DALIN E.; PUTNAM N.H.; SHAPIRO H.J.; PANGILINAN J.L.; RIGOUTSOS I.; KYRPIDES N.C.; BLACKALL L.L.; McMahan K.D., HUGENHOLTZ P. **Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities.** Nature biotechnology v.24 p.1263-1269. 2006.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering – Treatment, Disposal and Reuse.** Singapura: McGraw-Hill, 2003.

MORGAN-SAGASTUME, F.; HJORT, M.; CIRNE, D. **Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale.** Bioresource Technology, v 181, p.78-89. 2015.

NITTAMI et al. **Analysis of the populations of denitrifying bacteria in activated sludge by PCR-DGGE analysis of the nirS nitrite reductase genes.** J. Japan Society on Water Environ., v.26, p.583-588 (in Japanese). 2003.

OEHMEN A., KELLER L. B., ZENG R. J., YUAN Z., KELLER, J. **Optimisation of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems.** Journal of Chromatography. 1070:131-136 2005.

OEHMEN, A.; LEMOS, P. C.; CARVALHO, G.; YUAN, Z.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L., & REIS, M. A. **Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale.** Water research, 41(11), 2271-2300. 2007.

PIVELI, R. P.; KATO, M. T. **Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos.** São Paulo:ABES, 2006.

QUEVEDO, C. As atividades do homem e a evolução da dinâmica do fósforo no meio ambiente. 2009. Dissertação (mestrado) - Pós-graduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. 247p.

REZENDE, S.C.; HELLER, L. **O Saneamento no Brasil. Políticas e Interfaces.** 2.ed. rev. e ampl. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2008.

SAITO, T.; BRDJANOVIC,D.; M.C.M. van Loosdrecht. **Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms.** Water Research. v38 p3760-3768. 2004.

SAWYER, C.N., McCARTY, P.L., PARKIN, G.F. **Chemistry for Environmental Engineering and Science.** McGraw-Hill Science, 2002.

SCHMID M.; WALSH K.; WEBB R.; RIJPSTRA W.I.C.; van de Pas-Schoonen K., VERBRUGGEN M.J.; HILL T.; MOFFETT B.;FUERST J.; SCHOUTEN S.; DAMSTÉ J.S.S.; HARRIS J.; SHAW P.; JETTEN M.; STROUS M. **Candidatus “Scalindua brodae”, sp. nov., Candidatus “Scalindua wagneri”, sp. nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria.** Systematic and applied microbiology v.26 p.529-538. 2003.

Sistema nacional de informações em saneamento – SNIS. Diagnóstico dos serviços de água e esgotos – 2015. Brasília: Ministério das Cidades. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2015>. Acesso em janeiro/2017

SUDESH, K.; ABE, H.;DOI, Y. **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters.** Progress in Polymer Science (Oxford). v25, p1503-1555. 2000.

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

VAN HAANDEL, A. C., & MARAIS, G. **O comportamento do sistema de lodo ativado: teoria e aplicações para projetos e operação.** In *O comportamento do sistema de lodo ativado: Teoria e Aplicações para Projetos e Operação*. Epgraf, 1999.

VAN NIEL, E.W.J.; APPELDOORN, K.J.; ZEHNDER, A.J.B.; KORTSTEE, G.J.J. **Inhibition of anaerobic phosphate release by nitric oxide in activated sludge.** Appl. Environ. Microbiol. v. 64. p. 2925-2930. 1998.

VILASECA, M. M. **Observación microscópica de fangos activados en los tratamientos de depuración biológica.** Boletín Intertext (UPC), p.67-72, 2001.

VOLLENWEIDER, R.A. **Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus factors in eutrophication.** Paris: Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Tech. Report. DAS/CSI6827, 1968.

WINKLER, M.; COATS, E.R.; BRINKMAN, C.K. **Advancing post-anoxic denitrification for biological nutrient removal.** Water Research v.45 p.6119-6130. 2011.

ZENG, R.J.; YUAN, Z.; KELLER, J. **Improved understanding of the interactions and complexities of biological nitrogen and phosphorus removal processes.** Reviews in Environmental Science & Bio/Technology. p265-272. 2004