

Universidade do Minho

Maria Madalena Costa Vieira

Estudo da cinética de acumulação e consumo de polímeros de reserva num reactor de biofilmes para a remoção do azoto

Tese de Mestrado

Tecnologia do Ambiente

Trabalho efectuado sob a orientação da

Professora Regina Maria de Oliveira Barros Nogueira

e a co-orientação do

Professor António Guerreiro Brito

Braga, Setembro de 2005

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registado o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

À **Doutora Regina Nogueira**, o meu mais profundo agradecimento por todo o apoio, incentivo e disponibilidade demonstrados. Agradeço a forma como orientou todo o trabalho, os conhecimentos que me proporcionou, a sua preciosa ajuda na elaboração desta tese, e também a sua amizade.

Ao **Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho**, em particular ao seu Director em funções na altura do início desta tese **Professor José António Couto Teixeira** e à actual **Directora Professora Rosário Oliveira**, agradeço a aceitação para a realização deste Mestrado, assim como a disponibilização das instalações para a realização da parte experimental. Também lhes agradeço na qualidade de funcionária deste Departamento por me terem facilitado o tempo que dediquei à realização desta tese.

Ao **Doutor António Guerreiro Brito**, agradeço os ensinamentos que me transmitiu e a sua disponibilidade.

À **Denise Silva** o meu profundo agradecimento por todo o trabalho experimental desenvolvido, pelo apoio e palavra amiga, pelo tempo disponibilizado e sem a qual esta tese não teria sido possível.

Ao **Doutor Paulo Lemos** da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Lisboa agradeço a prontidão com que respondeu às minhas dúvidas.

À **Doutora Ana Maria Campos** do Departamento de Química da Universidade do Minho, agradeço a ajuda e disponibilidade demonstradas.

À **Claudia Alves** agradeço o apoio na implementação da parte experimental desta tese.

Ao **Doutor João Peixoto** agradeço a disponibilidade na resposta às minhas “eternas” dúvidas relacionadas com normas de edição.

Ao meu colega de trabalho e amigo **Paulino Amorim** agradeço a paciência, incentivo e palavras amigas nos momentos críticos.

À minha família, em particular ao meu marido, **Eurico** e aos meus filhos, **Eduardo e Ana Miguel**, agradeço o apoio incondicional e a compreensão pelo tempo que dediquei a este trabalho. À minha mãe, **Maria Rosa** e à minha sogra **Maria Inácia**, o meu eterno agradecimento pela disponibilidade que sempre demonstraram no apoio aos meus pequeninos.

SUMÁRIO

Os sistemas de tratamento de águas residuais domésticas têm sido tradicionalmente projectados para a remoção de carbono orgânico. Apesar do processo também permitir alguma remoção de azoto sob a forma de amónio, através do crescimento heterotrófico e da nitrificação, a verdade é que os níveis de nitrato descarregados nas águas superficiais têm-se mantido elevados. Estas descargas originam a introdução excessiva de nutrientes nos meios de rejeição, contribuindo em grande escala para o processo de eutrofização e de depleção de oxigénio. A necessidade de desenvolver sistemas compactos ou ampliar instalações existentes para permitir a remoção de azoto afigura-se como uma potencial área de investigação na aplicação de biofilmes em reactores sequenciais descontínuos (SBBR).

No presente trabalho analisou-se o efeito do tipo de alimentação ao SBBR (contínua versus descontínua) na sua capacidade de remoção de azoto. Estudou-se a cinética de produção e degradação de polímeros de reserva, nomeadamente o poli- β -hidroxibutirato (PHB) e o poli- β -hidroxivalerato (PHV), pela biomassa presente no reactor, relacionando o tipo de alimentação com o armazenamento de carbono intracelular. Os efeitos da presença de oxigénio também foram avaliados para o estudo da optimização do desempenho do reactor na remoção de azoto.

Um reactor SBBR com um volume total de 28 l foi operado com um meio sintético que pretendia simular um efluente doméstico, constituído por acetato e amónio com uma razão C/N mássica de 3.78. O suporte para a formação de biofilme ocupava cerca de 34 % do volume total do reactor. O sistema operou em ciclos de 300 min, constituídos por uma fase de enchimento com mistura, uma fase de arejamento e uma fase de descarga.

No modo de operação com alimentação descontínua, verificou-se uma acumulação significativa de PHB, tendo-se obtido fracções de PHB expressas em moles de carbono, de 0.12 mol/mol na biomassa suspensa e de 0.019 mol/mol no biofilme. Não se observou a acumulação de quantidades apreciáveis de PHV. Durante a fase de “abundância” de carbono, a taxa específica de consumo de acetato foi de 0.30 mol/(mol·h) e a taxa específica de síntese de PHB foi de 0.22 mol/(mol·h). Consequentemente, a fracção de substrato armazenado sob a forma de PHB foi de 0.7. Verificou-se que o carbono armazenado foi usado para crescimento aeróbio e não para a desnitrificação, devido à concentração elevada de oxigénio no meio. A remoção de carbono orgânico foi total e a remoção de azoto foi de 75.7 %. A taxa de nitrificação, nestas condições, foi de 0.43 mmol/(l·h) e a percentagem amónio nitrificado foi de

67.8 % do azoto fornecido. A taxa de desnitrificação foi de 0.46 mmol/(l·h) e a percentagem azoto desnitrificado foi de 43.6 % do azoto fornecido.

No modo de operação com alimentação contínua, com períodos sucessivos de mistura e de arejamento, não se verificou acumulação de polímeros de reserva. Este facto era previsível uma vez que este regime de alimentação não favoreceu as condições transientes de carbono.

O aumento gradual dos períodos de arejamento favoreceu a nitrificação. Até 60 min de arejamento, quer a nitrificação quer a desnitrificação são favorecidas. Acima desse valor, devido ao excesso de oxigénio na fase líquida e conseqüente penetração nos flocos de biomassa e no biofilme, deixam de se verificar as condições anóxicas que permitem a desnitrificação. A remoção de azoto constitui um compromisso entre os processos de nitrificação e de desnitrificação, verificando-se, com este trabalho, que existe um fornecimento óptimo de oxigénio que maximiza este compromisso. Com este sistema, o tempo total de arejamento que maximizou a desnitrificação foi de cerca de 27 % do tempo total. Nestas condições, a percentagem de amónio nitrificado e a percentagem azoto desnitrificado foram de 58.8 % e 39.0 %, respectivamente, do amónio fornecido. A remoção total de azoto foi de 69.2 %.

Face aos resultados obtidos, verificou-se que a alimentação contínua constitui um modo de operação interessante no SBBR: as percentagens de remoção de azoto foram próximas das obtidas com alimentação descontínua, com a vantagem de eliminar a necessidade de um tanque de mistura ou de um segundo reactor. O fornecimento de oxigénio com períodos sucessivos de mistura e de arejamento também demonstrou vantagens na medida em que permitiu uma redução de 65 % do consumo de oxigénio (60 min de arejamento em alimentação contínua versus 165 min em alimentação descontínua).

ABSTRACT

Biological treatment of domestic wastewater has been traditionally designed for organic carbon removal purposes only. Although the process allows for some removal of nitrogen in the form of ammonium by heterotrophic growth and nitrification, the fact is that nitrate levels discharges in superficial waters are still high. Those effluents create an excessive nutrient load on water bodies and contribute in a large scale to eutrophization and oxygen depletion. The resulting need to develop compact wastewater treatment facilities or to up-grade existing plants for nitrogen removal provides a new opportunity in Sequential Biofilm Batch Reactors (SBBR) research.

In the present study, the effect of feeding regime (continuous versus discontinuous) on reactor capacity for nitrogen removal was evaluated. The kinetics and degradation of two storage polymers, namely poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and poly- β -hydroxyvalerate (PHV), by SBBR biomass was studied and the feeding regime was related to intracellular carbon storage. Furthermore, a reactor optimization study correlated the effects of oxygen accessibility with nitrogen removal.

A SBBR with a volume of 28 l was fed with synthetic medium simulating a domestic effluent, containing acetate and ammonium with a C/N ratio of 3.78. Biofilm was allowed to grow on a carrier support occupying 34% of the total volume. The reactor operated in a cyclic sequence of 300 min consisting of mixed fill, aeration and discharge phases.

In discontinuous feeding mode, the presence of a significant PHB accumulation was observed. The fractions of PHB were 0.12 mol/mol in the active suspended biomass and 0.019 mol/mol in the biofilm, respectively. Accumulation of PHV was neglectable. For the "feast" period, the specific acetate uptake rate was quantified with 0.30 mol/(mol·h) and the specific PHB production rate with 0.22 mol/(mol·h). Therefore the stored fraction of substrate on PHB form was 0.7. Because of the high oxygen concentration in the bulk phase, stored carbon was used for aerobic heterotrophic growth and not for denitrification purpose. The organic removal was total and the nitrogen removal was 75.7 % of the total nitrogen fed. The nitrification rate was 0.43 mmol/(l·h), so that 67.8 % of the ammonium-nitrogen fed were nitrified. The denitrification rate was 0.46 mmol/(l·h), so that 43.6 % of the total nitrogen fed were denitrified.

No polymer accumulation was found to occur in experiments with continuous feeding and sequencing periods of mixing and aeration within a cycle. This fact was predictable once continuous feeding do not provide transient carbon conditions for carbon storage occurrence.

The prolongation of aeration periods seems to favour nitrification. Until 60 min of total aeration time, both nitrification and denitrification are favoured. Longer aeration periods favour the penetration of oxygen into the inner layer of biomass flocs, which eliminates the anoxic conditions required for denitrification. The nitrogen removal is a compromise between nitrification and denitrification processes. There is a certain supply of oxygen that optimize this compromise. With the utilized system, the optimum denitrification process was obtained with a total aeration time of about 27% of the total cycle. In those conditions, the ammonium nitrified and the nitrogen denitrified was 58.8 % and 39.0 %, respectively of the total ammonium fed. The total nitrogen removal was 69.2 %.

Continuous feeding proved to be an interesting operating mode for SBBR: nitrogen removal was similar to that obtained with discontinuous feeding, with the benefit of eliminating the need of a mixing tank or a second reactor. The supply of oxygen in oscillating periods also showed benefits since it allowed a 65 % reduction on the oxygen consumption (60 min with continuous feeding versus 165 min with discontinuous feeding).

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Enquadramento geral	3
1.2	Características de águas residuais domésticas e legislação vigente	4
1.3	O metabolismo do tratamento biológico.	4
1.3.1	O crescimento de biomassa	6
1.3.2	A acumulação intracelular de carbono.....	9
1.3.3	A remoção de azoto.....	15
1.4	O processo de tratamento biológico convencional.	20
1.5	O Reactor Sequencial Descontínuo - SBR.....	21
1.6	O reactor Sequencial Descontínuo de Biofilmes (SBBR).	28
1.6.1	O biofilme.....	28
1.6.2	Os suportes.	29
1.7	Recentes desenvolvimentos em processos de remoção de azoto.....	31
1.7.1	A nitrificação e desnitrificação simultânea – SND.	31
1.7.2	A nitrificação via nitrito.....	32
1.7.3	O processo Anammox.	33
1.7.4	O processo CANON.....	34
1.7.5	Processos de arejamento de elevada frequência (HFO).....	35
1.8	Objectivos e estrutura do presente estudo.	38
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1	Instalação experimental.....	41
2.2	Suporte	43
2.3	Alimentação e inóculo.....	44
2.4	Plano de trabalho.....	46
2.5	Metodologia operacional.....	48
2.6	Controlo analítico de rotina.....	49
2.6.1	Determinação de acetato.....	49
2.6.2	Determinação da carência química de oxigénio (CQO).	50
2.6.3	Determinação de sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV).....	51
2.6.4	Determinação de biofilme aderido no suporte.	51
2.6.5	Determinação de amónio.....	51
2.6.6	Determinação de nitrato.....	52

2.6.7	Determinação de nitrito.....	53
2.6.8	Coloração Nile blue	54
2.6.9	Determinação de polímeros de reserva.....	55
2.7	Metodologias de cálculo	56
2.7.1	Tempo de retenção hidráulico	58
2.7.2	Tempo de retenção celular	58
2.7.3	Quantificação de PHB	58
2.7.4	Carga orgânica	59
2.7.5	Carga de amónio	59
2.7.6	Capacidade de nitrificação.....	59
2.7.7	Taxa de nitrificação.....	60
2.7.8	Percentagem de amónio nitrificado	60
2.7.9	Capacidade de desnitrificação.....	61
2.7.10	Taxa de desnitrificação.....	61
2.7.11	Percentagem de NO _x desnitrificado	61
2.7.12	Percentagem de azoto assimilado na forma de amónio.....	62
2.7.13	Percentagem de remoção de azoto.....	62
2.7.14	Taxas específicas de consumo de acetato e de armazenamento de PHB	62
2.7.15	Balanço material ao carbono e azoto	63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1	Arranque do reactor.....	68
3.2	Cinética de remoção de azoto e de carbono.....	74
3.2.1	Regime de alimentação descontínua.....	74
3.2.2	Regime de alimentação contínua	85
3.3	Efeito do oxigénio na remoção de azoto.....	90
4	CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO	95
5.	BIBLIOGRAFIA.....	99

APÊNDICES

APÊNDICE A

METODOLOGIAS ANALÍTICAS	iii
1. Preparação da solução de micronutrientes segundo Vishniac e Santer	v
2. Carência Química de Oxigénio (CQO) – SM5220 (APHA, 1989).....	vi
3. Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) - SM2540 D/E (apha, 1989).	ix
4. Determinação de biofilme aderido no suporte.....	xi
5. Determinação de amónio - SM4500 NH ₃ C (APHA, 1989).....	xii
6. Determinação de nitrato - SM4500 NO ₃ B modificado(APHA, 1989)	xiii
7. Determinação de nitrito - SM4500 NO ₂ B (APHA, 1989).....	xv
8. Determinação de polímeros de reserva PHB (poli-β-hidroxibutirato) e PHV (poli-β-hidroxivalerato) em biomassa suspensa e aderida.	xvi

APÊNDICE B

MONITORIZAÇÃO DO REACTOR EM ENSAIOS DE ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA	xxi
-------------------------------------------------------------------	-----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição orgânica típica das águas residuais urbanas (Henze, 1995).....	5
Tabela 1.2 – Requisitos exigidos para as descargas das estações de tratamento de águas residuais urbanas em zonas sensíveis sujeitas a eutrofização (Quadros 1 e 2 do Anexo I do D.L. 152/97)	6
Tabela 1.3 – Espécies intervenientes nos sistemas de crescimento microbiano (Heijnen, 2001).....	7
Tabela 1.4 – Percentagens molares de monómeros HB e HV nos polímeros armazenados obtidos em experiências com substratos constituídos por acetato, propionato e butirato (reprodução de Lemos <i>et al.</i> , 1998.)	13
Tabela 1.5 – Rendimentos máximos observados (mol/mol) para o crescimento heterotrófico com acetato Y_{SX}^{max} , com PHB Y_{PX}^{max} e para armazenamento de PHB com acetato Y_{SP}^{max} , em condições aeróbias e anóxicas, segundo Beun <i>et al.</i> (2002) e van Aalst-van Leeuwen <i>et al.</i> (1997).	15
Tabela 1.6 –Rendimentos observados (mol/mol) para crescimento com acetato Y_{SX} , e para armazenamento de PHB com acetato Y_{SP} , em condições aeróbias , segundo Third <i>et al.</i> (2003).....	15
Tabela 2.1 – Características do reactor SBBR estudado.....	41
Tabela 2.2 – Composição da alimentação ao reactor.....	45
Tabela 2.3 – Composição da solução de micronutrientes segundo Vishniac et Santer (1957).....	45
Tabela 2.4 – Plano de trabalho.....	49
Tabela 3.1 – Parâmetros obtidos em estado estacionário, imediatamente antes da descarga do reactor.....	73
Tabela 3.2 – Taxas de nitrificação, desnitrificação e remoção total de azoto em função do tempo de arejamento, nos ensaios efectuados em alimentação descontinua.....	82
Tabela 3.3 – Taxas específicas de consumo de acetato ($-q_{ab}^{CH_3COO^-}$) e de produção de PHB (q_{ab}^{PHB}) e sua razão durante a fase de abundância em SBR. Os desvios padrões estão registados entre parêntesis. Adaptado de Beun <i>et al.</i> (2002).	83
Tabela 3.4 – Taxas de nitrificação, desnitrificação e remoção total de azoto em função do tempo de arejamento, nos ensaios efectuados em alimentação contínua com acetato.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação esquemática do ciclo metabólico de produção de PHB a partir de acetato, em células heterotróficas. A parte a negrito representa o metabolismo geral do acetil-coA via ciclo dos ácido carboxílicos (TCA) e a cadeia de transporte de electrões (ETC) para gerar energia (ATP) e precursores de biomassa usados para o crescimento (reprodução de Reis et al., 2003.).....	11
Figura 1.2 – Sistema convencional de tratamento biológico com remoção de carbono e azoto.	20
Figura 1.3 – As diferentes fases de um ciclo de um reactor sequencial descontínuo.....	23
Figura 1.4 – Representação esquemática de um sistema de SBR com alimentação descontínua constituída por 3 tipos de enchimento (com agitação, estático e arejado). O ciclo inclui também as fases de reacção, sedimentação, descarga e repouso.	25
Figura 1.5 – Representação esquemática de um sistema de SBR com tanque de equalização, alimentação com mistura, fase de reacção arejada, sedimentação e descarga. O tanque de equalização substitui a fase de repouso.	26
Figura 1.6 – Representação esquemática de um sistema de SBR com alimentação estática e arejada, interrompida apenas durante as fases de sedimentação e descarga. O ciclo inclui reciclo, selector, sedimentação, descarga e não tem fase de reacção e nem fase de repouso.	27
Figura 1.7 – Representação esquemática de um sistema de SBR com enchimento contínuo, arejado e agitado, sedimentação e descarga. O separador na zona de alimentação previne a mistura do efluente tratado com o influente a tratar.	27
Figura 1.8 – Influência do tamanho dos flocos em condições aeróbias: formação de zonas aeróbias e anóxicas. (reprodução de Pochana e Keller, 1999).	32
Figura 1.9 – Esquema das reacções que ocorrem no biofilme num processo CANON. As setas tracejadas representam fluxos e as setas a cheio representam as reacções (reprodução de Hao <i>et al.</i> , 2002).....	35
Figura 2.1 – Instalação experimental: (a) Esquema; (b) Foto - (1) tanque de alimentação; (2) bomba de alimentação; (3) agitador; (4) arejadores; (5) bomba de descarga; (6) controlo e aquisição de dados; (7) sonda e medidor de pH; (8) sonda e medidor de oxigénio.	42
Figura 2.2 – Os dispersores de ar comprimido permitem uma perfeita circulação das peças de enchimento.	43
Figura 2.3 – Modos de operação permitidos pelos software de controlo e aquisição de dados.	44
Figura 2.4 – Características do suporte DupUM (Campos et al., 2000)	44
Figura 2.5 – Curva de calibração de acetato por HPLC.	50
Figura 2.6 - Curva de calibração de ião amónio pelo método SM4500.	52
Figura 2.7 – Curva de calibração de ião nitrato pelo método SM4500.	53
Figura 2.8 – Curva de calibração de ião nitrito pelo método SM4500	54
Figura 2.9 – Curvas de calibração de (a) PHB e (b) PHV.....	56
Figura 2.10 – Ciclo do SBBR.....	57
Figura 2.11 – Esquema de cálculos em modo de alimentação descontínua.	64

Figura 3.1 – Evolução da concentração de sólidos no reactor no final da fase de reacção, imediatamente antes da descarga (280 min), em regime de alimentação descontínua. ST , SV , SST e SSV	69
Figura 3.2 – Observação no microscópio de amostra de uma preparação a fresco de biomassa aderida: microrganismos nitrificantes (cor alaranjada) e microrganismos heterotróficos (cor amarelada). Ampliação de 400x	70
Figura 3.3 – As diversas etapas do crescimento de biofilme no suporte. (a) suporte limpo (b) suporte com 60 dias de operação (c) suporte com 150 dias de operação.....	71
Figura 3.4 – Perfis de concentração de CQO , amónio , nitrito e nitrato no reactor no final do periodo de reacção, imediatamente antes da descarga (280 min), em regime de alimentação descontínua.	72
Figura 3.5 - Observação no microscópio de uma amostra de biofilme, tratada por coloração de Nilo. Ampliação 400x.	73
Figura 3.6 – Perfis de concentração de acetato, amónio , nitrito e nitrato no reactor em regime de alimentação descontínua.	74
Figura 3.7 – Perfis de concentração de oxigénio e pH no reactor em regime de alimentação descontínua.....	75
Figura 3.8 – Perfis de concentração de PHB e de PHV na biomassa suspensa e do acetato	75
Figura 3.9 – Perfis de concentração de PHB e de PHV na biomassa aderida, e do acetato no reactor em regime de alimentação descontínua.	76
Figura 3.10 – Perfis de concentração de oxigénio e pH no reactor em regime de alimentação descontínua, durante o ensaio de PHB e PHV.....	76
Figura 3.11 – Balanço materiais ao carbono e azoto durante um ciclo de operação em alimentação descontínua. ..	80
Figura 3.12 – Perfis de concentração de oxigénio, pH, amónio, nitrito e nitrato no reactor em regime de alimentação contínua, com $\Sigma t_A=60$ min e $\Sigma t_M=220$ min.....	87
Figura 3.13 – Perfis de concentração de PHB e PHV na biomassa suspensa, e respectivo perfil de O_2 , no reactor durante parte de um ciclo, em modo de alimentação contínua.....	89
Figura 3.14 – Perfis de concentração de PHB e PHV no biofilme, e respectivo perfil de O_2 , no reactor durante parte de um ciclo, em modo de alimentação contínua.....	89
Figura 3.15 – Percentagens de nitrificação obtidas sem acetato na alimentação e com diferentes tempos de arejamento, para fortificação da biomassa autotrófica.	91
Figura 3.16 – Variação das percentagens de nitrificação, desnitrificação e remoção de azoto em todos os ensaios efectuados, em função do tempo de fornecimento de oxigénio.....	93
Figura A.1 – Cromatograma obtido para análise de PHB e de PHV numa amostra de biomassa suspensa. Análise efectuada em cromatografia gasosa com detector FID, injector split/splitless e com coluna Tecnokroma TR-WAX de 30 m · 0.32 mm · 0.25 μ m. Caudal de ar: 250 ml/min; hidrogénio: 30 ml/min; gás de arraste (hélio): 1 ml/min (pressão na coluna: 50 kPa); gás <i>make-up</i> (azoto): 30 ml/min; temperatura do injector: 220 °C; temperatura do detector: 250 °C; perfil de temperaturas do forno da coluna: 2 min a 50 °C; 15 °C/min até 225 °C em 10 min; 5 min a 225 °C (tempo total de análise: 17min). PI: ácido benzóico.	xx
Figura B.1 – Perfis de concentração de oxigénio, pH, amónio, nitrito e nitrato no reactor em regime de alimentação contínua, com $\Sigma t_A=20$ min e $\Sigma t_M=260$ min.....	xxii
Figura B.2 – Perfis de concentração de oxigénio, pH, amónio, nitrito e nitrato no reactor em regime de alimentação contínua, com $\Sigma t_A=50$ min e $\Sigma t_M=210$ min.....	xxiii

Figura B.3 – Perfis de concentração de oxigénio, pH, amónio, nitrito e nitrato no reactor em regime de alimentação contínua, com $\Sigma t_A=160$ min e $\Sigma t_M=150$ min..... xxiv

SIMBOLOGIA

C_A^i – concentração da espécie i na alimentação, mmol/l;

C_D^i – concentração da espécie i na descarga, mmol/l;

C_E^i – concentração da espécie i em estado estacionário, mmol/l;

$C_{exp,t}^i$ – concentração da espécie i no instante t, obtida experimentalmente, mmol/l;

C_t^i – concentração da espécie i no instante t, mmol/l;

DN – capacidade de desnitrificação, mmol/l;

F^{PHB} – fracção de PHB na biomassa, g/g;

f^{PHB} – razão mássica de PHB na biomassa activa, g/g;

f_{molar}^{PHB} – fracção molar de PHB na biomassa activa, mol/mol;

$K_L a$ – Coeficiente de transferência de massa, h^{-1} ;

L^{CQO} – carga orgânica diária, kg / m^3 .d;

$L^{NH_4^+}$ – carga de amónio diária, kg / m^3 .d;

$M^{biomassa}$ - massa molecular da biomassa activa de fórmula geral $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$ e referida a moles de C (24.5 g/Cmol);

$m_{CrescAer}^i$ - massa da espécie i consumida no processo de crescimento aeróbio, mmol;

m_{DN}^i - massa da espécie i consumida no processo de desnitrificação, mmol;

m_D^i - massa da espécie i descarregada no final do ciclo, mmol;

$m_{energia}^i$ - massa da espécie i consumida em processos energéticos, mmol;

$m_{exp,t}^i$ - massa da espécie i presente no reator no instante t, obtida experimentalmente, mmol;

$m_{processo}^i$ - massa da espécie i consumida/produzida em determinado processo (removido, formado, assimilado, oxidado), mmol;

m_{Res}^i - massa da espécie i residual, mmol;

m_t^i – massa da espécie i no instante t, mmol;

$\Delta m_{t_1,t_2}^i$ – massa da espécie i consumida no intervalo de tempo t_1 e t_2 (valor experimental), mmol;

M^{PHB} - massa molecular de poli-3-hidroxi-butirato (PHB) de fórmula geral $CH_{1.5}O_{0.5}$ e referida a moles de C (21.5 g/mol);

$m_{reactor}^{SST-suspensão}$ - massa de sólidos em suspensão dentro do reactor cheio, g;

$m^{ST-biofilme}$ - massa de sólidos totais aderidos no reactor, g;

N - capacidade de nitrificação, mmol/l;

n^p - número de peças de suporte do reactor;

% *Assimilação* - percentagem do amónio fornecido que foi assimilado;

% *Desnitrificação* - percentagem do amónio fornecido que foi desnitrificado;

% *Nitrificação* - percentagem do amónio fornecido que foi nitrificado;

% *Remoção de N* - percentagem do amónio fornecido que foi removido;

q_{DN}^{max} - taxa de desnitrificação máxima, mmol/(l·h);

q_{DN}^{min} - taxa de desnitrificação mínima, mmol/(l·h);

q_{DN} - taxa de desnitrificação, mmol/(l·h);

q_N^{max} - taxa de nitrificação máxima, mmol/(l·h);

q_N^{min} - taxa de nitrificação mínima, mmol/(l·h);

q_N - taxa de nitrificação, mmol/(l·h);

$-q_{ab}^{CH_3COO^-}$ - taxa específica de consumo de acetato em regime de abundância, mol/(mol·h);

q_{ab}^{PHB} - taxa específica de síntese de PHB em regime de abundância, mol/(mol·h);

SST - sólidos suspensos totais, g/l;

SSV - Sólidos suspenso voláteis, g/l;

ST - Sólidos totais, g/l;

SV - Sólidos voláteis, g/l;

t_A - tempo de alimentação, min;

t_{ab} - intervalo de tempo em que o reactor se encontra em regime de abundância, min;

t_{AER} - intervalo de tempo em que o reactor apresenta em condições aeróbias, min;

t_{AN} - intervalo de tempo em que o reactor apresenta em condições anóxicas, min;

t_{AR} – tempo de arejamento, min;

t_C – tempo total do ciclo, min;

t_D – tempo de descarga, min;

t_i – tempo de espera, min;

t_M - tempo de mistura, min;

t_R – tempo de reacção, min;

TRC – tempo de retenção celular, d;

TRH – tempo de retenção hidráulico, h;

t_S – tempo de sedimentação, min;

V_A – volume fornecido em cada ciclo, l;

V_D – volume descarregado em cada ciclo, l;

V_E – volume estacionário ou volume do reactor, l;

V_T – volume total do reactor, l;

$X^{ST-biofilme}$ – massa de sólidos totais aderidos em cada peça de suporte, g;

$X_D^{SST-suspensão}$ – concentração de sólidos em suspensão no volume descarregado, g/l;

$X_{reactor}^{SST-suspensão}$ – concentração de sólidos em suspensão dentro do reactor cheio, g/l;

Y_{px}^{max} - rendimento máximo de biomassa em PHB, mol/mol;

Y_{sp}^{max} - rendimento máximo de PHB em substrato, mol/mol;

Y_{sx}^{max} - rendimento máximo de biomassa em substrato, mol/mol;

Y_{px} – rendimento observado de biomassa em PHB, mol/mol;

Y_{sp} – rendimento observado de PHB em substrato, mol/mol;

Y_{sx} – rendimento observado de biomassa em substrato, mol/mol;

$Y_{sx,anox}^{max}$ – rendimento máximo de biomassa em substrato em condições anóxicas, mol/mol;

$Y_{px,aer}^{max}$ – rendimento máximo de biomassa em PHB em condições aeróbias, mol/mol;

Símbolo gregos:

ν_{ij} - coeficiente estequiométrico da espécie i relativamente à espécie j .

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO GERAL

Historicamente, os sistemas de tratamento biológico de águas residuais domésticas têm sido desenvolvidos com o objectivo principal de remover carbono orgânico. Existe já um largo espectro de bioreatores para a conversão de matéria orgânica presente em efluentes de diversas origens visando a obtenção de produtos inofensivos ou com algum valor acrescentado. Os efluentes resultantes de tratamentos biológicos convencionais que apresentam na maioria dos casos quantidades apreciáveis de nutrientes, em particular de azoto, têm sido lançados nos aquíferos, nomeadamente em zonas consideradas sensíveis. Estas descargas têm contribuído em grande escala para o fenómeno de eutrofização, o crescimento indesejado de algas e a depleção de oxigénio nos meios aquáticos.

O Decreto-Lei 152/97 de 19 de Junho consagra normas restritivas para a descarga dos compostos azotados presentes em águas residuais nas zonas denominadas “sensíveis”, áreas potencialmente sujeitas a processos de eutrofização. Tendo em conta este normativo, a implementação de processos de remoção de azoto, nomeadamente a nitrificação e a desnitrificação será, em muitos casos, obrigatória e por consequência, as unidades de tratamento executadas nas décadas de 80 e 90 com o principal objectivo de remoção de matéria orgânica deverão sofrer uma ampliação face às novas exigências legais.

Hoje em dia, o maior esforço no desenvolvimento de processos biológicos está direccionado para a remoção de nutrientes (N e P) e de compostos sulfurosos uma vez que estão a tornar-se uma preocupação devido ao seu impacto na qualidade dos cursos de água (Villaverde, 2004). Os limites impostos pela legislação para azoto em águas residuais tratadas estimularam estudos no sentido de compreender e prever o comportamento dos processos de tratamentos de águas residuais por lamas activadas para a remoção de nutrientes.

Os processos convencionais de nitrificação e desnitrificação exigem grandes consumos de oxigénio e em algumas situações é necessária a adição de uma fonte externa de carbono. Estas exigências traduzem-se em custos de operação elevados, razão pela qual este assunto tem sido alvo de investigação nos últimos anos com o objectivo de implementar tecnologias que permitam a redução dos custos associados á remoção de azoto.

O reactor sequencial descontínuo (SBR, *Sequencing Batch Reactor*) é um sistema de remoção biológica de carbono orgânico com potencialidades económicas para ser ampliado de forma a permitir a remoção de azoto. Esta tecnologia foi desenvolvida na

Alemanha, durante os anos 70. Actualmente, existem neste país mais de 150 SBRs instalados em estações de tratamento de águas residuais (Teichgräber *et al.* 2001). Por ser sequencial, este reaktor é extremamente versátil, e permite facilmente a implementação de alterações processuais. Quando utilizado em regime híbrido com biomassa em suspensão e biomassa aderida, este tipo de sistema revelou potencialidades na redução dos consumos de oxigénio e de adição de fonte externa de carbono. Impõem-se no entanto estudos aprofundados no sentido de melhor compreender e prever o comportamento deste processo para a sua implementação à escala real (Christensson e Welander, 2004).

1.2 CARACTERÍSTICAS DE ÁGUAS RESIDUAIS DOMÉSTICAS E LEGISLAÇÃO VIGENTE

A composição das águas residuais domésticas varia significativamente com o local e com o tempo. Para efeitos de projecto, distinguem-se as águas residuais em termos de carga orgânica como concentrada, moderada, diluída e muito diluída (Henze *et al.*, 1995). A tabela 1.1 apresenta a composição típica das águas residuais urbanas.

O decreto lei nº 152/97 de 19 de Junho, alterado pelo decreto-lei nº 149/2004 de 22 de Junho estabelece as diferentes normas de tratamento de águas residuais urbanas. Estas normas constituem a transposição da directiva europeia 91/271/CEE sobre o tratamento de águas residuais urbanas, onde se estabelecem as medidas que os membros de Comunidade Europeia devem adoptar para garantir que as águas residuais sejam tratadas correctamente antes da sua descarga nos meios naturais. Neste normativo, define-se o conceito de “habitante equivalente” (h-eq) ou “equivalente de população” (e.p.) (D.L. 152/97) que corresponde “à carga orgânica biodegradável com uma carência química de oxigénio ao fim de 5 dias (CBO₅) de 60 g de oxigénio por dia”. A carga, expressa em e.p, será calculada com base na carga média semanal máxima recebida na estação de tratamento durante um ano, excluindo situações excepcionais, tais como as causadas por chuvas intensas. O diploma estabelece um prazo até 31 de Dezembro de 2005 para a adopção das medidas necessárias ao cumprimento dos novos limites impostos. Na tabela 1.2 apresentam-se os requisitos exigidos no D.L 152/97 para as descargas das estações de tratamento de águas residuais urbanas. Os valores de concentração de fósforo e azoto referem-se a descargas em zonas sensíveis sujeitas a eutrofização.

1.3 O METABOLISMO DO TRATAMENTO BIOLÓGICO

A remoção de carbono e de azoto em águas residuais por via biológica consiste num processo combinado de crescimento heterotrófico (com remoção de matéria orgânica),

nitrificação (conversão de amónio em nitrato) e desnitrificação (conversão de nitrato em azoto gasoso).

Tabela 1.1 – Composição orgânica típica das águas residuais domésticas urbanas (Henze *et al.*, 1995).

Parâmetro mg/l	Tipo de água residual			
	Concentrada	Moderada	Diluída	Muito diluída
CQO				
- total	740	530	320	210
- dissolvida	300	210	130	80
- suspensa	440	320	190	130
CQO inerte				
- total	180	130	80	50
- dissolvida	30	20	15	10
- suspensa	150	110	65	40
CQO degradável				
- total	560	400	240	160
- muito facilmente degradável	90	60	40	25
- facilmente degradável	180	130	75	50
- lentamente degradável	290	210	125	85
Biomassa heterotrófica*	120	90	55	35
Biomassa desnitrificante*	80	60	40	25
Biomassa nitrificante*	1	1	0.5	0.5
Azoto				
- total	80	50	30	20
- amónio	50	30	18	12
- nitrito	0.1	0.1	0.1	0.1
- nitrato	0.5	0.5	0.5	0.5
- azoto orgânico	30	20	12	8
- Kjeldahl	80	50	30	20
Fósforo				
- total	23	16	10	6
- ortofosfatos	14	10	6	4
- polifosfatos	5	3	2	1
- fosfatos orgânicos	4	3	2	1

* Biomassa quantificada em termos de CQO

Cada um destes processos pode ser descrito por equações estequiométricas específicas, que incluem balanços de massa e de energia. Cada espécie interveniente no processo interfere no equilíbrio da reacção química, em particular o substrato, o pH do meio (traduzido pela concentração de H^+ ou OH^-) e o oxigénio, sendo por isso factores que influenciam o processo.

Tabela 1.2 – Requisitos exigidos para as descargas das estações de tratamento de águas residuais urbanas em zonas sensíveis sujeitas a eutrofização (Quadros 1 e 2 do Anexo I do D.L. 152/97).

Parâmetro	Concentração	Percentagem mínima de redução
CBO ₅ (mg/l)	25	70 - 90
CQO (mg/l)	125	75
SST (mg/l)	35 (e.p. > 10000)	90 (e.p. > 10000)
	60 (2000 > e.p. > 10000)	70 (2000 > e.p. > 10000)
Fósforo (mg/l P)	1 (e.p. >10000)	80
	2 (2000 < e.p. < 10000)	
Azoto (mg/l N)	10 (e.p. > 10000)	70 - 80
	15 (2000 < e.p. < 10000)	

1.3.1 O crescimento de biomassa

O crescimento de biomassa, consiste num processo em que as bactérias heterotróficas utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e de energia para se reproduzirem. Em condições aeróbias, removem matéria orgânica oxidável (quantificada pela CQO - carência química do oxigénio) a uma velocidade relativamente elevada e produzem tipicamente massa celular, dióxido de carbono e água como produtos finais, muitas vezes sem grandes produtos orgânicos secundários (Wilderer *et al.* 2001).

Microscopicamente, o processo pode-se definir como um complexo conjunto de reacções químicas onde as enzimas usam espécies bioquímicas intermédias para produzir uma grande quantidade de produtos. A descrição detalhada de todas as reacções intracelulares envolvidas no processo é praticamente impossível. No entanto, em estado estacionário verifica-se que todas as reacções químicas estão interligadas sendo apenas necessário descrever as velocidades de conversão dos compostos que entram e dos que saem da biomassa. Esta abordagem é conhecida por modelo da "caixa negra" (Heijnen, 2001), e considera que a composição da biomassa é aproximadamente constante e representada pela fórmula geral $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$. Esta fórmula representa a composição de 1 mole de biomassa que corresponde à quantidade de biomassa que contém 12 g de carbono e refere-se apenas a parte orgânica da biomassa. A parte inorgânica da biomassa, a cinza, constitui cerca de 15% da matéria seca não é contabilizada na fórmula geral.

O processo de crescimento de biomassa requer grandes quantidades de energia, que é fornecida pelas reacções químicas de oxidação-redução entre os dadores e os aceitadores de electrões (Heijnen, 2001). A tabela 1.3 apresenta as diversas espécies possíveis de aceitadores e dadores de electrões. A diferença entre os sistemas de

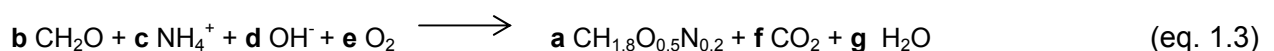
crescimento microbiano reside nas diferentes fontes de azoto (N_2 , NH_4^+ , etc.), diferentes fontes de carbono (orgânicas ou CO_2) e diferentes dadores e aceitadores de electrões.

Tabela 1.3 – Espécies intervenientes nos sistemas de crescimento microbiano (Heijnen, 2001).

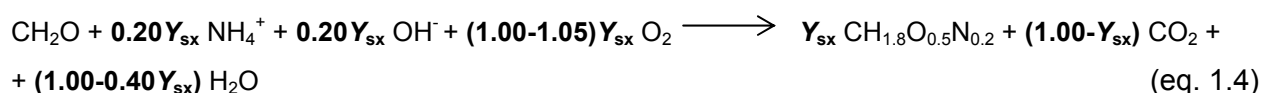
Dadores de electrões	Aceitadores de electrões	Fonte de carbono
Orgânico	Orgânico	Orgânico
Ácido oxálico / CO_2		Ácido oxálico
Ácido fórmico / CO_2		Ácido fórmico
Ácido glioxálico / CO_2		Ácido glioxálico
Ácido málico / CO_2		Ácido málico
Ácido cítrico / CO_2		Ácido cítrico
Ácido pirúvico / CO_2		Ácido pirúvico
Ácido succínico / CO_2		Ácido succínico
Ácido glucónico / CO_2		Ácido glucónico
Formaldeído / CO_2	Fumarato / Succinato	Formaldeído
Glucose / CO_2	Piruvato / Lactato	Glucose
Ácido láctico / CO_2	Acetaldeído / Etanol	Ácido láctico
Ácido acético / CO_2	Acetoína / Butanediol	Ácido acético
Manitol / CO_2		Manitol
Glicerol / CO_2		Glicerol
2-3 butanodiol / Acetoína		2-3 butanodiol
		Acetoína
Etanol / CO_2		Etanol
Metanol / CO_2		Metanol
n-alcanos / CO_2		n-alcanos
Metano / CO_2		Metano
Inorgânico	Inorgânico	Inorgânico
HS^- / SO_4^{2-}	N_2O / N_2	CO_2
NH_4^+ / NO_2^-	O_2 / H_2O	CO
H_2 / H_2O	NO_3^- / N_2	
NO_2^- / NO_3^-	NO_3^- / NH_4^+	
$S_2O_3^{2-} / SO_4^{2-}$	SO_4^{2-} / HS^-	
S / SO_4^{2-}	HCO_3^- / CH_4	
Fe^{2+} / Fe^{3+}	$HCO_3^- / Acetato$	
H_2O / O_2	$HCO_3^- / Etanol$	
CO / CO_2	$S_2O_2^- / HS^-$	
	Fe^{3+} / Fe^{2+}	
	H^+ / H_2	

Cada sistema de crescimento microbiano é caracterizado pelo rendimento de biomassa relativamente a um substrato Y_{sx} . Este rendimento representa uma eficiência de utilização de carbono, depende do sistema de crescimento e pode variar entre 0.01 mol/mol e 0.80 mol/mol (moles de carbono na biomassa produzida por mole de carbono no substrato consumido). O processo de crescimento microbiano é caracterizado por dois passos: no primeiro passo todo o potencial do substrato é usado como fonte de energia e de carbono para a formação de biomassa. No segundo passo, a mesma biomassa entra num processo de metabolismo endógeno, isto é, é utilizada como dador de electrões para as necessidades energéticas da função básica de manutenção das células. Experimentalmente, não é possível determinar os rendimentos do processo de crescimento e de metabolismo endógeno: apenas se consegue observar um resultado final, que pode ser quantificado pelo rendimento observado Y_{sx}^{obs} . Consequentemente, o rendimento observado é uma função das condições operatórias: depende essencialmente do substrato disponível. Quando o substrato se esgota, o sistema continua o processo endógeno, verificando-se uma diminuição da biomassa. Se os cálculos do rendimento forem extrapolados para o início do ensaio, excluindo teoricamente as interferências do metabolismo endógeno, obter-se-á um valor constante, definido como rendimento máximo, Y_{sx}^{max} (Orhon e Artan, 1994).

O crescimento microbiano com acetato pode ser descrito pela equação 1.3, expressa por mole de carbono do substrato. Esta equação estequiométrica descreve a reacção de oxidação de acetato (CH_2O), em condições aeróbias com formação de biomassa heterotrófica ($CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$):



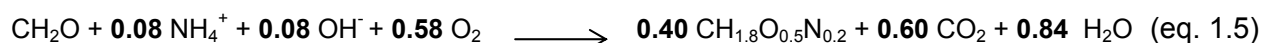
Os coeficientes estequiométricos **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** e **g** são calculados a partir do rendimento de biomassa em acetato (Y_{sx}) e com base nos balanços a cada elemento e às cargas. Considerando **a** = Y_{sx} e **b**=1, os restantes coeficientes podem ser traduzidos em função do rendimento observado Y_{sx} :



Beun e os seus colaboradores (2000b) estimaram os valores dos rendimentos máximos de crescimento microbiano em acetato, em condições dinâmicas de concentração de substrato

("abundância" e "escassez"). Estas estimativas foram baseadas num modelo metabólico que considera que em condições de "abundância" de acetato ocorrem os processos de crescimento heterotrófico com acetato, a acumulação de polímeros de reserva e a manutenção de células. Em condições de "escassez" de acetato, este modelo metabólico considera os processos de crescimento heterotrófico com PHB e a manutenção de células. Para as condições de "abundância", o rendimento máximo de biomassa em acetato Y_{sx}^{max} , obtido por estes autores foi de 0.40 mol/mol (moles de carbono contidos na biomassa por moles de carbono no acetato).

Assim, a equação de oxidação de acetato por bactérias heterotróficas em condições aeróbias e de excesso de carbono pode escrever-se:



Henze *et al.* (1995) referem para o rendimento máximo de conversões aeróbias heterotróficas valores entre 0.5 e 0.7 g/g (CQO de biomassa produzida por CQO de matéria orgânica consumida). O valor de Y_{sx}^{max} referido por Beun *et al.* (2000b) de 0.4 mol/mol corresponde a 0.42 g/g (CQO de biomassa produzida por CQO de acetato).

1.3.2 A acumulação intracelular de carbono

Nos processos de lamas activadas, a biomassa cresce em condições dinâmicas, apesar de se considerar o processo global em estado estacionário. Quando um gradiente (no tempo ou no espaço) de concentração de carbono é introduzido (tal como em sistemas com selectores ou em SBR) produz-se uma condição dinâmica para a biomassa, que cria o seu próprio mecanismo de resposta. Estudos com respirometria em substratos puros levaram alguns autores (Pagni *et al.*, 1992, van Niel *et al.*, 1995) a considerar a existência de um processo de consumo de carbono alternativo ao crescimento de biomassa que se caracteriza por uma relação entre o consumo de oxigénio e o consumo de substrato muito mais baixa do que aquela que seria de esperar se ocorresse apenas crescimento (van Loosdrecht *et al.*, 1997). Esta diferença sugere que apenas uma pequena parte do carbono consumido é usado para crescimento e manutenção celular: o restante é armazenado intracelularmente sob a forma de polímeros de reserva. Estes polímeros são geralmente polímeros de hidroxialcanoatos (PHA), que se acumulam no interior dos microrganismos formando grânulos constituídos pelos microrganismos (Salehizadeh and van Loosdrecht, 2004).

O mecanismo de acumulação destes polímeros foi proposto por Majone *et al.* (1999): após um período prolongado de limitações de carbono ("regime de escassez"), os microrganismos, quando expostos a elevadas concentrações de carbono ("regime de abundância"), transformam a maior parte do substrato em reservas poliméricas internas e o restante em crescimento celular. Após a exaustão do substrato externo, as reservas internas são usadas para crescimento e manutenção celular. Neste período de limitação de carbono, a velocidade específica de crescimento atinge valores muito baixos, o que obriga os microrganismos a uma adaptação fisiológica na fase seguinte, quando confrontado com um excesso de carbono disponível. Esta adaptação resulta preferencialmente num mecanismo de acumulação de reservas em detrimento do crescimento celular (Reis *et al.*, 2003).

O fenómeno de armazenamento costuma ser dominante relativamente ao crescimento de biomassa em condições transientes. Em condições de alimentação contínua e prolongada de substrato, os microrganismos sofrem adaptações fisiológicas, e o crescimento torna-se mais importante (van Loosdrecht *et al.*, 1997).

1.3.2.1 O metabolismo de acumulação de polímeros de reserva

Van Aalst-van Leeuwen *et al.* (1997) e Beun *et al.* (2002) propuseram um mecanismo para a produção de PHB a partir de acetato em células heterotróficas e em condições dinâmicas de concentração de substrato (fig. 1.1). Parte do mecanismo consiste no metabolismo geral de crescimento de biomassa pela via do ciclo dos ácidos carboxílicos (TCA). Um composto intermédio chave na produção de PHB é o acetil-coA. O acetil-coA pode ser usado não só no ciclo dos ácidos carboxílicos para produzir ATP e NADH₂ e formar biomassa mas também na produção de PHB. A reacção de síntese de PHB tem uma constante de equilíbrio muito baixa, isto é, baixas concentrações de acetil-coA não favorecem a reacção. Quando o acetato disponível é superior ao estritamente necessário para crescimento, a concentração de acetil-coA aumenta, favorecendo a reacção de síntese de PHB. Consequentemente, o PHB é acumulado, de forma a manter a concentração de equilíbrio de compostos intermédios nas células. Entretanto, as células também respondem com a produção de mais enzimas anabólicas, i.e., aumentam a sua velocidade de crescimento. Se o período de excesso de carbono fôr longo, a taxa específica de crescimento da biomassa aumentará até o seu valor máximo, e a velocidade de síntese de PHB diminuirá. Se o período de excesso de carbono fôr curto, produzir-se-á PHB, que se irá gastar durante a fase de "escassez". Este efeito já tinha sido também observado por Van Aalst-van Leeuwen *et al.* (1997). Como a síntese de polímeros de reserva é um processo mais simples do que a síntese de células completas, o armazenamento requer menor

adaptação fisiológica, sendo por isso um processo mais rápido que o crescimento (Majone *et al.*, 1999).

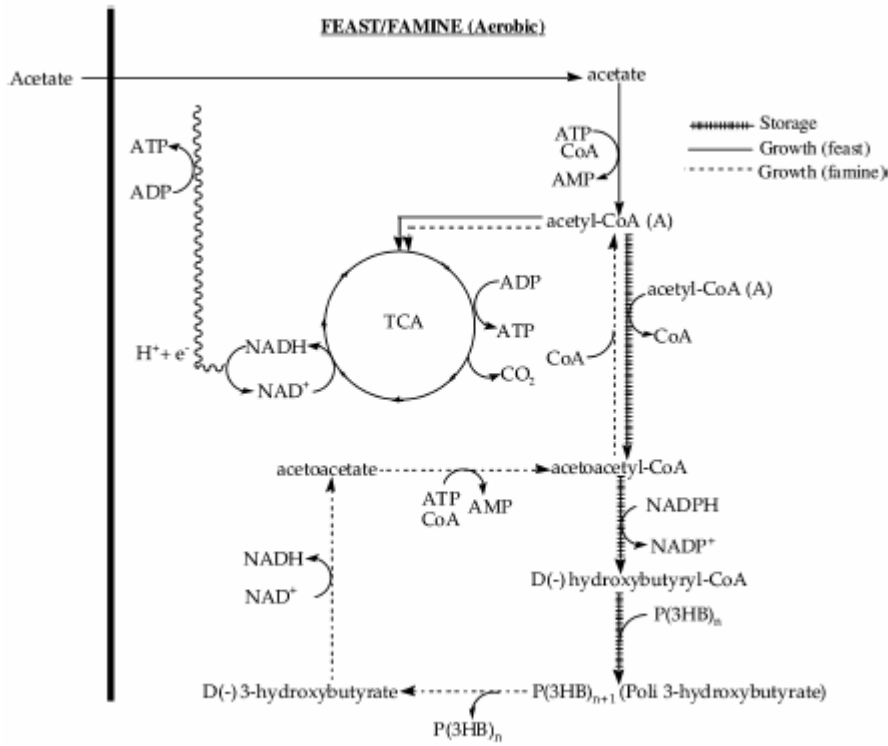
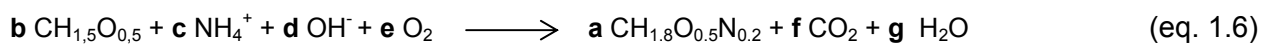


Figura 1.1 – Representação esquemática do ciclo metabólico de produção de PHB a partir de acetato, em células heterotróficas. A parte a negrito representa o metabolismo geral do acetil-coA via ciclo dos ácidos carboxílicos (TCA) e a cadeia de transporte de elétrons (ETC) para gerar energia (ATP) e precursores de biomassa usados para o crescimento (reprodução de Reis *et al.*, 2003).

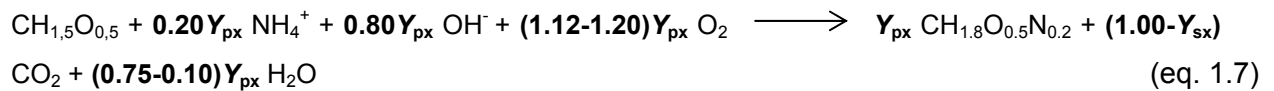
No período de "escassez" a taxa de crescimento dos microrganismos depende da velocidade de degradação de PHB, o que implica que um dos passos da via bioquímica de degradação de PHB é limitante. No entanto o conhecimento científico sobre o mecanismo de degradação de PHB ainda é limitado. (Beun *et al.*, 2002).

Da mesma forma que para o crescimento com acetato, pode-se deduzir a equação estequiométrica de crescimento heterotrófico com PHB ($\text{CH}_{1.5}\text{O}_{0.5}$) em condições aeróbicas da seguinte forma:

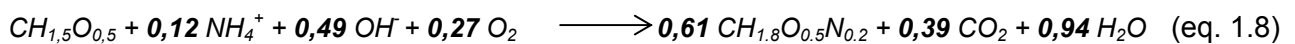


Os coeficientes estequiométricos **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** e **g** são calculados a partir do rendimento observado de biomassa em PHB (Y_{px}) e com base nos balanços a cada elemento e às cargas.

Considerando $a = Y_{px}$ e $b=1$, os restantes coeficientes podem ser traduzidos em função do rendimento observado Y_{px} :



Considerando para o rendimento máximo de biomassa em PHB (Y_{px}^{max}) um valor de 0,61 mol/mol (moles de carbono contidos na biomassa por moles de carbono no PHB) referido por Beun *et al.*, (2000b), a equação de oxidação de PHB por bactérias heterotróficas pode escrever-se:



1.3.2.2 Factores que afectam a acumulação de PHA

A acumulação e o consumo de polímeros de reserva são processos complexos, afectados por uma série de factores, nomeadamente:

i) Fonte de carbono:

Os polímeros de reserva podem ser formados por monómeros todos iguais, ou por monómeros diferentes, tudo depende do substrato usado e das condições de operação. O acetato tem sido o substrato mais utilizado para estudar o fenómeno de armazenamento (Satoh *et al.*, 1992; Smolders *et al.*, 1994; Van Loosdrecht *et al.*, 1997; Beun *et al.*, 2000a e b, Dionisi *et al.*, 2001; Hollender *et al.*, 2002). No entanto, alguns estudos com propionato e butirato (Lemos *et al.*, 1998) lactato, succinato, piruvato e malato (Satoh *et al.*, 1992), glucose e etanol (Beccari *et al.*, 2002, Dionisi *et al.*, 2004) foram já desenvolvidos. Também já foram testados alguns açúcares: glucose, frutose e manose (Hollender *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 1996). Lemos *et al.* (1998) estudaram três substratos (acetato, propionato e butirato) separadamente e misturas destes. A tabela 1.4 apresenta os resultados obtidos em termos de percentagem molar de monómeros de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) obtidos nos polímeros de reserva armazenados. O acetato produz maioritariamente HB. O propionato produz a menor quantidade de HB, e a maior quantidade de HV. O butirato produz aproximadamente a mesma quantidade de um e outro.

Tabela 1.4 – Percentagens molares de monómeros HB e HV nos polímeros armazenados obtidos em experiências com substratos constituídos por acetato, propionato e butirato (reprodução de Lemos *et al.*, 1998).

Substrato	Percentagem molar	
	HB	HV
Acetato	75.25	24.75
Propionato	28.06	71.94
Butirato	59.68	40.32

ii) Condições de operação do processo:

Tendo em conta o metabolismo de armazenamento de polímeros de reserva descrito na figura 1.1, a alternância entre condições de "escassez" e de "abundância" é um factor fundamental no processo de produção destes compostos. Salehizadeh e van Loosdrecht (2004) observaram que nessas condições cerca de 66% a 100% do substrato consumido é usado para armazenamento de PHB durante a fase de "abundância" e o restante é usado para os processos de crescimento e manutenção.

O fornecimento de oxigénio também constitui uma variável importante na acumulação de polímeros de reserva: num processo de lamas activadas, a produção de polímeros de reserva parece ser viável em condições aeróbias (Dircks *et al.*, 2001, Beun *et al.*, 2000a) e em condições anóxicas (Dionisi *et al.*, 2001, Majone *et al.*, 1998). No entanto o efeito do oxigénio sobre o armazenamento de PHB não é consensual: alguns autores referem que as lamas acumulam mais PHB em condições aeróbias que anóxicas (Saito *et al.*, 1995, Majone *et al.*, 1998), enquanto que estudos conduzidos por Third *et al.* (2003a) revelaram que as limitações de oxigénio favorecem o armazenamento e ao mesmo tempo minimizam a produção de biomassa.

iii) Temperatura

A influência da temperatura na acumulação de PHB em culturas alimentadas com acetato num SBR foi estudada por Krishna *et al.* (1999) a temperaturas entre os 15 °C e os 35 °C. A velocidade de formação de PHB diminuiu com o aumento da temperatura devido ao aumento das taxas anabólicas a temperaturas superiores.

iv) Tipo de microrganismos

Não há evidências de que o armazenamento de polímeros de reserva esteja restrito a alguns microrganismos em particular. Tradicionalmente as bactérias filamentosas têm menor capacidade de armazenar substrato que as bactérias formadoras de flocos. Esta capacidade demonstra uma vantagem competitiva destas relativamente às primeiras: em sistemas dinâmicos como o SBR ou sistemas de lamas activadas com selectores, as

bactérias filamentosas não sobrevivem aos períodos de "escassez", enquanto que as bactérias formadoras de flocos crescem durante os períodos de "escassez" à custa do carbono armazenado durante os períodos de "abundância". Este fenómeno pode ser usado para evitar os episódios de "*bulking*" em lamas activadas (Majone *et al.*, 1996; van Loosdrecht *et al.*, 1997).

No entanto, recentes estudos revelaram que tanto bactérias filamentosas como formadoras de flocos têm capacidade para armazenar carbono sob a forma de polímeros de reserva (Martins *et al.*, 2004). Estudos efectuados por Andreasen e seus colaboradores (2000) com culturas puras demonstraram que algumas bactérias filamentosas como a *M. Parvicella* podem ter elevada capacidade de armazenar carbono em várias condições (aeróbias, anóxicas e anaeróbias).

Muitos autores estudaram o fenómeno de armazenamento de PHB, e calcularam rendimentos de produção de PHB em substrato, na tentativa de desenvolver um modelo capaz de prever este fenómeno (Beun *et al.*, 2000a; van Aalst-van Leeuwen *et al.*, 1997; van Loosdrecht *et al.*, 1997; Dionisi *et al.*, 2001; Majone *et al.*, 1998; Carta *et al.*, 2001; Krishna *et al.*, 1999; Carucci *et al.*, 2001). Uma das dificuldades encontradas na comparação dos valores publicados sobre o armazenamento de PHB é o facto de se referirem a condições diferentes de operação. Beun *et al.* (2000a e 2000b) calcularam valores de rendimentos máximos de crescimento de biomassa em acetato e em PHB por simulação com o modelo ASM3 modificado (com o software de simulação Aquasim). Os valores foram calculados a partir dos dados experimentais obtidos num SBR com a alimentação constituída por acetato e fornecida por impulso, em condições anóxicas e em condições aeróbias.

Van Aalst-van Leeuwen *et al.* (1997) tinham já adoptado um modelo semelhante para o cálculo dos rendimentos observados em condições aeróbias. A tabela 1.5 apresenta os valores obtidos. Verifica-se que os valores são bastante concordantes.

Third *et al.* (2003a) determinaram rendimentos para o crescimento de culturas mistas com acetato e com PHB a partir dos valores experimentais de taxas de consumo de oxigénio (OUR), concentrações de PHB e concentrações de acetato, em condições aeróbias com diferentes concentrações de oxigénio (tabela 1.6).

Estes valores sugerem que em condições aeróbias com oxigénio limitante, o armazenamento de PHB é favorecido e o crescimento de biomassa com acetato é baixo. Em condições de oxigénio superior a 0.9 mg/l, o crescimento de biomassa aumenta, o que resulta em menor quantidade de carbono disponível para o fenómeno de armazenamento de PHB.

Tabela 1.5 – Rendimentos máximos observados (mol/mol) para o crescimento heterotrófico com acetato Y_{SX}^{max} , com PHB Y_{PX}^{max} e para armazenamento de PHB com acetato Y_{SP}^{max} , em condições aeróbias e anóxicas, segundo Beun *et al.* (2002) e van Aalst-van Leeuwen *et al.* (1997).

Condições	Beun <i>et al.</i> (2002)		van Aalst-van Leeuwen <i>et al.</i> (1997)
	Aeróbias	Anóxicas	Aeróbias
Y_{SX}^{max}	0.40	0.30	0.423
Y_{PX}^{max}	0.61	0.53	0.653
Y_{SP}^{max}	0.61	0.52	0.648

Tabela 1.6 – Rendimentos observados (mol/mol) para crescimento com acetato Y_{SX} , e para armazenamento de PHB com acetato Y_{SP} , em condições aeróbias, segundo Third *et al.* (2003).

	Limitações de O_2 (0 mg/l)			$C^{O_2} > 0.9$ mg/l	
	$K_{La} = 6 h^{-1}$	$K_{La} = 12 h^{-1}$	$K_{La} = 16 h^{-1}$	$K_{La} = 30 h^{-1}$	$K_{La} = 51 h^{-1}$
Y_{SX}	0.14	0.17	0.13	0.34	0.35
Y_{SP}	0.63	0.65	0.68	0.49	0.48

Nos cálculos dos balanços materiais ao carbono efectuados neste estudo usaram-se os rendimentos referidos na tabela 1.5 porque as condições de operação em que foram obtidos eram semelhantes às do presente estudo.

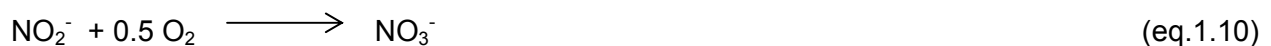
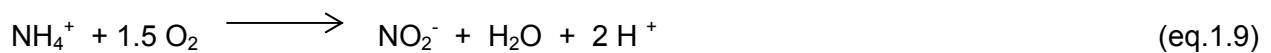
1.3.3 A remoção de azoto

A remoção de azoto é efectuada por dois processos distintos. A nitrificação e a desnitrificação. O primeiro converte o amónio em nitrato, e o segundo converte o nitrato em azoto molecular, que se liberta no ar. Cada um destes processos ocorre em condições específicas.

1.3.3.1 A nitrificação

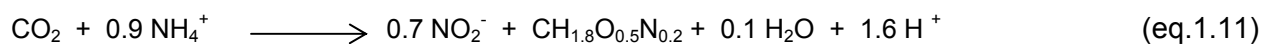
As bactérias nitrificantes são quimiolito-autotróficas que utilizam dióxido de carbono como fonte de carbono e azoto sob a forma de amónio ou nitrito como fonte de energia ou dador de electrões.

Na nitrificação intervêm dois géneros de bactérias: as bactérias oxidantes do amónio que convertem o amónio em nitrito, e as bactérias oxidantes do nitrito que convertem o nitrito em nitrato. Nos períodos aeróbios dá-se o processo de nitrificação, constituído por dois passos, de acordo com as seguintes reacções catabólicas (Schmidt *et al.*, 2003):

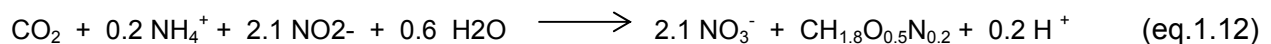


Em estado estacionário, todo o nitrito produzido é consumido no segundo passo. Acumulações de nitrito só ocorrem em situações de estado não estacionário (sobrecargas ou problemas operacionais). Os microrganismos nitrificantes têm taxas específicas de crescimento muito baixas, o que os torna vulneráveis em situações de competição pelo substrato com bactérias heterotróficas, de crescimento mais rápido. Também ficam mais sensíveis à presença de tóxicos e inibidores e às condições ambientais tais como o pH e a temperatura (Tomei *et al.* 1996).

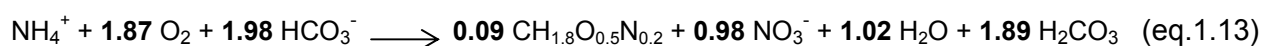
As reacções de síntese celular são para as bactérias oxidantes do amónio:



e para as bactérias oxidantes do nitrito:



Tendo em conta o equilíbrio dos carbonatos, e sabendo que o rendimento biomassa/substrato para Nitrosomonas é de 0.1 g SSV/g N-NH₄⁺, e que para nitrobacter é de 0.06 SSV/g N-NO₂⁻. (Henze *et al.*, 1995) obtém-se a equação geral da reacção de nitrificação combinando as equações (1.9), (1.10), (1.11) e (1.12):



Em geral o pH óptimo para a nitrificação está compreendido entre 8 e 9 (Henze *et al.* 1995). A acidez produzida pela reacção de nitrificação pode conduzir a uma redução

significativa do pH, podendo atingir valores de pH de 4, principalmente no caso de efluentes com baixa alcalinidade ou elevadas concentrações de amónio. Os problemas originados por baixos valores de pH são geralmente a redução da taxa de nitrificação, efluente corrosivo e crescimento filamentosos (Dold *et al.*, 1987).

A concentração de oxigénio é um parâmetro fundamental no controlo do processo de nitrificação. A nitrificação é um processo estritamente aeróbio, isto é, só ocorre na presença de oxigénio. Estequiometricamente, é necessária a presença de 1.87 mmol de O₂ para a oxidação de 1 mmol de N-NH₄⁺ (eq. 1.13). A concentração de O₂ para a nitrificação deve ser superior a 2 mg/l, caso contrário, o oxigénio pode ser um factor limitante. Por outro lado, uma concentração de oxigénio de 0.2 mg/l é um valor crítico à qual não ocorre nitrificação (Pochana and Keller, 1999). Quando a concentração de oxigénio é limitante, as bactérias heterotróficas competem com as autotróficas. Devido às suas baixas taxas de crescimento a nitrificação é preterida a favor do crescimento heterotrófico. Para garantir o processo de nitrificação, é por isso conveniente o fornecimento de oxigénio em excesso.

A presença de alguns metais pesados e compostos de enxofre pode afectar significativamente a cinética de nitrificação (Tomei *et al.*, 1996).

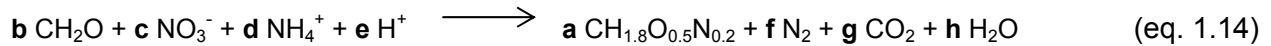
A carga de amónio é também um factor importante na cinética de nitrificação. Vários estudos referem o amoníaco (ou o ião amónio livre) como a principal causa de acumulação de nitrito, por inibição das bactérias oxidantes do nitrito (Fdz-Polanco *et al.*, 1994, Villaverde *et al.*, 1997). Este efeito foi frequentemente identificado em sistemas de tratamento de águas residuais e habitualmente associado à ineficiência do processo e até à toxicidade das lamas (Villaverde, 2004). Sabe-se que as bactérias oxidantes do nitrito são mais sensíveis ao efeito inibidor do amoníaco do que as bactérias oxidantes do amónio (Anthonisen *et al.*, 1976), sendo esta a causa principal da acumulação de nitrito nos processos de nitrificação-desnitrificação.

1.3.3.2 A desnitrificação

Os processos de eliminação de nitrato têm interesse prático não só no tratamento de águas residuais com um elevado conteúdo de nitrato, mas também, em combinação com os processos de nitrificação para a eliminação de azoto amoniacal. O processo mais comum para a remoção de nitrato de um efluente é a desnitrificação biológica, isto é a redução das formas oxidadas de azoto, nitrato e nitrito a óxido nitroso e azoto molecular (Schmidt *et al.*, 2003).

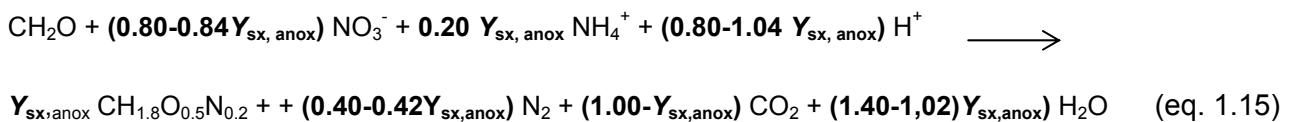
Em condições anóxicas as bactérias heterotróficas utilizam as formas oxidadas do azoto (nitrato ou nitrito) como aceptores de electrões e produzem azoto molecular, dióxido

de carbono e água, e alguns produtos orgânicos secundários (Wilderer *et al.*, 2001). Sendo bactérias heterotróficas, necessitam de uma fonte orgânica de carbono para se reproduzir. Quando a fonte de carbono é o acetato, a reacção catabólica de desnitrificação é a seguinte:

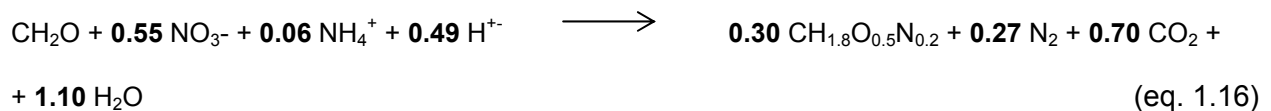


Os coeficientes estequiométricos **a,b,c,d,e,f,g**, e **h** são calculados a partir do rendimento observado para a desnitrificação ($Y_{\text{sx,anox}}$) e com base nos balanços a cada elemento e às cargas.

Considerando **a** = $Y_{\text{sx,anox}}$ e **b**=1, os restantes coeficientes podem ser traduzidos em função do rendimento observado $Y_{\text{sx, anox}}$:



Considerando para o rendimento de biomassa em acetato em condições anóxicas $Y_{\text{sx,anox}}$ um valor de 0.30, referido por Beun *et al.* (2000b), constante na tabela 1.5 a equação de desnitrificação com acetato pode escrever-se:



Na ausência de espécies oxidadas de azoto como aceitadores de electrões (isto é em condições anaeróbias), algumas bactérias heterotróficas (acidogénicas ou acetogénicas) produzem compostos de baixo peso molecular, nomeadamente ácidos gordos voláteis (Beun *et al.*, 2000b).

Os factores que afectam o processo de desnitrificação incluem a temperatura, o pH, a concentração de nitrato e de carbono orgânico, a presença de oxigénio e de substâncias tóxicas, entre outros.

O pH óptimo para o processo de desnitrificação situa-se entre 7 e 9 (Henze *et al.*, 1995). A desnitrificação produz alcalinidade. Por outro lado, o processo de nitrificação

consome alcalinidade, causando uma redução no pH nos casos em que o consumo é maior que a alcalinidade da água. Este fenómeno pode ser parcialmente compensado pela combinação com o processo de desnitrificação uma vez que o consumo de alcalinidade pelo processo global de nitrificação-desnitrificação é atenuado (Henze *et al.*, 1995).

Como o processo de desnitrificação envolve consumo de carbono, a presença de carbono orgânico facilmente biodegradável é um factor determinante para garantir uma boa cinética de desnitrificação. A razão da concentração entre o carbono e o azoto no influente (razão C/N) constitui um indicador da capacidade de desnitrificação do sistema em causa e permite indagar da necessidade de adição de uma fonte de carbono externa para completar o processo de desnitrificação. Se a razão C/N na alimentação for demasiado baixa, o processo de desnitrificação será apenas parcial ou demasiado lento, o que se traduz num tratamento ineficiente do nitrato e na acumulação de produtos intermédios como por exemplo o óxido nitroso. Com acetato como fonte de carbono, a razão C/N óptima, em termos de carência química de oxigénio situa-se entre 3.1 e 3.7 kg/kg (Henze *et al.*, 1995).

As bactérias desnitrificantes são na sua maioria bactérias aeróbias facultativas, que têm a capacidade de reduzir óxidos de azoto quando o oxigénio é o factor limitante. O oxigénio é o regulador mais importante da actividade desnitrificante. A relação entre o fornecimento de oxigénio e o seu consumo provoca a existência de gradientes de concentração de O₂ no interior do reactor. São estes gradientes de O₂ que determinam a presença de condições anóxicas ou aeróbias definindo zonas com comunidades diferentes. Assim, por razões de limitações difusionais do oxigénio, o interior dos flocos são as zonas onde preferencialmente se dá a desnitrificação (Third *et al.*, 2003a).

Nos sistemas de tratamento de águas residuais em SBR os microrganismos estão sujeitos alternadamente a períodos sucessivos de condições aeróbias e anóxicas. Em condições aeróbias o oxigénio está presente como aceitador de electrões permitindo o desenvolvimento dos processos de oxidação heterotrófica (desde que haja carbono disponível) e de nitrificação (desde que haja amónio disponível). Em condições anóxicas, o nitrato é o aceitador de electrões e o substrato é consumido no processo de desnitrificação. A optimização das condições dinâmicas do reactor e da relação entre tempos de processo aeróbio e anóxico permite projectar um sistema de tratamento de águas residuais eficiente, com remoção de carbono e de azoto.

1.4 O PROCESSO DE TRATAMENTO BIOLÓGICO CONVENCIONAL

Os primeiros sistemas de tratamento biológico de águas residuais domésticas por lamas activadas datam de 1914 e consistiam em simples tanques de arejamento que permitiam a remoção de alguma matéria orgânica (Wilderer et al. 2001). Devido à pouca tecnologia automatizada existente na época, o processo de lamas activadas evoluiu rapidamente para um processo continuamente arejado e de alimentação contínua (Demoulin et al. 2001).

Hoje em dia, os sistemas convencionais de tratamento biológico para a remoção de carbono e de azoto são constituídos por um tanque anóxico, um tanque de arejamento e um sedimentador como se ilustra na figura 1.2.

No tanque anóxico, o aceitador final de electrões é o nitrato onde o processo de desnitrificação é predominante. O nitrato presente é transformado em azoto molecular com algum consumo de matéria orgânica. No tanque arejado o oxigénio é o aceitador final de electrões no processo de crescimento de biomassa heterotrófica, que constitui a principal contribuição no consumo de matéria orgânica. Neste tanque também ocorre o processo de nitrificação, com a conseqüente oxidação de amónio. O nitrato resultante é parcialmente recirculado para o tanque anóxico de modo a garantir a sua redução a azoto molecular por desnitrificação.

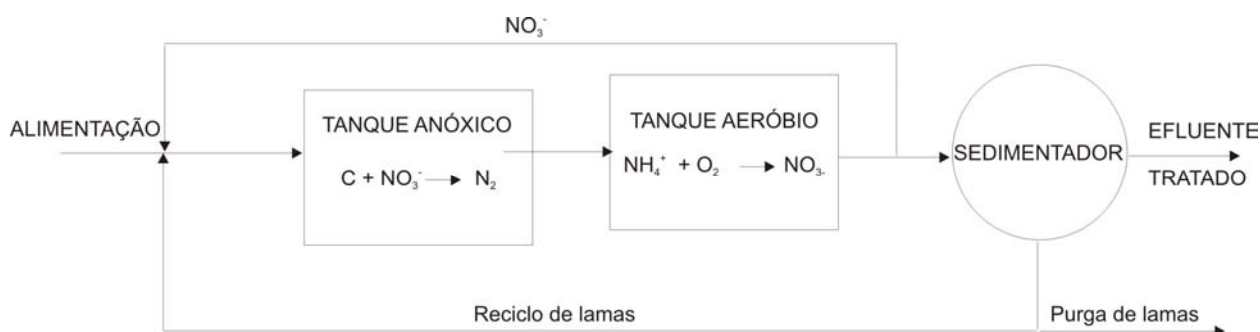


Figura 1.2 – Sistema convencional de tratamento biológico com remoção de carbono e de azoto.

O principal problema com os sistemas de remoção de azoto é, de uma forma geral, o facto das bactérias heterotróficas aeróbias serem muito mais eficientes no consumo de oxigénio que as bactérias autotróficas. Por outro lado, consomem em condições aeróbias a maioria do carbono orgânico disponível, prejudicando a desnitrificação (Villaverde, 2004). Este problema tem sido resolvido nas instalações á escala real recirculando o efluente contendo nitrato para a zona de entrada do reactor onde existe carbono orgânico ou

adicionando uma fonte de carbono para promover a desnitrificação no final do processo (Villaverde, 2004). Ambas estas soluções envolvem grandes gastos energéticos de bombagem, de fornecimento de oxigénio em excesso para garantir a nitrificação completa e uma fonte externa de carbono. Nesse sentido, várias estratégias têm sido desenvolvidas para reduzir os custos energéticos e de operação dos sistemas biológicos de remoção de carbono orgânico e de azoto.

Em alguns casos, são necessários dois tanques anóxicos e dois tanques de arejamento intercalados para garantir a eficácia do tratamento de remoção de azoto: no primeiro tanque anóxico a taxa de desnitrificação é relativamente elevada porque as bactérias usam o carbono facilmente biodegradável como dador de electrões. No primeiro tanque de arejamento, a matéria orgânica é oxidada e o amónio é nitrificado. No segundo tanque anóxico consegue-se desnitrificar mais algum nitrato, mas a taxa de desnitrificação é mais baixa porque o carbono disponível já é muito baixo. Pode ser necessário a adição de uma fonte externa de carbono como por exemplo o metanol. O segundo tanque de arejamento tem por função o *stripping* do azoto produzido no segundo tanque anóxico e a adição de oxigénio antes da passagem para o sedimentador, para evitar a depleção do oxigénio no meio receptor (Grady *et al.*, 1999).

Os sistemas com uma zona anóxica permitem obter efluentes com 4 a 11 mg/l de azoto total. Sistemas com duas zonas anóxicas são usados para reduzir a concentração de azoto total no efluente de 1 a 3 mg/l (Reddy *et al.*, 1998).

Inicialmente deve ser estabelecida uma população de microrganismos nitrificantes para a oxidação do amónio a nitrato. O pH deve ser mantido entre 6.5 e 8.0 no tanque de arejamento de forma a evitar a inibição da nitrificação (Reddy *et al.*, 1998).

1.5 O REACTOR SEQUENCIAL DESCONTÍNUO - SBR

O Reactor Sequencial Descontínuo opera numa sequência de etapas cíclicas levadas a cabo num único reactor ou em vários reactores a operar em paralelo. Os processos de reacção biológica e de sedimentação dão-se no mesmo reactor. O volume total do reactor V_T consiste num volume estacionário V_E e num volume V_A que é fornecido e descarregado em cada ciclo. A razão V_E/V_A é comparável em termos processuais à razão de reciclo num sistema contínuo de lamas activadas. O processo é cíclico e constituído por diversas fases, ilustradas na figura 1.3: o enchimento, a reacção, a sedimentação, a descarga e o repouso. Cada uma das fases tem duração própria, e uma função específica no tratamento biológico.

Na fase de enchimento, o reactor que contém as lamas sedimentadas e remanescentes do ciclo anterior é alimentado com efluente a tratar. Esta fase pode ser estática, agitada, ou arejada. A primeira permite a acumulação de substrato na zona próxima da entrada do reactor. A segunda faculta a homogeneização do conteúdo do reactor. Estes dois tipos de alimentação promovem o desenvolvimento de reacções anóxicas e anaeróbias uma vez que não é fornecido oxigénio. A fase de enchimento arejada promove as reacções aeróbias e permite a homogeneização do conteúdo do reactor devido à circulação das bolhas de ar no seio da fase líquida.

A duração da fase de enchimento (t_A) pode variar entre uma pequena fracção do tempo total do ciclo (t_C), e todo o tempo de reacção ou até ter a duração da totalidade do ciclo. Dependendo da razão t_A/t_C a operação do SBR pode ser comparada do ponto de vista hidrodinâmico a um reactor de regime pistão ou de regime completamente agitado (Wilderer *et al.*, 1997).

Durante o enchimento, enquanto existe excesso de carbono no reactor considera-se que este opera em regime de “abundância” de carbono. Quando se suspende a alimentação, o carbono é todo consumido e os microrganismos entram em regime de “escassez”. A alternância entre o regime de “escassez” e de “abundância” é conseguida na prática com elevadas cargas orgânicas no reactor durante curtos tempos de enchimento. Quanto menor for o tempo de enchimento, mais pronunciada se torna a alternância das condições de “abundância” e de “escassez” durante um ciclo. Tais condições transientes demonstraram favorecer o crescimento de bactérias formadoras de flocos em detrimento das filamentosas (Irvine *et al.*, 1997, McSwain *et al.*, 2004). No entanto, tempos curtos de enchimento implicam elevado número de reactores ou grandes volumes de equalização.

A fase de reacção é a fase onde se dá o processo biológico propriamente dito, que pode ocorrer em condições aeróbias, anaeróbias ou anóxicas. Durante a fase de reacção aeróbia, o oxigénio é o aceitador de electrões nos processos de crescimento de biomassa heterotrófica e de oxidação de amónio por nitrificação. Na ausência de oxigénio, o nitrato passa a ser o aceitador final de electrões da reacção de desnitrificação, que ocorre preferencialmente no interior dos flocos de biomassa.

O controlo dos parâmetros da fase de reacção é fundamental para o processo de tratamento biológico, nomeadamente o pH, a temperatura, a concentração de oxigénio, a agitação, entre outros. Os períodos arejados e anóxicos devem ter uma duração tal que garantam elevados rendimentos de remoção de nutrientes durante o menor tempo possível, e com o maior volume tratado.

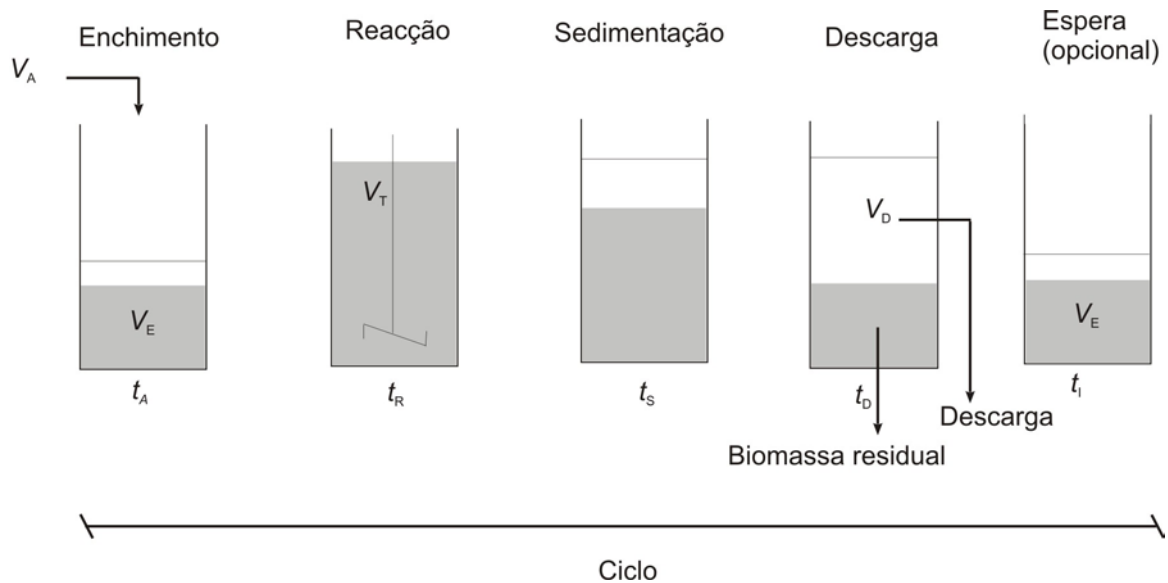


Figura 1.3 – As diferentes fases de um ciclo de um reator sequencial descontínuo.

A **fase de sedimentação** permite a separação das lamas por gravidade com vista à obtenção de um efluente final clarificado.

Durante a **fase de descarga** descarrega-se um volume V_D de efluente tratado. Juntamente com o efluente também é rejeitado uma determinada quantidade constante de lamas em cada ciclo. Esta quantidade determina o tempo de residência das lamas ou tempo de residência celular (*TRC*). Este parâmetro relaciona a biomassa no interior do reator com a biomassa que é rejeitada em cada ciclo. Em reactores sequenciais descontínuos que contenham biomassa aderida, o tempo de residência das lamas é elevado porque o biofilme não é descarregado ao fim de cada ciclo, e só é rejeitado com a biomassa em suspensão quando se desprende do seu suporte.

O reator entra em **fase de repouso** até que se reinicie um novo ciclo. A fase de repouso não constitui parte funcional do ciclo. É usada como uma margem de segurança para corrigir algumas incertezas no projecto. Está concebida como um tempo de reserva que pode ser adicionada a outra fase em caso de necessidade.

O tempo total do ciclo t_C corresponde à soma da duração de cada uma das fases.

$$t_C = t_A + t_R + t_S + t_D + t_I \dots\dots\dots \text{(eq. 1.17)}$$

Normalmente, os reactores sequenciais descontínuos compreendem múltiplas fases de enchimento e de reacção durante um ciclo, com períodos sucessivos de arejamento e de agitação anaeróbia ou anóxica. Durante as fases de sedimentação, descarga e de repouso, não se considera a ocorrência de conversões biológicas, pelo que o processo de remoção de carbono e nutrientes dá-se durante um intervalo de tempo t_p que corresponde à soma

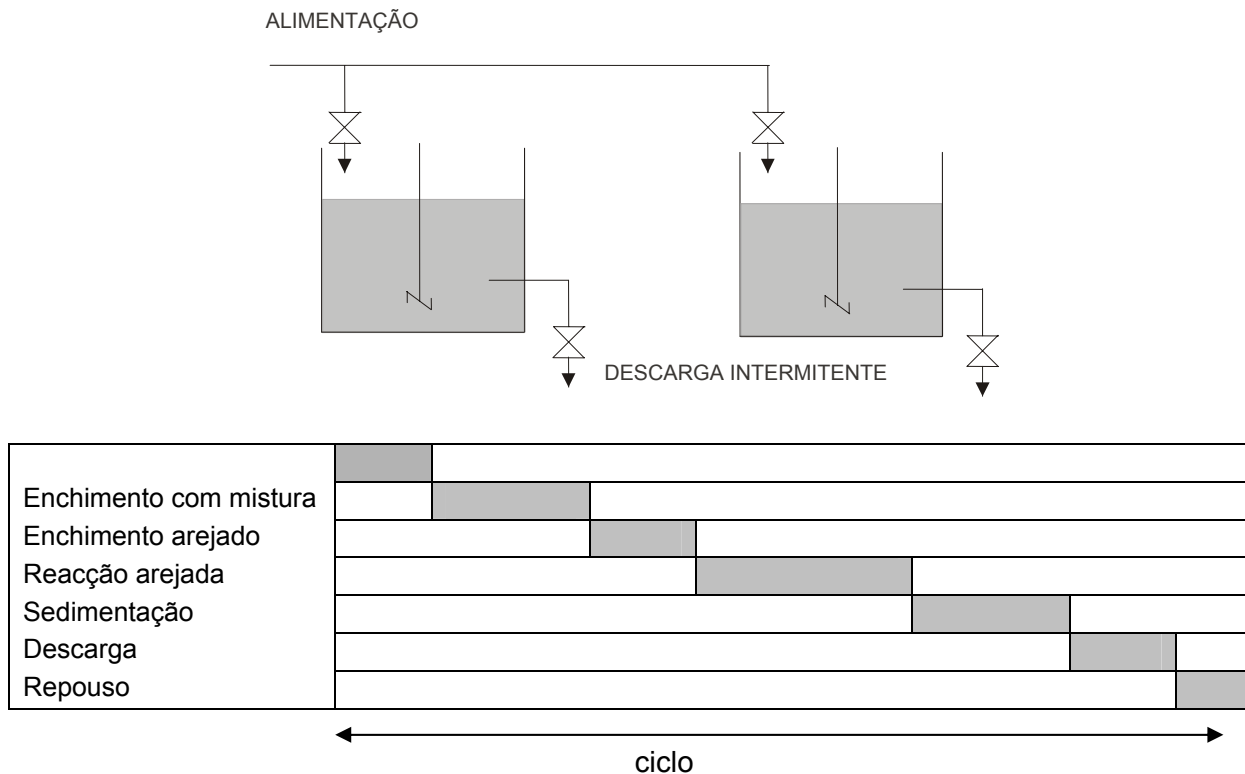
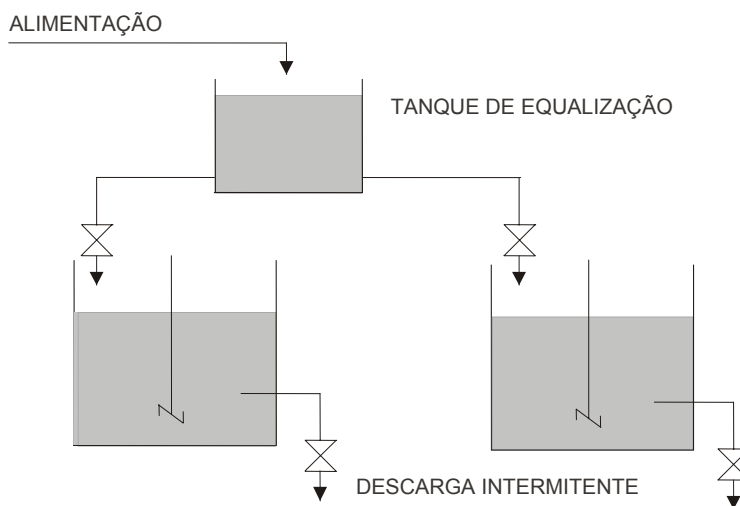


Figura 1.4 – Representação esquemática de um sistema de SBR com alimentação descontínua constituída por 3 tipos de enchimento (com agitação, estático e arejado). O ciclo inclui também as fases de reacção, sedimentação, descarga e repouso.

A figura 1.5 ilustra um sistema com um tanque de equalização a montante da alimentação a dois SBR. Esta configuração permite operar o sistema com estratégias de enchimento variável, incluindo o enchimento por impulso ou enchimento prolongado. O enchimento por impulso é equivalente a ter uma fase de enchimento estático ou um selector. Em ambos os casos o resultado é uma elevada concentração de substrato que por sua vez permite obter condições de “abundância”. Neste sistema dispensa-se a fase de repouso, uma vez que o tanque de equalização garante o controlo das flutuações de caudal. À semelhança do sistema anterior, o enchimento agitado é usado em sistema de remoção biológica de azoto. Durante as fases de reacção arejada, sedimentação e repouso não há alimentação de influente.

Outra configuração de SBR possível é aquela que inclui selectores, como se ilustra na figura 1.6. Neste tipo de sistema, a alimentação é interrompida apenas durante as fases de sedimentação e de descarga, não existindo nenhuma fase de reacção propriamente dita. À semelhança dos sistemas de lamas activadas, existe um reciclo das lamas do reactor para o selector. A capacidade do selector é determinada pela estratégia de enchimento de forma a proteger o sistema do crescimento de microrganismos filamentosos. Durante o enchimento, o sistema de arejamento pode estar ligado ou desligado. Habitualmente está

desligado no início do processo e durante cerca de 50% do tempo de enchimento. A razão dos tempos de arejamento ligado e desligado é determinada pela carga orgânica e pela necessidade de remoção de azoto. Esta configuração é a ideal para baixos quantitativos de influente, uma vez que é constituída por apenas um reactor, em que o selector tem também algum efeito de equalização.



Enchimento com mistura				
Reacção arejado				
Sedimentação				
Descarga				

← ciclo →

Figura 1.5 – Representação esquemática de um sistema de SBR com tanque de equalização, alimentação com mistura, fase de reacção arejada, sedimentação e descarga. O tanque de equalização substitui a fase de repouso.

Existem ainda sistemas caracterizados por uma alimentação contínua como se descreve na figura 1.7. Estes SBRs podem operar com um único tanque ou com vários tanques em paralelo. Logo que o nível da fase líquida atinja um pré-determinado valor máximo, os arejadores e agitadores são desligados e a biomassa em suspensão inicia a sedimentação, e seguidamente o sobrenadante é descarregado do reactor. Para minimizar a mistura do efluente tratado com o influente a tratar durante a fase de descarga, o reactor é dividido em duas zonas por um separador. A primeira parte previne a mistura e funciona como um selector. Contrariamente aos outros sistemas antes descritos, a fase de enchimento estático ocorre no final do ciclo.

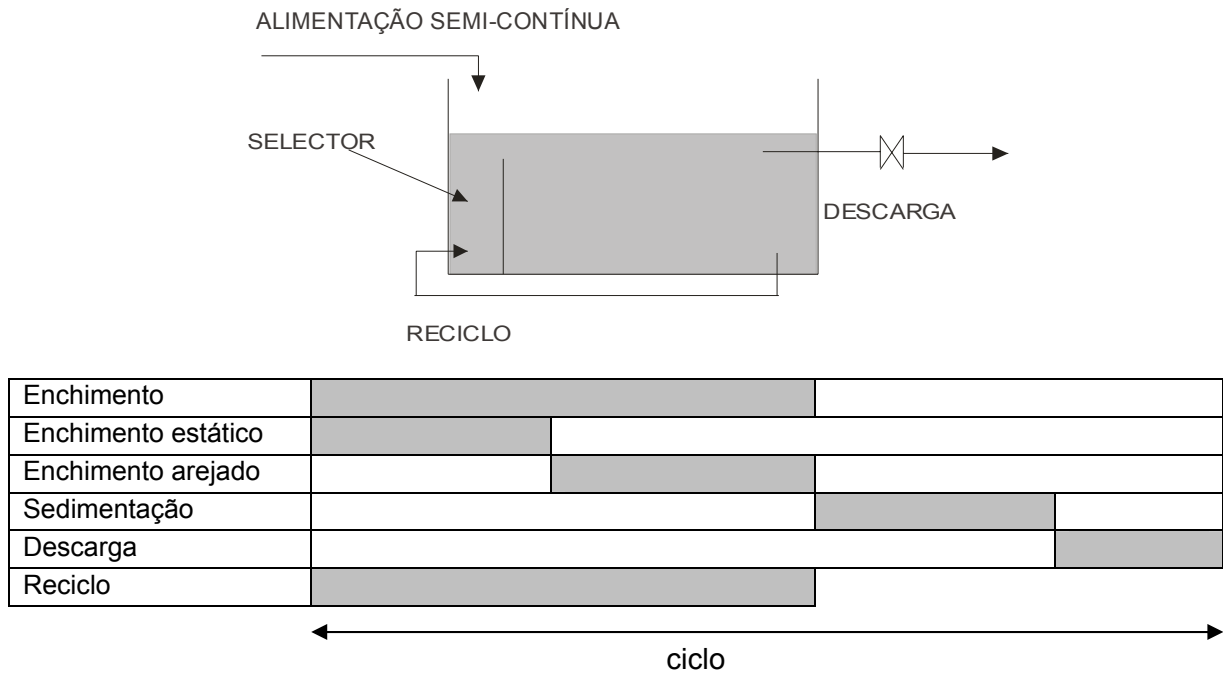


Figura 1.6 – Representação esquemática de um sistema de SBR com alimentação estática e arejada, interrompida apenas durante as fases de sedimentação e descarga. O ciclo inclui reciclo, selector, sedimentação, descarga e não tem fase de reacção e nem fase de repouso.

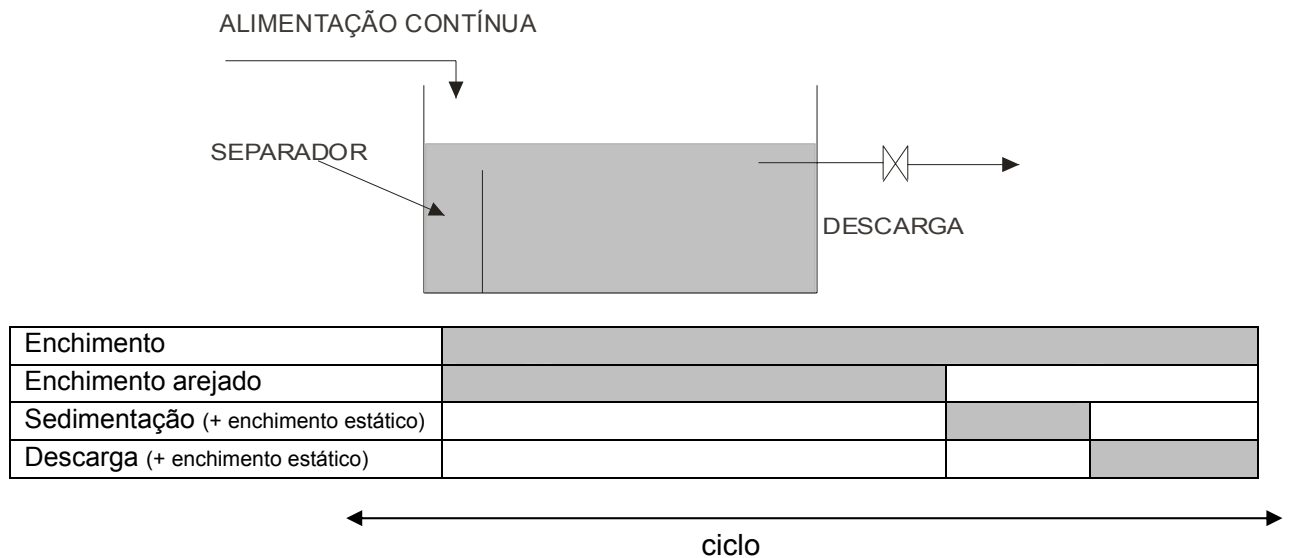


Figura 1.7 – Representação esquemática de um sistema de SBR com enchimento contínuo, arejado e agitado, sedimentação e descarga. O separador na zona de alimentação previne a mistura do efluente tratado com o influente a tratar.

Várias outras configurações são possíveis, resultantes de combinações das diversas fases. Os equipamentos e influente existentes, os objectivos pretendidos e as condicionantes financeiras são factores determinantes na definição da configuração do SBR a implementar.

1.6 O REACTOR SEQUENCIAL DESCONTÍNUO DE BIOFILMES (SBBR)

Os processos biológicos onde co-existem biomassa em suspensão e biomassa aderida a suportes sólidos são denominados sistemas híbridos (Christensson and Welander, 2004). O reactor sequencial descontínuo de biofilmes (SBBR) é um sistema híbrido, constituído por um SBR com enchimento sólido (os suportes). Nas interfaces sólido-líquido dos suportes crescem microrganismos aderidos formando-se películas de biomassa designadas por biofilmes.

1.6.1 O biofilme

Os biofilmes são normalmente constituídos por uma grande diversidade de microrganismos, apresentando por isso considerável heterogeneidade relativamente aos seus microambientes físico-químicos. A distribuição espacial das espécies no biofilme é condicionada pelas características da fase líquida do reactor. A competição entre microrganismos nitrificantes e heterotróficos origina uma estratificação das espécies no biofilme. Okabe e os seus colaboradores (1996) estudaram a distribuição espacial microbiana em biofilmes formados em reactores de biodiscos, tendo verificado que os biofilmes estão estratificados verticalmente e que a razão C/N é um factor importante na distribuição de bactérias nitrificantes e heterotróficas: na ausência de carbono (C/N=0) heterotróficas e nitrificantes coexistem nas camadas externas do biofilme. À medida que a concentração de carbono aumenta (C/N=1.5) as bactérias heterotróficas competem pelo espaço e pelo oxigénio com as nitrificantes e por isso, as camadas externas do biofilme são constituídas essencialmente por heterotróficas, sendo as camadas mais profundas dominadas por bactérias nitrificantes. Um aumento do valor da razão C/N no influente resulta numa maior espessura da camada externa do biofilme constituída por bactérias heterotróficas. As limitações difusionais daí decorrentes que impedem a penetração de oxigénio nas camadas internas do biofilme, originam uma maior estratificação das espécies microbianas, e em alguns casos a inibição da nitrificação (Okabe *et al.*, 1996).

Os problemas resultantes da formação da camada heterotrófica de biofilme podem ser evitados com o crescimento em suspensão destas bactérias. Este processo tem algumas vantagens tanto para bactérias nitrificantes como para heterotróficas (van Benthum *et al.*, 1997):

- As bactérias nitrificantes não ficam limitadas pela transferência de massa do oxigénio no biofilme;

- Os microrganismos heterotróficos não ficam sujeitos às limitações de transporte de massa tendo por isso o acesso ao substrato facilitado;

- As bactérias nitrificantes não estão diluídas no biofilme: o crescimento de heterotróficas misturadas com nitrificantes leva à diluição das nitrificantes, especialmente devido á grande diferença de rendimento celular.

Baseados em trabalhos anteriores de Thijuis *et al.*, (1994), van Benthum *et al.*, (1997), estudaram a influência do tempo de retenção hidráulico (*TRH*) na dinâmica de populações do biofilme formado num reactor do tipo “*airlift*”. Verificaram que este parâmetro é fundamental na formação de biofilme nitrificante e de biomassa heterotrófica em suspensão: quando o *TRH* é inferior ao recíproco da taxa máxima específica de crescimento das bactérias heterotróficas, forma-se biofilme heterotrófico; enquanto que para valores de *TRH* superiores ao recíproco da taxa máxima específica de crescimento, o crescimento heterotrófico efectua-se preferencialmente em suspensão sob a forma de flocos, ficando o biofilme essencialmente constituído por bactérias nitrificantes.

Os SBBRs apresentam elevados tempos de retenção celulares uma vez que a biomassa aderida ao suporte não é rejeitada em cada ciclo. Assim, é possível manter elevadas concentrações de biomassa nitrificante, independentemente das características de sedimentação da biomassa em suspensão e das cargas hidráulicas do reactor. Em contrapartida, os tempos retenção da biomassa em suspensão podem ser mantidos mais pequenos, permitindo a remoção de azoto em volumes menores que para sistemas de lamas activadas. Curtos tempos de retenção originam também elevada actividade carbonácea específica com a vantagem de evitar o crescimento de bactérias filamentosas que crescem em tempos de retenção de lamas maiores (Christensson and Welander, 2004).

1.6.2 Os suportes

Apesar do processo híbrido ser conhecido há já alguns anos, poucas são as instalações implementadas em grande escala. A maioria das instalações que funcionam com esta metodologia usam suportes fixos tais como blocos com tubos verticais de diferentes formas, cordas com anéis de plástico, discos rotativos ou placas de PVC (Christensson *et al.*, 2004). Os suportes móveis tais como partículas de gesso ou antracite, pequenos cilindros ocos de plástico ou cubos de esponja apresentam uma elevada área superficial específica, e por isso constituem uma vantagem para o crescimento de biofilmes. Um suporte deve apresentar as seguintes características:

- ter elevada área superficial: a capacidade de nitrificação de um sistema híbrido é extremamente dependente da área superficial do suporte. Quanto maior for a área superficial, maior é a actividade de nitrificação (Christensson and Welander, 2004). Suportes constituídos por pequenas partículas suspensas permitem áreas superficiais de $2000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ a $4000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ de volume de reactor (van Loosdrecht *et al.*, 2000);

- ser resistente à abrasão devido à movimentação constante e ao contacto entre as peças dentro do reactor;

- ser leve para facilitar a mistura estimulada pela circulação das peças por força dos difusores de oxigénio;

- permitir a formação de camadas finas de biofilme, minimizando assim as limitações difusionais para o oxigénio e o amónio que reduzem a actividade nitrificante.

Tipicamente, usam-se peças de cerca de 2 mm a 8 mm de diâmetro equivalente. Usam-se peças de menor dimensão quando o reactor é projectado apenas para o processo de nitrificação, uma vez que o rendimento das bactérias nitrificantes é muito baixo. Quando se pretende a remoção de carbono, juntamente com os processos de nitrificação e desnitrificação, recomendam-se peças de maior dimensão e maior tamanho de poros, para prevenir a colmatção dos suportes pelos flocos de biomassa heterotrófica (Wilderer *et al.*, 2001).

Commett *et al.*, (2004) estudaram vários tipos de suportes de biofilme para o tratamento de águas residuais contendo elevada concentração de contaminantes, como é o caso dos leixivados provenientes da digestão anaeróbia de resíduos sólidos. Os suportes estudados foram anéis de plástico de 10 mm de diâmetro por 7 mm de altura em polietileno de alta densidade (HPDE) designado por Kaldness[®], e pequenos cubos de esponja em poliuretano com 1.5 cm de aresta (Linpor[®]). Neste estudo verificou-se que os suportes de esponja Linpor[®] são constituídos por uma matriz que, apesar de ter menor área superficial específica, permitem maior concentração de microrganismos que os suportes de HPDE Kaldness[®]. Por este motivo, os ensaios desenvolvidos com os suportes Linpor[®] apresentaram maior percentagem de remoção de azoto (72 %) que com o Kaldness[®].

A selecção de um suporte depende dos objectivos do processo e da composição do influente a tratar, sendo necessário um estudo prévio do suporte e do seu comportamento relativamente ao crescimento de biofilme nas condições reais.

O SBBR é um sistema que permite elevadas taxas de remoção de carbono orgânico e de remoção de azoto dentro do mesmo reactor. Esta característica torna este processo numa solução economicamente atractiva em projectos de ampliação de sistemas de lamas

activadas convencionais para sistemas de remoção de nutrientes (Christensson and Welander, 2004).

1.7 RECENTES DESENVOLVIMENTOS EM PROCESSOS DE REMOÇÃO DE AZOTO

1.7.1 A nitrificação e desnitrificação simultânea – SND

A remoção total de azoto em tratamento de águas residuais é habitualmente efectuada em sistemas de dois estágios sendo por isso necessários dois tanques (ou sequências intermitentes de arejamento) para permitir a ocorrência das condições de operação aeróbias e anóxicas. Estudos recentes (Yoo *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999; van Loosdrecht *et al.*, 2000; Pochana and Keller, 1999; Third *et al.*, 2003b, Zeng *et al.*, 2003) revelaram que estes dois processos podem ocorrer concorrentemente no mesmo reactor com biomassa suspensa, desde que controladas as condições de operação.

Em sistemas contínuos, a nitrificação e desnitrificação simultânea (SND) é um processo interessante do ponto de vista de custos de equipamento uma vez que elimina a necessidade de um tanque anóxico. Se as taxas de nitrificação e de desnitrificação forem semelhantes em sistemas separados, é possível reduzir o sistema a um único tanque de arejamento, desde que alguns factores determinantes sejam controlados, nomeadamente o fornecimento de carbono, a concentração de oxigénio dissolvido e o tamanho dos flocos.

A concentração de oxigénio dissolvido presente no sistema é um factor fundamental no processo de SND. A desnitrificação tem eficácia máxima com valores nulos de oxigénio, e vai diminuindo quando a concentração de oxigénio é superior a 0.2 mg/l. Por outro lado, estas concentrações de oxigénio são impeditivas para a ocorrência de nitrificação. Apesar disso, verificou-se que concentrações de oxigénio dissolvido de 0.5 mg/l permitiram taxas de nitrificação iguais às taxas de desnitrificação (Münch *et al.*, 1996).

O tamanho dos flocos é um factor físico determinante na eficácia da SND, uma vez que contribui para o aumento da taxa de desnitrificação. Devido às limitações difusionais do oxigénio nos flocos de biomassa, desenvolvem-se zonas anóxicas nas camadas interiores dos flocos criando-se condições para a ocorrência de desnitrificação. À medida que o tamanho dos flocos aumenta, estas zonas anóxicas tornam-se mais pronunciadas favorecendo a formação de azoto gasoso, que se liberta dos flocos sob a forma de bolhas de gás. Este fenómeno é bem visível nos ensaios onde se formam grandes agregados de flocos de biomassa. A figura 1.8 esquematiza a influência do tamanho do floco para a ocorrência de zonas anóxicas internas.

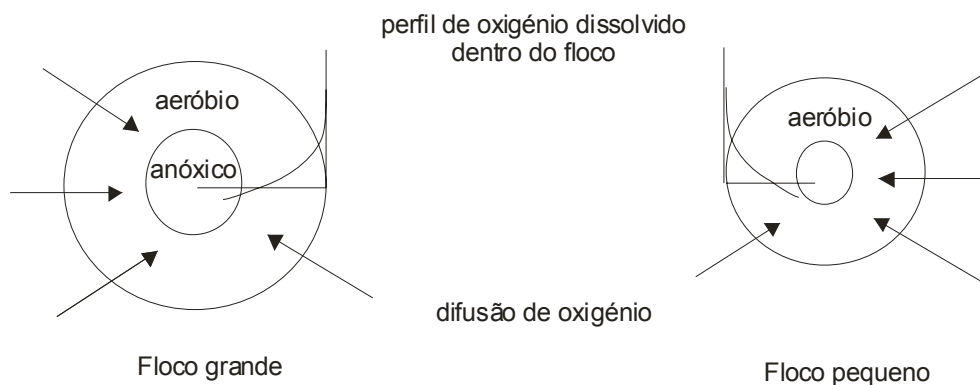


Figura 1.8 – Influência do tamanho dos flocos em condições aeróbias: formação de zonas aeróbias e anóxicas. (reprodução de Pochana e Keller, 1999).

1.7.2 A nitrificação via nitrito

Alguns autores referem que o processo de nitrificação-desnitrificação pode ser otimizado se a nitrificação for truncada na sua primeira fase (oxidação de amónio a nitrito) omitindo a fase de oxidação de nitrito a nitrato (Yoo *et al.*, 1999; van Loosdrecht *et al.*, 2000; Zeng, *et al.*, 2003). A remoção de azoto é assim obtida por oxidação parcial do amónio a nitrito que é reduzido directamente a azoto gasoso, sem passar pela formação de nitrato. Este processo denominado nitrificação via nitrito permite reduzir em cerca de 40 % as necessidades em carbono, e em cerca de 25 % as de oxigênio, comparado com a nitrificação convencional via nitrato (Van Loosdrecht *et al.*, 2000), e também reduzir em 30 % a 40 % o volume do reactor (Villaverde, 2004).

Para conseguir truncar a nitrificação ao nível do nitrito, as condições de processo devem ser tais que impeçam o desenvolvimento das bactérias oxidantes do nitrito. Foram já propostas várias técnicas de inibição selectiva tais como o uso de pH desfavorável (Anthonisen *et al.*, 1976) ou de concentrações inibidoras de amónio ou de nitrito (Turk *et al.*, 1989), mas ambas revelaram ser ineficientes na obtenção de conversões estáveis de nitrito. Ironicamente, os episódios de acumulação de nitrito, até então indesejados nos processos de lamas activadas convencionais e relacionados com deficiências operatórias ou toxicidade das lamas (Anthonisen *et al.*, 1976; Balmelle *et al.*, 1992; Thomsen *et al.*, 1994; Weon *et al.*, 2002), passaram a ser objecto de estudo com o objectivo de os prolongar por grandes períodos de tempo.

Recentemente um grupo de investigação da Universidade Técnica de Delft na Holanda desenvolveu um novo processo capaz de nitrificar parcialmente águas residuais e produzir quantidades consideráveis de nitrito (Hellinga *et al.*, 1998). Este processo consiste

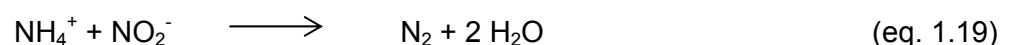
em manter a temperatura elevada, entre 30 °C e 35 °C, tirando partido do facto de que as bactérias oxidantes do amónio são mais activas (crescem mais rapidamente) que a população oxidante do nitrito. Desta forma, num reactor com tempos de retenção baixos, sem recirculação de biomassa, as bactérias oxidantes de nitrito não têm tempo suficiente para converter o nitrito a nitrato. O processo requer menor quantidade de oxigénio que a nitrificação via nitrato. O passo seguinte de desnitrificação do nitrito consome menos carbono uma vez que apenas o nitrito é convertido a azoto sem passar pela forma de nitrato (Schmidt *et al.*, 2003). Este processo, denominado SHARON (Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite), é economicamente vantajoso para tratar influentes com baixas razões C/N e que necessitam da adição de uma fonte externa de carbono, como por exemplo o metanol.

Como o processo SHARON depende de temperaturas elevadas, não é adequado para o tratamento de todas as águas residuais: deve ser utilizado com águas com elevado teor de amónio e temperaturas altas, tais como os licores provenientes da digestão de lamas (Schmidt *et al.*, 2003).

O processo SHARON foi implementado pela primeira vez à escala real em 2001 e instalado na ETAR de Roterdão na Holanda, para tratamento de licores de lamas pela empresa Paques B. V. num reactor com um volume de 1500 m³ e uma capacidade de tratamento de 1000 kg/dia, a montante de um sistema de desnitrificação (Mulder *et al.*, 2001).

1.7.3 O processo Anammox

Estudos recentes revelaram que para além dos processos convencionais de nitrificação autotrófica e de desnitrificação heterotrófica existe ainda uma outra conversão de azoto chamada de processo ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXidation) e que consiste na oxidação anaeróbia do amónio (Jetten *et al.*, 1999). Neste processo o amónio é oxidado a azoto gasoso com o nitrito a servir de aceitador de electrões. A reacção geral é exotérmica sendo o processo bioquímico capaz de fornecer energia para crescimento biológico. A equação 1.19 descreve a reacção geral:



As bactérias capazes de desencadear o processo Anammox são planctomicetes descobertos recentemente, do tipo *Candidatus Brocadia Anammoxidans* e *Candidatus Kueneia Stuttgartiensis* (Jetten *et al.*, 2002).

O processo Anammox é um processo biológico autotrófico e estritamente anaeróbio (Strous *et al.*, 1997, Jetten *et al.*, 1999) e conseqüentemente incapaz de converter amónio em nitrito. Sendo assim, o processo Anammox requer um passo anterior de nitrificação parcial, que converte em nitrito parte do amónio presente no influente. Este nitrito pode ser produzido por pelo processo SHARON a montante do tanque Anammox, convertendo cerca de 50% do amónio influente em nitrito (Villaverde, 2004). O processo Sharon-Anammox foi desenvolvido e patenteado por van Loosdrecht e Jetten (1997) e desde aí foi objecto de vários estudos (Jetten *et al.*, 2002, van Dongen *et al.*, 2001, Villaverde *et al.*, 2000). O primeiro *scale-up* do processo Anammox foi implementado em 2003 na ETAR de Roterdão em série com um reactor Sharon existente para tratar efluentes de elevada carga de azoto, tal como os lexiviados de lamas. Prevê-se um retorno do investimento do reactor de menos de 7 anos, uma vez que a adição de metanol (usada para garantir o processo de desnitrificação) deixa de ser necessária (Schmidt *et al.*, 2003).

1.7.4 O processo CANON

Em sistemas com biofilmes a forma mais realística de parar a nitrificação ao nível do nitrito é tirar partido da diferença de afinidade pelo oxigénio entre as bactérias oxidantes do amónio e as bactérias oxidantes do nitrito. Estas têm menor afinidade pelo oxigénio que as primeiras. O gradiente difusional que ocorre nos biofilmes acentua o efeito de menor afinidade pelo oxigénio do processo de oxidação de nitrito, porque a concentração de oxigénio nas camadas interiores onde reside a biomassa nitrificante torna-se menor. Vários estudos permitiram verificar que é possível obter conversões estáveis de amónio a nitrito mantendo a concentração de oxigénio em níveis baixos, e promovendo simultaneamente condições para a ocorrência de desnitrificação do nitrito formado. (van Loosdrecht *et al.*, 2000). Jetten *et al.*, (1997) propuseram um processo combinado de nitrificação parcial e do processo Anammox num único reactor compacto de biofilmes para tratamento de águas com baixas cargas de amónio. O processo foi baptizado de CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite) e permite obter acumulação de nitrito dentro do biofilme por nitrificação parcial. A baixas concentrações de oxigénio dissolvido (1 a 2 mg/l) observou-se uma acumulação estável de nitrito num reactor airlift de biofilme suspenso (Garrido *et al.*, 1997).

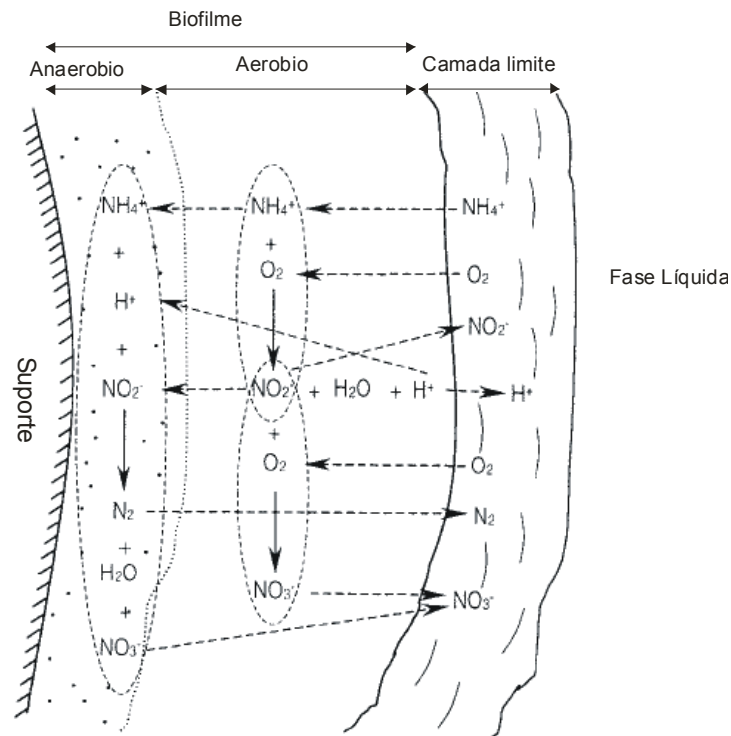


Figura 1.9 – Esquema das reacções que ocorrem no biofilme num processo CANON. As setas tracejadas representam fluxos e as setas a cheio representam as reacções (reprodução de Hao *et al.*, 2002).

A figura 1.9 representa esquematicamente os fluxos de compostos no interior do biofilme. O amónio é parcialmente convertido a nitrito na camada externa do biofilme, que ainda contém algum oxigénio, mas que não é suficiente para permitir às bactérias oxidantes de nitrito de produzir nitrato. O nitrito formado é então continuamente consumido nas partes internas do biofilme, constituído essencialmente por biomassa anammox, que convertem o amónio a azoto, usando o nitrito com aceitador de electrões (Hao *et al.*, 2002). O processo CANON constitui assim uma alternativa ao processo Sharon-Anammox economicamente vantajosa, uma vez que permite a remoção de amónio num único reactor, apesar de apresentar eficiência de remoção de azoto inferior (Schmidt *et al.*, 2003). Este sistema exige no entanto um rigoroso controlo da concentração de oxigénio, para garantir a nitrificação parcial e evitar o envenenamento da biomassa anammox por nitrito, devido a excesso de oxigénio (Nielsen *et al.*, 2005).

1.7.5 Processos de arejamento de elevada frequência (HFO)

Vários estudos foram publicados no sentido de reduzir o fornecimento de oxigénio. Hao e Huang (1996) desenvolveram um reactor em que o fornecimento de oxigénio era

baseado na leitura em tempo real do potencial redox. Quando as leituras do potencial redox indicavam que todo o nitrato era consumido (desnitrificação completa), iniciava-se o fornecimento de oxigénio e era desligado quando as leituras de potencial redox indicassem um valor elevado de nitrato (nitrificação completa). Este sistema revelou-se no entanto pouco promissor na obtenção de elevadas taxas de remoção de azoto porque exigia tempos de retenção elevados (Villaverde, 2004). Sasaki *et al.* (1993 e 1996) desenvolveram um novo sistema arejado intermitentemente, com capacidade para controlar a duração das fases aeróbia, anóxica e anaeróbia, usando a leitura do potencial redox para identificar o ponto de término da desnitrificação (ausência de nitrato).

O conceito de arejamento oscilante foi posteriormente desenvolvido pelo Prof. Rune Bakke da Universidade de Telemark na Noruega (Villaverde, 2004) para o tratamento de águas residuais urbanas de baixa carga. O processo ficou conhecido por Oscilação de Elevada Frequência (HFO) e consiste no fornecimento alternado de oxigénio num único reactor, com regulação do arejamento em função da concentração de oxigénio presente no reactor. Nestas condições, os microrganismos têm períodos muito curtos de condições óptimas, em vez de se encontrarem em compartimentos onde as condições são optimizadas.

Hornthvedt *et al.* (1998) estudaram a competição entre bactérias nitrificantes, desnitrificantes e aeróbias heterotróficas num reactor CSTR com reciclo de lamas e arejamento de elevada frequência. Estes autores verificaram neste estudo que o efeito sinusoidal na concentração de oxigénio dissolvido com uma amplitude de 1.0 mg/l era de redução da taxa específica de crescimento de cerca de 16 % nas bactérias nitrificantes e aeróbias heterotróficas, comparado com condições de concentração de oxigénio dissolvido constante. A taxa específica de crescimento das bactérias desnitrificantes aumentou de cerca de 59 % quando comparada com condições de concentração de oxigénio dissolvido constante. Foi testada uma estratégia semelhante á escala piloto, e concluiu-se que os efeitos são maiores quando a concentração de oxigénio dissolvido varia por volta da concentração de meia saturação do componente limitante.

Esta estratégia foi testada por Villaverde *et al.* (2000) num sistema convencional de lamas activadas para remoção de azoto de um efluente de elevada carga proveniente de um reactor anaeróbio do tipo UASB projectado para tratar as águas residuais resultantes de uma fábrica de amido de batata. O arejamento em ciclos curtos permitiu um uso mais eficiente do oxigénio para a nitrificação e do carbono orgânico (presente na água residual a tratar) para a desnitrificação, tendo obtido taxas de remoção de azoto de cerca de 66 %. Este tipo de operação demonstrou grandes vantagens em termos de custos de operação e simplicidade de implementação, quando o objectivo do tratamento é a remoção de azoto. A

maioria dos sistemas de lamas activadas existentes (reactores simples contínuos) poderia ser ampliada para remoção de azoto total praticamente sem custos, uma vez que o investimento exigido para instalar um sistema de controlo de arejamento seria rapidamente amortizado tendo em conta as conseqüentes reduções nos gastos energéticos (Villaverde, 2004).

Esta técnica também foi implementada em sistemas descontínuos: Demuynck *et al.*, (1994) estudou esta técnica num SBR para tratar um efluente com elevada carga de azoto. Villaverde *et al.* (2000) adaptou a tecnologia de um SBR convencional implementando a técnica de arejamento oscilante em águas residuais de elevada carga (cerca de 700 mg/l de azoto total e 2000 mg/l de CQO), tendo obtido taxas de remoção de azoto de 79 %.

1.8 OBJECTIVOS E ESTRUTURA DO PRESENTE ESTUDO

Pretende-se com este estudo conhecer, compreender e prever o comportamento de um reactor sequencial descontínuo de biofilmes para a remoção de carbono e azoto em águas residuais domésticas, com o objectivo de tornar viável a sua implementação na ampliação de sistemas de lamas activadas existentes.

Para o efeito estudaram-se as condições que optimizam a remoção de azoto num reactor sequencial descontínuo de biofilmes à escala laboratorial, variando alguns factores importantes do processo: o tipo de alimentação e o tempo de arejamento.

Comparam-se dois modos de operação:

- Um primeiro modo constituído por ciclos convencionais em reactores sequenciais descontínuos: uma fase de enchimento com agitação, uma fase de arejamento e uma fase de descarga;

- Um segundo modo com alimentação contínua e vários períodos de arejamento e de agitação num mesmo ciclo.

Em cada modo, relacionou-se a cinética de produção e consumo de polímeros de reserva com a eficiência de remoção de azoto, e avaliou-se o efeito do tipo de alimentação na eficiência do reactor.

Variaram-se os tempos de arejamento desde o mínimo fisicamente possível até um valor em excesso para estudar a mínima concentração de oxigénio que maximiza a remoção de azoto.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL

No presente estudo foi utilizado um reactor sequencial descontínuo de biofilmes (SBBR) à escala laboratorial cujas características estão descritas na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Características do reactor SBBR estudado.

Material	Acrílico
Dimensão (c · l · a), m	0.60 · 0.30 · 0.22
Volume total, V_T , l	21.8*
Volume estacionário, V_E , l	11.8*
Volume de descarga, V_D , l	10
Peças de suporte, aprox.	4207
Volume ocupado pelo suporte, l	6.2
Fracção de ocupação do suporte, %	34**
Temperatura de operação, ° C	21

* volume da fase líquida

** com reactor chelo

Na figura 2.1 apresenta-se a instalação experimental e respectivo esquema. Uma bomba peristáltica (2) garante a alimentação com caudal constante proveniente de um tanque de 100 l (1). A descarga do reactor efectua-se por uma segunda bomba peristáltica (5) a um caudal de 0.5 l/min, que inicia quando a fase líquida no reactor atinge um nível máximo correspondente ao volume total e desliga quando o nível da fase líquida corresponde ao volume mínimo (ou volume estacionário). Deste modo o volume descarregado em cada ciclo é de 10 l. A descarga é efectuada pela parte superior do tanque, de forma a minimizar a remoção de biomassa em suspensão.

Três sondas de nível (10), de referência, mínimo e máximo permitem as operações automáticas de enchimento e descarga.

O pH foi monitorizado com uma sonda de pH (7) modelo WTW pH526; a concentração de oxigénio foi monitorizado com um medidor de oxigénio dissolvido (8) da marca YSI modelo 5000.

O arejamento é efectuada a um caudal de 27 l/min por seis dispersores de ar comprimido colocados no fundo do reactor (4). O fornecimento de oxigénio tem duas funções no reactor: introduzir condições aeróbias e usar as bolhas de ar para a agitação do sistema. Este caudal permite uma mistura efectiva das peças de enchimento, como se pode

verificar na figura 2.2. Foi colocado um agitador junto ao tubo de entrada de alimentação no tanque para permitir a homogeneização do influente no reactor. A mistura com ar comprimido é preferível á mistura mecânica porque evita o desprendimento de biofilme das peças de suporte. Estudos anteriores com traçadores confirmaram que nestas condições o reactor exhibia características de mistura perfeita durante a fase de arejamento (Campos et al. 2000). A concentração de oxigénio no reactor é controlada pelo tempo de arejamento.

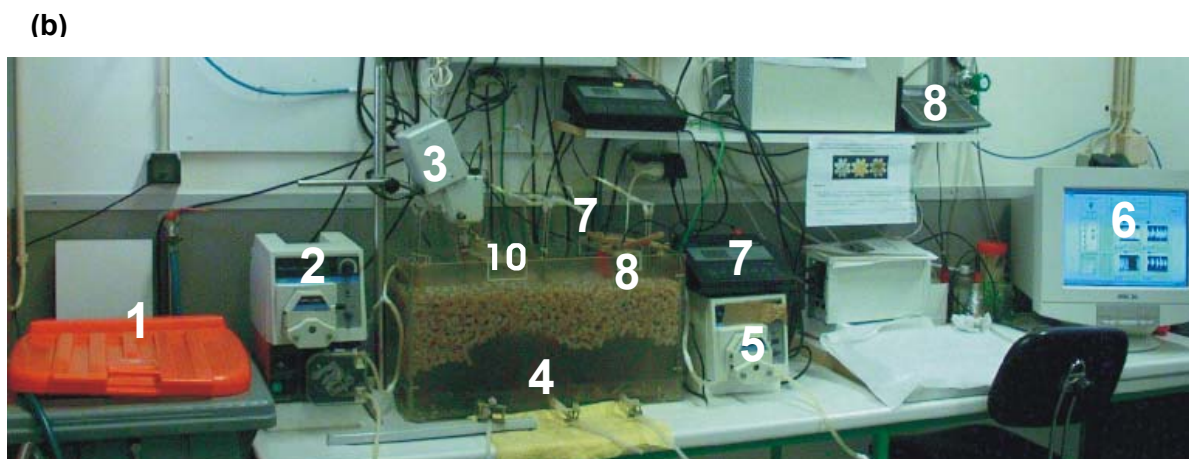
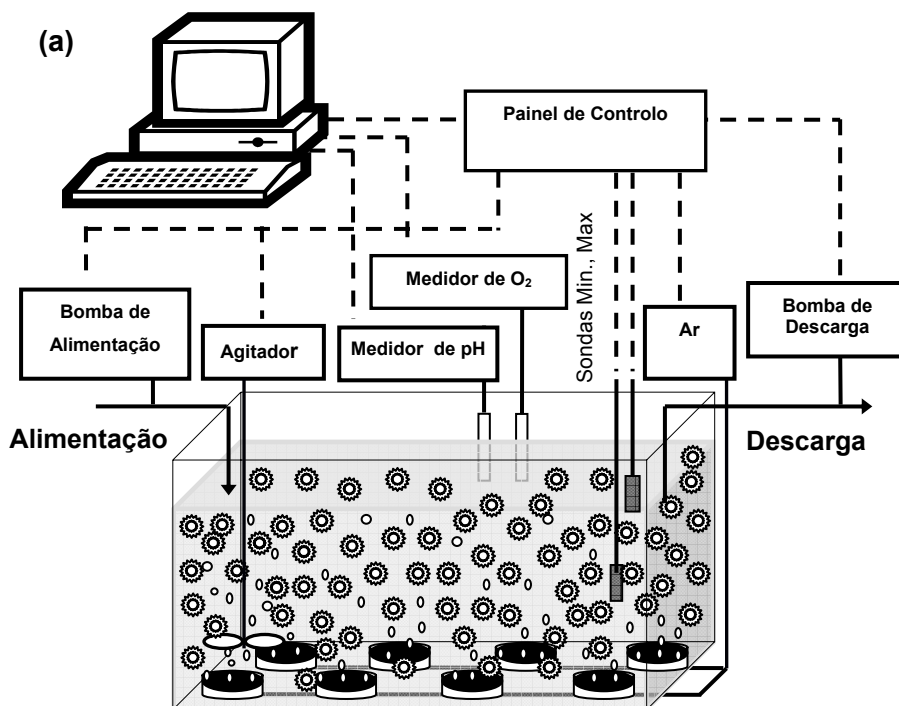


Figura 2.1 – Instalação experimental: (a) Esquema; (b) Foto - (1) tanque de alimentação; (2) bomba de alimentação; (3) agitador; (4) arejadores; (5) bomba de descarga; (6) controlo e aquisição de dados; (7) sonda e medidor de pH; (8) sonda e medidor de oxigênio.



Figura 2.2 – Os dispersores de ar comprimido permitem uma perfeita circulação das peças de enchimento.

A operação do reactor foi controlada por computador através de um sistema de controlo e aquisição de dados constituído por uma placa multifunção modelo PCI-6023E da National Instruments e com um programa implementado em software Labview da National Instruments (6). O programa permite a operação automática e temporizada do arejamento, da bomba de alimentação, do agitador e da bomba de descarga. Simultaneamente permite efectuar a leitura e gravar dados de temperatura, oxigénio e pH a intervalos pré-definidos. Os ciclos podem ser programados em quatro modos diferentes, conforme de descreve na figura 2.3. Os modos estudados foram os de alimentação descontínua (M1) e de alimentação contínua (M4).

No reactor foi colocado um enchimento constituído por peças de suporte em polietileno (PE), onde se pretende que cresça um biofilme formado por microrganismos capazes de remover a matéria orgânica e o azoto contido na alimentação do reactor.

2.2 SUPORTE

Utilizou-se um suporte designado por *DupUm*, desenvolvido pela empresa Dupermo, em colaboração com a Universidade do Minho. As características do suporte estão descritas na figura 2.4. Estudos anteriores desenvolvidos por Campos et al. (2000) com o objectivo de caracterizar o suporte em termos de propriedades superficiais e de formação de biofilme mostraram que este suporte tem características que favorecem a adesão inicial de microrganismos, assim como uma elevada capacidade de acumulação de biofilme, comparado com outros existentes.

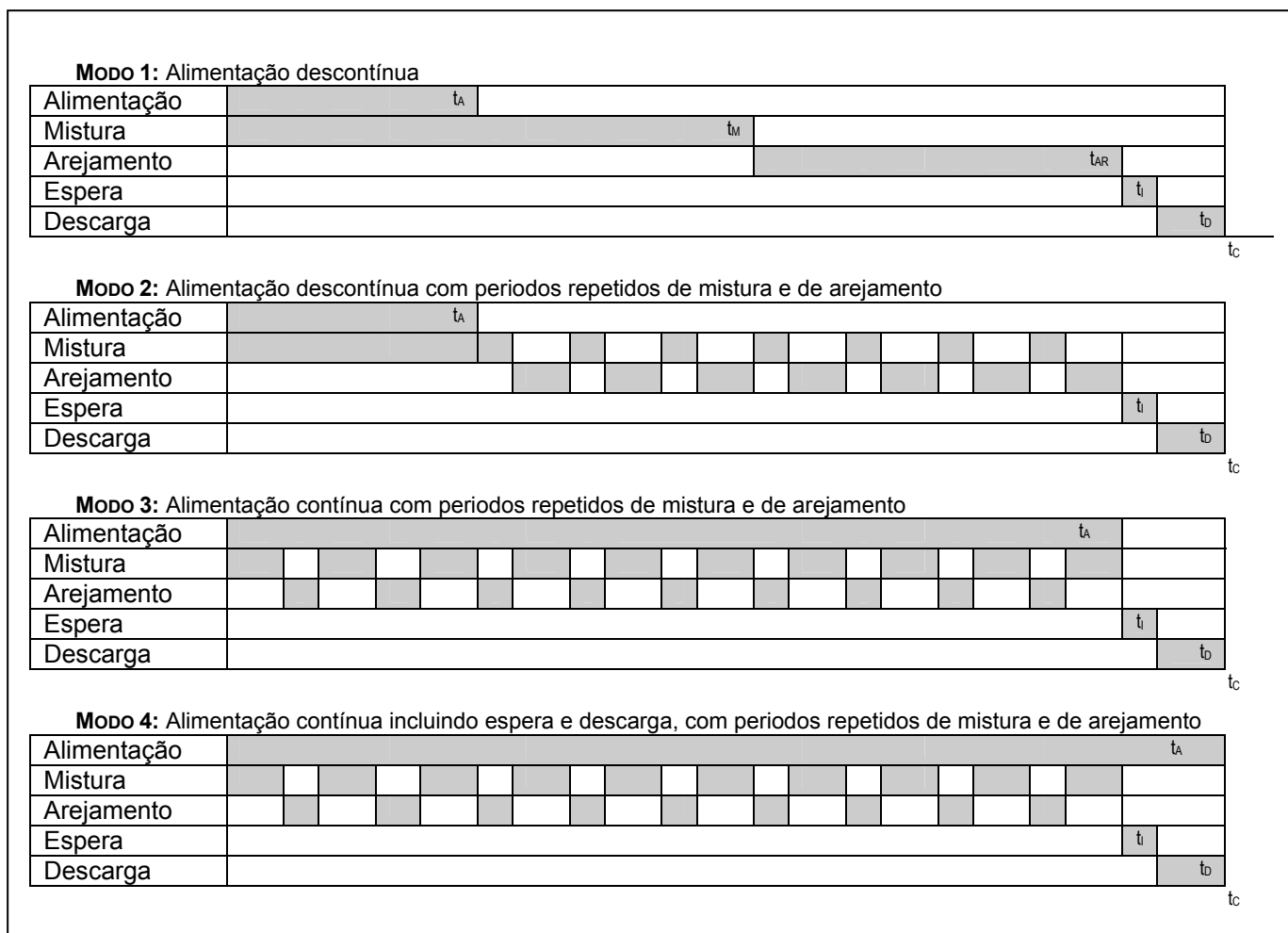


Figura 2.3 – Modos de operação permitidos pelos software de controlo e aquisição de dados.

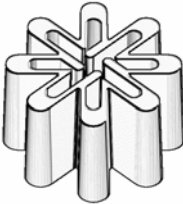
Material	Polietileno	
Área específica, m ² /m ³	407	
Altura, mm	10.0	
Diâmetro, mm	30.0	

Figura 2.4 – Características do suporte DupUM (Campos *et al.*, 2000).

2.3 ALIMENTAÇÃO E INÓCULO

O reactor foi alimentado com um meio sintético cuja fonte de carbono era o acetato. A composição da alimentação está descrita na tabela 2.2. A composição da alimentação manteve-se sempre constante, excepção feita aos ensaios de fortificação da biomassa autotrófica. Durante estes ensaios, retirou-se o carbono da alimentação e aumentou-se a concentração de bicarbonato de sódio, para evitar a redução de pH provocado pela reacção

de nitrificação. A solução de micronutrientes foi preparada segundo Vishniac e Santer (1957), conforme se descreve na tabela 2.3 e foi mantida constante em todos os ensaios. O procedimento detalhado de preparação da solução de Vishniac está descrito no apêndice A. As concentrações de carbono e de azoto na alimentação foram mantidas constantes durante todos os ensaios com carbono, com uma razão C/N de 3.78 mol/mol. Estudos anteriores confirmam que esta composição de alimentação simula razoavelmente um efluente doméstico (Campos *et al.*, 2000).

Tabela 2.2 – Composição da alimentação ao reactor.

Composto	Quantidade (g) para 50 l	Concentração
CH ₃ COONa.3H ₂ O	32.15	9.45 mmol/l de C
NaHCO ₃	10.50	2.50 mmol/l
NH ₄ Cl	6.70	2.50 mmol/l
K ₂ HPO ₄	2.45	0.28 mmol/l
Solução de micronutrientes	50 ml	1 ml/l

Tabela 2.3 – Composição da solução de micronutrientes segundo Vishniac et Santer (1957).

Composto	Concentração (g/l)
CaCl ₂	4.76
MnCl ₂ .	2.19
FeSO ₄	2.73
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1.03
AEDTHNa ₂	50.04
CuSO ₄	1.00
CoCl ₂	0.86
ZnCl ₂	1.04
NaOH	Quantitativamente até pH= 6.0

O reactor foi posto em funcionamento com biomassa aderida resultante de trabalhos anteriores com o mesmo reactor. O biofilme existente foi inicialmente obtido por inoculação de biomassa proveniente de uma indústria de cerveja. Este inóculo foi retirado de um sistema de tratamento de efluentes líquidos constituído por um pré-tratamento anaeróbio e um sistema de nitrificação e desnitrificação. Durante os trabalhos laboratoriais de

crescimento do inóculo, o reactor operou durante cerca de 400 d em regime de alimentação descontínua nas condições do presente estudo, tendo-se desenvolvido um consórcio de microrganismos heterotróficos, nitrificantes e desnitrificantes. As partículas foram conservadas a 5 ° C durante cerca de 30 dias, tendo sido colocadas novamente no interior do reactor para início do presente estudo.

2.4 PLANO DE TRABALHO

Durante o periodo experimental de 420 d, o reactor operou em ciclos de 300 min, seguindo dois modos de operação distintos:

- **Modo de alimentação descontínua:** ciclo de duração total de 300 min (t_C), dos quais 115 min de alimentação com agitação (t_M), a um caudal de 5.22 l/h até perfazer o volume total V_T , seguido de arejamento sem alimentação durante 165 min (t_{AR}), e descarga de 10 l em 20 min (t_D).
- **Modo de alimentação contínua:** ciclo de duração total de 300 min (t_C) e com alimentação contínua a um caudal de 2 l/h. Os periodos de mistura (t_M) e de arejamento (t_{AR}) são variáveis e de curta duração. A descarga de 10 l de efluente tratado efectua-se em simultâneo com a alimentação e tem duração de 20 min (t_D).

Em ambos os modos, as cargas orgânica e de azoto no reactor foram mantidas contantes, sendo a carga orgânica L^{CQO} de 1.22 kg/(m³·d) e a carga de azoto $L^{N-NH_4^+}$ de 0.14 kg/(m³·d).

O modo de alimentação descontínua foi previamente estudado em trabalhos anteriores (Campos *et al.*, 2000) e demonstrou vantagens a nível de remoção de carbono e azoto. Permiteu também obter alguma informação sobre a cinética de acumulação e degradação de polímeros de reserva, tendo-se verificado a produção destes polímeros na fase de “abundância”, e a sua degradação na fase de “escassez”. Estes ensaios serviram de referência para o estudo da influência do tipo de alimentação e do fornecimento de oxigénio na capacidade de remoção de azoto no SBBR.

O modo de alimentação contínua foi desenvolvido com o objectivo de implementar um sistema de remoção de carbono e azoto constituído por um único reactor. Desta forma elimina-se a necessidade de um tanque de mistura ou de um segundo SBBR em paralelo. As vantagens económicas são consideráveis, especialmente em sistemas de tratamento de águas residuais domésticas para pequenas populações.

Finalmente, estudou-se o efeito do fornecimento de oxigénio na remoção de carbono e azoto, com o objectivo de minimizar o consumo de oxigénio. Como o sistema só permite o fornecimento de ar a um caudal fixo, a variação na concentração de oxigénio foi conseguida com sucessivos períodos de abertura e fecho da válvula de ar comprimido. Desta forma, conseguiu-se reduzir o fornecimento de oxigénio sem comprometer a mistura do reactor.

O estudo dividiu-se em 3 etapas em modo de alimentação descontínua e 8 etapas em modo de alimentação contínua.

Etapas em modo de alimentação descontínua:

Etapa 1 – Dia 1 a dia 50. Arranque do reactor. A finalidade desta etapa foi de desenvolver a biomassa em suspensão no interior do reactor, e aumentar a massa de biofilme existente nas peças de suporte, de forma a obter um processo de remoção de nutrientes eficiente, com elevadas taxas de remoção de carbono e azoto. Esta etapa é considerada finalizada quando o reactor atinge o estado estacionário, isto é, quando as velocidades de remoção de carbono e azoto se mantêm constantes.

Etapa 2 – Dia 51 a dia 100. Estudo da cinética de nitrificação e desnitrificação nas condições estabelecidas na etapa anterior, ao longo de um ciclo.

Etapa 3 – Dia 101 a dia 175. Estudo da cinética de formação e degradação de polímeros de reserva (poli-3-hidroxibutirato (PHB) e poli-3-hidroxivalerato (PHV)) e do seu efeito no processo de remoção de azoto. Esta etapa permite obter informação sobre o metabolismo do consórcio de microrganismos presentes no reactor.

Etapas em modo de alimentação contínua:

Etapa 1 – Dia 1 a dia 8. Arranque do reactor em modo de alimentação contínua e alternância de arejamento e mistura. O ciclo de tratamento tem a mesma duração que no modo anterior: 300 min. Os períodos de mistura são alternados com os de arejamento: 10 min de mistura e 10 min de arejamento, obtendo-se na totalidade 100 min de mistura (t_M), 160 min de arejamento (t_A) e 20 min de descarga (t_D). A composição da alimentação ao reactor foi a descrita na tabela 2.2.

Etapa 2 – Dia 9 a dia 27. Redução do tempo de arejamento para 50 min, em períodos de 5 min.

Etapa 3 – Dia 28 a dia 49. Redução do tempo de arejamento para 20 min, em períodos de 2 min.

Etapa 4 – Dia 50 a dia 69. Tendo-se verificado uma redução na velocidade de nitrificação e conseqüente acumulação de amónio, eliminou-se o carbono da alimentação para permitir o enriquecimento da biomassa nitrificante. Também se aumentou a quantidade de bicarbonato da alimentação para minimizar o efeito da redução do pH causado pela reacção de nitrificação. Não existindo carbono, a reacção de desnitrificação não ocorre e conseqüentemente não há produção de alcalinidade que compensa a diminuição de pH provocada pela nitrificação. Mantiveram-se os tempos de arejamento e de mistura da etapa anterior: 20 min de arejamento e 260 min de mistura.

Etapa 5 – Dia 70 a dia 83. Aumento do tempo de arejamento para 40 min, em periodos de 4 min, mantendo as restantes condições do ciclo.

Etapa 6 – Dia 84 a dia 86: Aumento do tempo de arejamento para 50 min, em periodos de 5 min, mantendo as restantes condições do ciclo.

Etapa 7 – Dia 87 a dia 96. Aumento do tempo de arejamento para 60 min, em periodos de 6 min, mantendo as restantes condições do ciclo.

Etapa 8 – Dia 96 a dia 156. Restabelecimento da composição da alimentação inicial com carbono, mantendo as outras condições da etapa anterior. Estudo da influência da concentração de oxigénio dissolvido na cinética de acumulação e degradação de PHB e de PHV, e seu efeito no processo de remoção de azoto e carbono, em condições de alimentação contínua.

A tabela 2.4 descreve o faseamento temporal do trabalho.

2.5 METODOLOGIA OPERACIONAL

O sistema foi caracterizado por diversos parâmetros fisico-químicos: o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido (OD) foram monitorizados em contínuo. A concentração de sólidos em suspensão, de biofilme, de acetato, amónio, nitrito e nitrato foram medidos em amostras discretas retiradas do reactor imediatamente antes da descarga. Os métodos de análise de cada um destes parâmetros estão descritos no ponto 2.6. A avaliação destes resultados permitiram verificar o estado do reactor. Considerou-se que o reactor operava em estado estacionário quando as concentrações dos iões amónio, nitrito e nitrato no final do ciclo (imediatamente antes da descarga) se mantinham constantes durante um periodo de pelo menos 5 dias. Também se teve em conta a reprodutibilidade do perfil de concentração de oxigénio dissolvido no reactor, ciclo após ciclo (Beun *et al.*, 2002).

Tabela 2.4 – Plano de trabalho.

Modo	Etapa	Descrição	Alimentação	t_{AR}	TRH (h)	TRC (d)	Dias
ALIMENTAÇÃO DESCONTÍNUA	1	Arranque do reactor	Com carbono	165	9.2	-	1-50
	2	Estudo da cinética de nitrificação e desnitrificação			9.2	16.1	51-100
	3	Estudo da cinética de PHB e PHV			9.2	16.1	101-175
ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA	1	Arranque do reactor	Com carbono	160	9.2	--	1-8
	2	Estudo do efeito de O ₂		50	9.2	13.9	9-27
	3			20	9.2	12.8	28-49
	4	Enriquecimento da biomassa nitrificante e aumento gradual de O ₂	Sem carbono	20	9.2	--	50-69
	5			40	9.2	10.8	70-83
	6			50	9.2	--	84-86
	7			60	9.2	9.3	87-96
	8	Estudo da cinética de nitrificação e desnitrificação Estudo da cinética de PHB e PHV.	Com carbono	60	9.2	11.0	96-156

Uma vez atingido o estado estacionário, retiraram-se amostras líquidas do reactor a intervalos regulares durante um ciclo completo (300 min). Em cada uma das amostras analisou-se o acetato, os iões amónio, nitrito e nitrato. Estes valores permitiram obter um perfil de cada um dos parâmetros ao longo de um ciclo, em estado estacionário.

Para a análise dos polímeros de reserva PHB e PHV, efectuou-se outro ensaio, onde se retiraram amostras de biomassa em suspensão e de biofilme, a intervalos regulares durante um ciclo completo. Obtiveram-se deste modo perfis de concentração de PHB e PHV ao longo de um ciclo, em estado estacionário, na biomassa suspensa e no biofilme.

Estes perfis de concentração permitiram estudar a dinâmica do processo do reactor.

2.6 CONTROLO ANALÍTICO DE ROTINA

2.6.1 Determinação de acetato

A concentração de acetato foi determinada por cromatografia líquida, HPLC, utilizando um cromatógrafo líquido da marca Knauer, constituído por uma bomba isocrática, um detector de UV-Vis, um injector manual com loop de 10 μ l e uma coluna PL Hi-Plex H 8

μm , 100 mm \cdot 7.7 mm, com programa de aquisição e tratamento de dados Borwin, e com as seguintes condições de análise:

Fase móvel: H_2SO_4 2 mM

Caudal: 0.7 ml/min

Temperatura da coluna: 65 °C

Detector UV: 210 nm.

Procedeu-se à calibração do aparelho, injectando em duplicado soluções padrão de ácido acético de concentração compreendida entre 0 mg/l e 100 mg/l (figura 2.5)

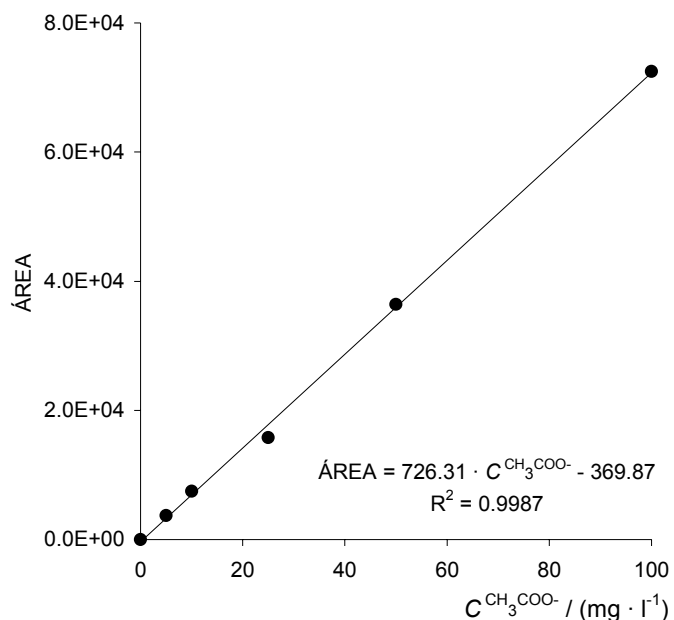


Figura 2.5 – Curva de calibração de acetato por HPLC.

Antes de cada série de análise, procedeu-se à verificação da validade da recta de calibração, injectando uma solução padrão de acetato de concentração conhecida.

2.6.2 Determinação da carência química de oxigénio (CQO)

A análise de carência química solúvel de oxigénio foi realizada segundo o método SM5220 C (APHA; 1989). O método baseia-se na oxidação da matéria orgânica presente na amostra com uma quantidade definida e em excesso de dicromato de potássio, em meio ácido. Após digestão durante 2 h a 150 °C e arrefecimento, o excesso de dicromato é

titulado com sulfato de ferro e amónio, utilizando um indicador de ferroína. O procedimento detalhado está descrito no apêndice A.

2.6.3 Determinação de sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV)

A quantificação de sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV) foi realizada segundo o método SM2540 B e E respectivamente (APHA; 1989). O método baseia na filtração de um volume conhecido de amostra e secagem na estufa a 105 °C para determinação dos sólidos suspensos totais. Posteriormente, o mesmo filtro contendo a biomassa seca é calcinado na mufla a 500 °C para determinação dos sólidos suspensos voláteis. Estes correspondem à biomassa (matéria orgânica) em suspensão contida na amostra, enquanto que os sólidos suspensos totais representam a matéria orgânica e inorgânica em suspensão na amostra.

O procedimento detalhado está descrito no apêndice A.

2.6.4 Determinação de biofilme aderido no suporte

Para quantificar o biofilme aderido no suporte, usou-se um método simples de gravimetria. São recolhidas duas peças de suporte e secas a 105 °C. As peças são pesadas com a biomassa seca e após lhes ser removida toda a biomassa. A diferença de peso corresponde à biomassa total aderida no suporte. O procedimento está descrito com mais pormenor no apêndice A.

2.6.5 Determinação de amónio

A quantificação de amónio na amostra líquida contida no reactor foi efectuada segundo o método SM4500 NH_4^+ C (APHA, 1989). O método baseia na formação de um complexo corado amarelo com a adição do reagente de Nessler e leitura da absorvância a 425 nm. Procedeu-se à calibração do método, tratando soluções padrão de ião amónio de concentração compreendida entre 0 mg/l e 5 mg/l de azoto sob a forma de NH_4^+ (figura 2.6). O procedimento detalhado está descrito no apêndice A.

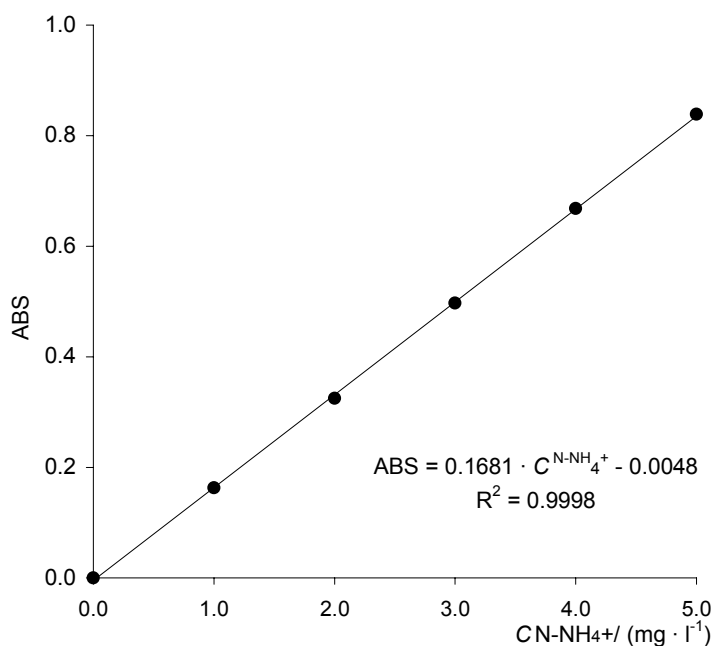


Figura 2.6 - Curva de calibração de íon amônio pelo método SM4500.

2.6.6 Determinação de nitrato

A quantificação de nitrato nas amostras provenientes do reactor foi efectuada segundo o método SM4500 NO₃⁻ B (APHA, 1989), modificado pela diluição da amostra e adição de padrão. O íon nitrato absorve a luz UV a 220 nm, permitindo uma rápida determinação da sua concentração. No entanto, a matéria orgânica e os iões carbonato bicarbonato, nitrito e crómio hexavalente interferem no método. As interferências dos nitritos, podem ser eliminadas com a adição de ácido sulfâmico à amostra, que promove a redução do íon nitrito a azoto molecular. A acidificação da amostra com este reagente elimina também as interferências de carbonato e bicarbonato.

A matéria orgânica absorve a 220 nm, interferindo na leitura do íon nitrato. Como o íon nitrato não absorve a 275 nm, uma segunda medição é feita a este comprimento de onda para corrigir a interferência da matéria orgânica a 220 nm. A quantificação de nitrato por este método só é válida se o dobro do valor da absorvância lida a 275 nm for inferior a 10 % do valor da absorvância lida a 220 nm.

Só em raros casos é que as amostras do reactor cumpriam o critério de validade do método relativamente à matéria orgânica. Por isso, optimizou-se o método para o caso de águas residuais contendo carbono orgânico com a adição de padrão.

Em cada amostra diluída, adicionou-se uma quantidade conhecida de padrão de nitrato, de forma a aumentar o sinal da absorvância a 220 nm, continuando-se no entanto, a verificar a lei de Beer. A concentração da matéria orgânica é assim diluída, obtendo-se um

valor de absorvância a 275 nm dentro do critério de não interferência de matéria orgânica. Procedeu-se à calibração do método, tratando soluções padrão de ião nitrato de concentração compreendida entre 0 mg/l e 12 mg/l de azoto sob a forma de NO_3^- (figura 2.7). O procedimento detalhado está descrito no apêndice A.

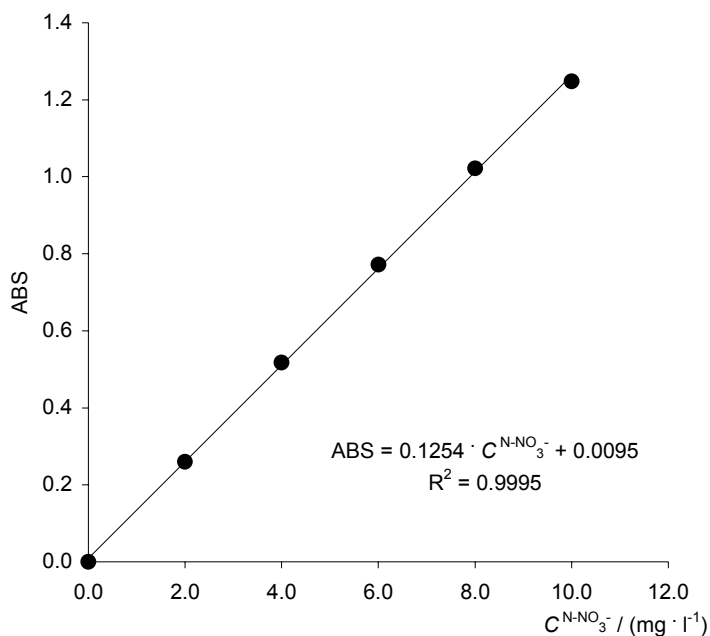


Figura 2.7 – Curva de calibração de ião nitrato pelo método SM4500.

2.6.7 Determinação de nitrito

A quantificação de nitrito no reactor foi efectuada segundo o método SM4500 NO_2^- B (APHA, 1989). O método baseia na formação de um complexo corado rosa com a adição de sulfanilamina e N-(1-naftil)-etilenodiamina dihidrocloro. A leitura da absorvância é efectuada a 543 nm. Procedeu-se à calibração do método, tratando soluções padrão de ião nitrito de concentração compreendida entre 0 mg/l e 0.25 mg/l de azoto sob a forma de NO_2^- (figura 2.8). O procedimento detalhado está descrito no apêndice A.

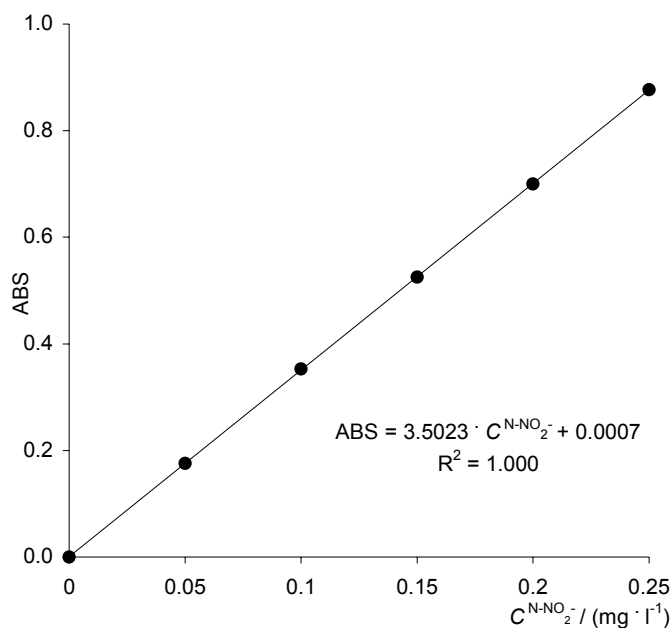


Figura 2.8 – Curva de calibração de íon nitrito pelo método SM4500.

2.6.8 Coloração Nile blue

A coloração *Nile blue* foi desenvolvida para visualizar a presença de polihidroxialcanoatos (PHA) nas bactérias. O método envolve uma coloração com azul de Nilo que cora os grânulos lipofílicos de PHAs para cor de laranja, visíveis em microscopia de epifluorescência. O procedimento consiste nos seguintes passos:

Solução 1: Solução aquosa de azul de nilo (*Nile blue*) 1 % m/v.

Solução 2: Solução aquosa de ácido acético 8 % (v/v).

Fixar uma amostra de biomassa numa lâmina.

Imergir a lâmina na solução 1 a 55 °C durante 10 min. Lavar brevemente com água.

Lavar quantitativamente com a solução 2 e deixar a solução sobre a lâmina durante 1 min. Reconstituir com a solução 2 regularmente.

Secar as lâminas com ar.

Colocar uma gota de água destilada nas lâminas coradas e secas, e colocar uma lamela, removendo toda a água em excesso.

Usar um óleo apropriado para microscopia de epifluorescência. Observar no microscópio.

Os grânulos de PHB são fluorescentes.

2.6.9 Determinação de polímeros de reserva

A quantificação dos polímeros de reserva poli-3-hidroxitirato (PHB) e poli-3-hidroxitirato (PHV) contidos nas células de biomassa foi efectuada por cromatografia gasosa após digestão e extração líquido-líquido, segundo o método descrito por Smolders *et al.* (1994), e modificado segundo Lemos *et al.* (1998) e Third *et al.* (2003).

A biomassa é centrifugada e o pellet é seco a 60 °C até peso constante. Os polímeros de reserva são extraídos, esterificados e hidrolisados num único passo de digestão ácida com 1-propanol e diclorometano a 100 °C durante 3.5 h. Os ácidos livres e outros compostos polares são extraídos da amostra por extração líquido-líquido com água ultrapura. A fase orgânica é recuperada e analisada por cromatografia gasosa, usando ácido benzoico como padrão interno. Procedeu-se à calibração do método, tratando soluções padrão preparadas a partir do copolímero de ácido (R)-3-Hidroxitirico e de ácido (R)-3-Hidroxitirico (7:3) (Fluka, ref. 27819), com quantidades compreendidas entre 0.0 mg e 2.0 mg de PHB e entre 0.0 mg e 1.0 mg de PHV (figura 2.9). A análise foi efectuada com um cromatógrafo GC Chrompack CP 9001, com coluna Tecnokroma TR-WAX (equivalente a ChromPack CP-SIL 52 CB) de 30 m · 0.32 mm · 0.25 µm, detector FID e injector split/splitless. As condições de análise foram as seguintes:

Caudal de ar: 250 ml/min;

Caudal de hidrogénio: 30 ml/min;

Caudal de gás de arraste (hélio): 1 ml/min (pressão na coluna: 50 kPa);

Caudal de gás make-up (azoto): 30 ml/min;

Temperatura do injector: 220 °C;

Temperatura do detector (FID): 250 °C;

Perfil de temperaturas do forno da coluna: 2 min a 50 °C; 15 °C/min até 225 °C em 10 min; 5 min a 225 °C (tempo total de análise: 17min);

O procedimento detalhado está descrito no apêndice A.

A identificação dos compostos foi efectuada pelo tempo de retenção respectivo, e confirmada por espectrometria de massa (GC-MS). Apresenta-se no apêndice A um cromatograma obtido com amostras de biomassa.

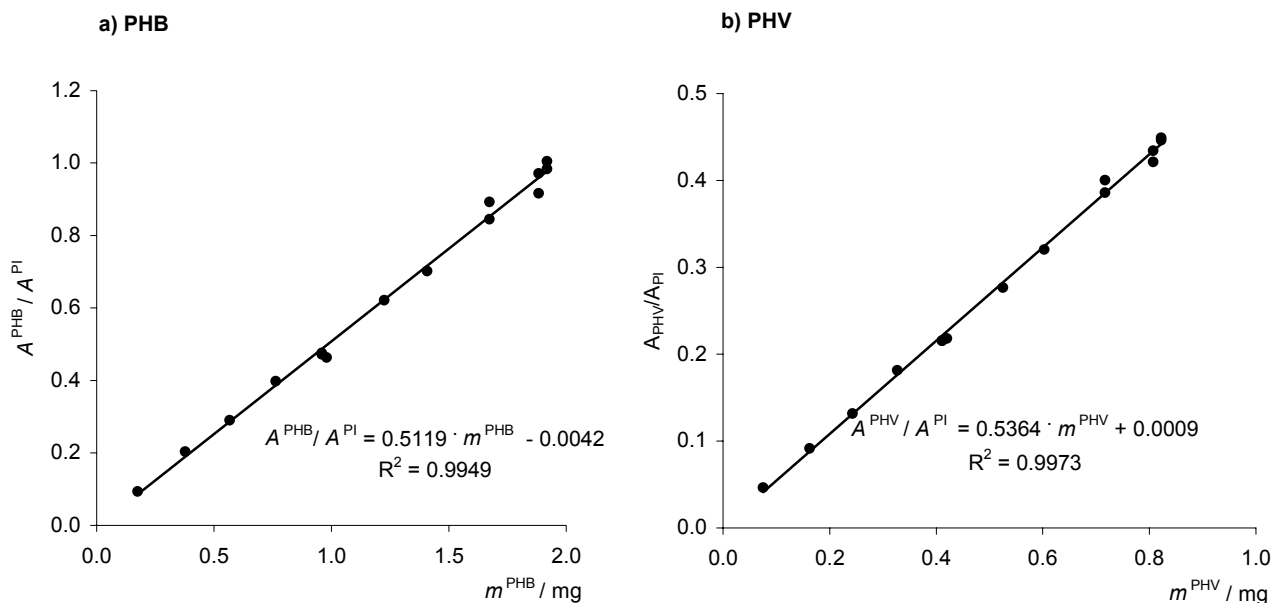


Figura 2.9 – Curvas de calibração de (a) PHB e (b) PHV.

2.7 METODOLOGIAS DE CÁLCULO

O ciclo de um SBBR pode ser descrito pelo esquema da figura 2.10. No início do ciclo a fase líquida contida no reactor é caracterizada pelo volume estacionário V_E e pela concentração de cada componente C_{E,t_0} presente no instante inicial. Em cada ciclo, é fornecido um volume V_A cuja concentração dos diversos componentes é definida por C_A . O reactor atinge um volume máximo V_T que é igual à soma de volume estacionário V_E com o volume fornecido V_A . Finalmente é descarregado um volume V_D , com concentração C_{D,t_c} . No final do ciclo o reactor condições com que inicia o ciclo seguinte com um volume V_E e concentração C_{E,t_c} .

Um balanço de massa ao azoto no reactor (componente N), pode ser descrito pela seguinte equação:

$$N_{\text{inicial}} + N_{\text{fornecido}} + N_{\text{formado}} = N_{\text{final}} + N_{\text{descarregado}} + N_{\text{removido por reacção}} \quad (\text{eq. 2.1})$$

Usando a nomenclatura da figura 2.10, obtém-se a seguinte expressão:

$$C_{E,t_0}^N \cdot V_{E,t_0} + C_A^N \cdot V_A + m_{\text{formado}}^N = C_{E,t_c}^N \cdot V_{E,t_c} + C_D^N \cdot V_D + m_{\text{removido}}^N \quad (\text{eq. 2.2})$$

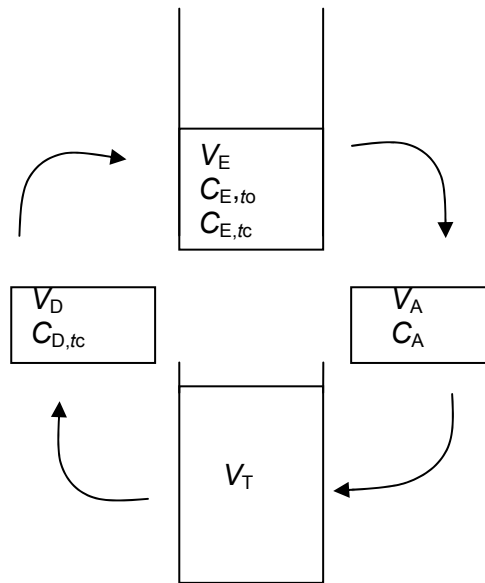


Figura 2.10 – Ciclo do SBBR

Em estado estacionário, o reactor mantém as mesmas condições no início e no fim do ciclo:

$$C_{E,t_0}^N = C_{E,t_c}^N \quad (\text{eq. 2.3})$$

$$V_{E,t_0} = V_{E,t_c} \quad (\text{eq. 2.4})$$

Logo a equação 2.2 pode escrever-se:

$$m_{\text{removido}}^N - m_{\text{formado}}^N = C_A^N \cdot V_A - C_D^N \cdot V_D \quad (\text{eq. 2.5})$$

O azoto fornecido ao reactor SBBR sob a forma de amónio é gasto nos seguintes processos:

- nitrificação;
- desnitrificação;
- assimilação.

O cálculo da contribuição de cada um destes processos para a remoção de azoto é feito relativamente ao azoto fornecido sob a forma de amónio.

Com base nestas considerações, calcularam-se os seguintes parâmetros do reactor:

2.7.1 Tempo de retenção hidráulico

O tempo de retenção hidráulico foi calculado segundo Wilderer *et al.* (2001), pela seguinte equação:

$$TRH = t_C \cdot \frac{V_T}{V_E} \quad (\text{eq. 2.6})$$

2.7.2 Tempo de retenção celular

O tempo de retenção celular ou idade das lamas foi calculado segundo Teichgräber *et al.* (2001), pela seguinte expressão:

$$TRC = \frac{m_{\text{reactor}}^{\text{SST-suspensão}} + m^{\text{ST-biofilme}}}{X_D^{\text{SST-suspensão}} \cdot \frac{V_D}{t_C}} \cdot \frac{t_R}{t_C} \quad (\text{eq. 2.7})$$

A biomassa em suspensão no reactor foi calculada por:

$$m_{\text{reactor}}^{\text{SST-suspensão}} = X_{\text{reactor}}^{\text{SST-suspensão}} \cdot V_T \quad (\text{eq. 2.8})$$

A biomassa contida no biofilme foi calculada por:

$$m^{\text{ST-biofilme}} = X^{\text{ST-biofilme}} \cdot n_P \quad (\text{eq. 2.9})$$

2.7.3 Quantificação de PHB

A quantificação de PHB foi efectuada segundo as descrições de vários autores (Third *et al.*, 2003b; Beun *et al.*, 2002; Dircks *et al.*, 2001; Van Aalst-van Leewen *et al.*, 1997).

2.7.3.1 Fracção de PHB na biomassa total

A fracção de PHB na biomassa F^{PHB} , foi calculada como o razão entre a massa de PHB (m^{PHB}) e a massa seca da amostra quantificada em termos de sólidos totais (m^{ST}).

$$F^{\text{PHB}} = \frac{m^{\text{PHB}}}{m^{\text{ST}}} \quad (\text{eq. 2.10})$$

2.7.3.2 Razão mássica PHB/biomassa activa

A massa seca da amostra contém biomassa e PHB. A quantidade de biomassa sem PHB, designada por biomassa activa, pode ser calculada subtraindo da massa seca da amostra a massa de PHB correspondente. A razão mássica entre PHB e biomassa activa (f^{PHB}), é então calculada por:

$$f^{PHB} = \frac{m^{PHB}}{m^{ST} - m^{PHB}} = \frac{\frac{m^{PHB}}{m^{ST}}}{1 - \frac{m^{PHB}}{m^{ST}}} = \frac{F^{PHB}}{1 - F^{PHB}} \quad (\text{eq. 2.11})$$

2.7.3.3 Razão molar PHB/biomassa activa

A razão molar de PHB é calculada a partir da equação 2.11 e das massas molares da biomassa e de PHB.

$$f_{\text{molar}}^{PHB} = \frac{F^{PHB}}{1 - F^{PHB}} \cdot \frac{M^{\text{biomassa}}}{M^{PHB}} \quad (\text{eq. 2.12})$$

2.7.4 Carga orgânica

A carga orgânica diária corresponde à quantidade de carbono (definida em termos de CQO) fornecida ao reactor por unidade de volume e de tempo.

$$L^{\text{CQO}} = \frac{C_A^{\text{CQO}} \cdot V_A}{V_E \cdot t_C} \quad (\text{eq. 2.13})$$

2.7.5 Carga de amónio

A carga de amónio diária corresponde à quantidade de amónio (definida em termos de azoto) fornecida ao reactor por unidade de volume e de tempo.

$$L^{\text{N-NH}_4^+} = \frac{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A}{V_E \cdot t_C} \quad (\text{eq. 2.14})$$

2.7.6 Capacidade de nitrificação

A capacidade de nitrificação do SBBR, N , corresponde à massa de amónio oxidado em cada ciclo, por unidade de volume do reactor. A massa de amónio oxidado calcula-se pela diferença entre a massa de amónio removido e a massa de amónio assimilado na biomassa durante um ciclo.

$$N = \frac{m_{\text{oxidado}}^{\text{N-NH}_4^+}}{V_E} = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{N-NH}_4^+} - m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+}}{V_E} \quad (\text{eq. 2.15})$$

Durante o processo de nitrificação, o amónio assimilado para crescimento heterotrófico da biomassa é calculado com base nos coeficientes estequiométricos das equações 1.5 ou 1.8 consoante se trate de crescimento com acetato ou com PHB:

$$m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+} = m_{\text{removido}}^{\text{Ac}} \cdot \nu_{\text{NH}_4^+/\text{Ac}} \quad (\text{eq. 2.16})$$

$$m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+} = m_{\text{removido}}^{\text{PHB}} \cdot \nu_{\text{NH}_4^+/\text{PHB}} \quad (\text{eq. 2.17})$$

2.7.7 Taxa de nitrificação

A taxa de nitrificação corresponde à capacidade de nitrificação do sistema por unidade de tempo. O tempo considerado é o período em que existem condições aeróbias (t_{AER}).

$$q_{\text{N}} = \frac{N}{t_{\text{AER}}} \quad (\text{eq. 2.18})$$

O período de tempo aeróbio (t_{AER}) não corresponde exactamente ao período de arejamento (t_{AR}) porque durante os períodos de mistura, existe ainda algum oxigénio. Em algumas situações é difícil de saber o valor exacto de t_{AER} . Nesses casos, o valor real da taxa de nitrificação situa-se entre um valor mínimo e um valor máximo, considerando que ocorre nitrificação durante todo o processo, ou apenas durante o período de arejamento, respectivamente.

$$q_{\text{min}}^{\text{N}} = \frac{N}{t_{\text{R}}} \quad (\text{eq. 2.19a})$$

$$q_{\text{max}}^{\text{N}} = \frac{N}{\sum t_{\text{AR}}} \quad (\text{eq. 2.19b})$$

2.7.8 Percentagem de amónio nitrificado

A percentagem de nitrificação foi calculada pela razão da massa de amónio oxidado com a massa de amónio fornecido.

$$\% \text{ Nitrificação} = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{N-NH}_4^+} - m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+}}{C_{\text{A}}^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_{\text{A}}} \cdot 100 \quad (\text{eq. 2.20})$$

2.7.9 Capacidade de desnitrificação

A capacidade de desnitrificação do SBBR, DN , corresponde à massa de nitrato e nitrito (NO_x) removidos durante um ciclo, por unidade de volume do reactor. A massa de NO_x removido calcula-se aplicando a equação de balanço 2.5, obtendo-se a seguinte expressão:

$$DN = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{N-NO}_x}}{V_E} = \frac{m_{\text{formado}}^{\text{N-NO}_x} - C_D^{\text{N-NO}_x} \cdot V_D}{V_E} \quad (\text{eq. 2.21})$$

Por sua vez, a massa de NO_x formado pode ser calculada a partir do consumo de amónio, retirando a parcela de assimilação:

$$DN = \frac{(m_{\text{removido}}^{\text{N-NH}_4^+} - m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+}) - C_D^{\text{N-NO}_x} \cdot V_D}{V_E} \quad (\text{eq. 2.22})$$

2.7.10 Taxa de desnitrificação

A taxa de desnitrificação corresponde à capacidade de desnitrificação do sistema por unidade de tempo. O tempo considerado é o período em que existem condições anóxicas (t_{AN}):

$$q^{DN} = \frac{DN}{t_{AN}} \quad (\text{eq. 2.23})$$

O período de tempo anóxico (t_{AN}) não corresponde exactamente ao período de mistura (t_M) porque durante os períodos de mistura, existe ainda algum oxigénio. Em algumas situações é difícil de saber o valor exacto de t_{AN} . Nesses casos, calcula-se um valor mínimo para a taxa de desnitrificação, considerando que ocorre desnitrificação durante todo o período de mistura.

$$q_{\text{min}}^{DN} = \frac{DN}{\sum t_M} \quad (\text{eq. 2.24})$$

2.7.11 Percentagem de NO_x desnitrificado

A percentagem de desnitrificação foi calculada pela razão entre a massa de NO_x removido e a massa de amónio fornecido.

$$\% \text{ Desnitrificação} = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{N-NO}_x}}{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A} \cdot 100 \quad (\text{eq. 2.25})$$

2.7.12 Percentagem de azoto assimilado na forma de amónio

A percentagem de assimilação foi calculada pela razão da massa de amónio assimilado com a massa de amónio fornecido.

$$\% \text{ Assimilação} = \frac{m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+}}{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A} \cdot 100 \quad (\text{eq. 2.26})$$

2.7.13 Percentagem de remoção de azoto

A percentagem de remoção de azoto foi calculada pela razão da massa de azoto removido com a massa de azoto fornecido.

$$\% \text{ Remoção N} = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{N}}}{C_A^{\text{N}} \cdot V_A} \cdot 100 \quad (\text{eq. 2.27})$$

Sendo o amónio é a única fonte de azoto, a massa de azoto fornecido corresponde à massa de amónio fornecido. Tendo em conta o balanço descrito pela equação 2.5, a percentagem de remoção de azoto pode ser calculada por:

$$\% \text{ Remoção N} = \frac{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A - C_D^{\text{N}} \cdot V_D}{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A} \cdot 100 \quad (\text{eq. 2.28})$$

2.7.14 Taxas específicas de consumo de acetato e de armazenamento de PHB

A taxa específica de consumo de acetato em regime de abundância ($-q_{\text{ab}}^{\text{CH}_3\text{COO}^-}$) foi calculada segundo Beun *et al.* (2002), dividindo a massa de acetato consumida pela biomassa activa presente no reactor e a duração do período de abundância. Considerou-se a quantidade de acetato removido como sendo todo o acetato fornecido menos o que foi gasto nos processos de crescimento heterotrófico e de desnitrificação durante a fase de enchimento.

$$\left(-q_{\text{ab}}^{\text{CH}_3\text{COO}^-}\right) = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{CH}_3\text{COO}^-}}{\left(m_{\text{reactor}}^{\text{SST-suspensão}} + m^{\text{ST-biofilme}}\right) \cdot t_{\text{ab}}} \quad (\text{eq. 2.29a})$$

A taxa específica de síntese de PHB (q_{ab}^{PHB}) foi calculada dividindo a massa de PHB produzida pela biomassa activa presente no reactor e a duração do período de abundância:

$$(q_{ab}^{PHB}) = \frac{m_{removido}^{PHB}}{(m_{reactor}^{SST-suspensão} + m^{ST-biofilme}) \cdot t_{ab}} \quad (\text{eq. 2.29b})$$

2.7.15 Balanço material ao carbono e azoto

O balanço material ao azoto e ao carbono durante os ensaios em alimentação descontínua foi efectuado considerando 4 fases distintas: a fase de enchimento, a fase de arejamento na presença de acetato, a fase de arejamento na ausência de acetato e a descarga. Em cada fase usaram-se os valores experimentais do acetato, amónio, nitrito, nitrato e PHB obtidos durante um ciclo para calcular a contribuição de cada espécie nos processos de crescimento de biomassa, nitrificação e desnitrificação. A figura 2.11 apresenta um esquema exemplificativo dos cálculos efectuados.

Usaram-se as seguintes expressões de cálculo:

Massa da espécie i no instante t:

$$m_t^i = C_{exp,t}^i \cdot V_t \quad (\text{eq. 2.30a})$$

Massa de PHB no instante t:

$$m_t^{PHB} = f_{molar}^{PHB-suspensão,t} \cdot m_{reactor}^{SST-suspensão} \cdot M^{biomassa} + f_{molar}^{PHB-biofilme,t} \cdot m^{ST-biofilme} \cdot M^{biomassa} \quad (\text{eq. 2.30b})$$

Massa da espécie i consumida no intervalo de tempo (t_2-t_1):

$$\Delta m_{(t_1;t_2)}^i = m_{t_2}^i - m_{t_1}^i \quad (\text{eq. 2.31})$$

No intervalo de tempo de 0 min a 115 min:

Massa de carbono oxidado no processo de crescimento aeróbio:

$$m_{oxidado, Cres,t(0;115)}^{Ac} = \frac{m_{t=0}^{O_2}}{v_{Ac/O_2}} \quad (\text{eq. 2.32})$$

Com $v_{Ac/O_2} = 0.58$, conforme eq. 1.5

Massa de carbono oxidado por nitrato no processo de desnitrificação (16):

$$m_{oxidado, DN,t(0;115)}^{Ac} = \frac{\Delta m_{t(0;115)}^{NO_3^-}}{v_{Ac/NO_3^-}} \quad (\text{eq. 2.32})$$

Com $v_{Ac/NO_3^-} = 0.55$, conforme eq. 1.16

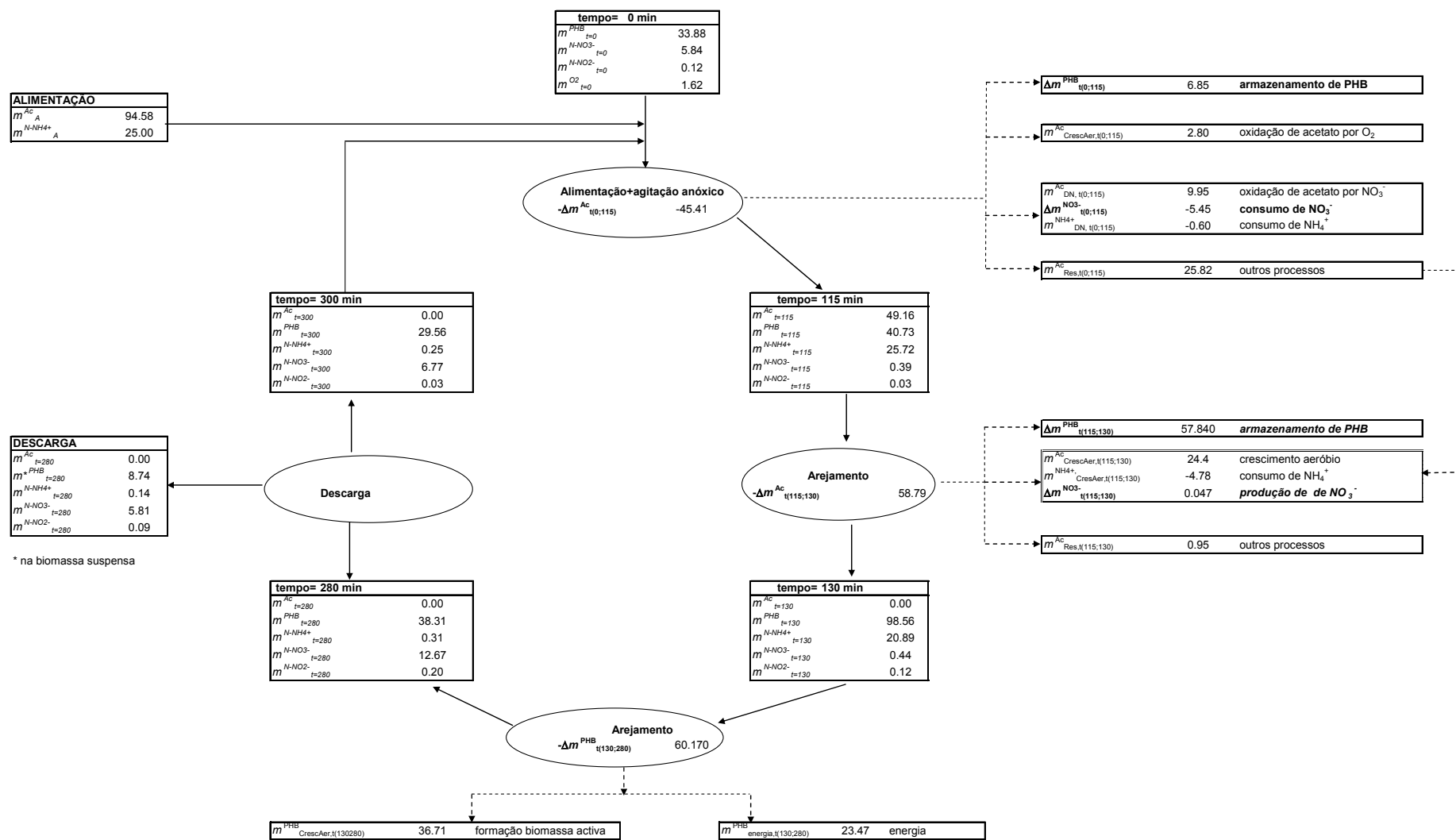


Figura 2.11 – Esquema de cálculos em modo de alimentação descontínua.

Massa de amónio assimilado no processo de desnitrificação:

$$m_{\text{assimilado,DN},t(0;115)}^{NH_4^+} = \Delta m_{t(0;115)}^{NO_3^-} \cdot \frac{U_{Ac/NH_4^+}}{U_{Ac/NO_3^-}} \quad (\text{eq. 2.33})$$

Com $U_{Ac/NO_3^-} = 0.06$, conforme eq. 1.16

Massa residual de acetato:

$$m_{\text{Res},t(0;115)}^{Ac} = \Delta m_{t(0;115)}^{Ac} - (\Delta m_{t(0;115)}^{PHB} + m_{\text{CrescAer},t(0;115)}^{Ac} + m_{\text{DN},t(0;115)}^{Ac}) \quad (\text{eq. 2.34})$$

No intervalo de tempo de 115 min a 130 min:

Massa de amónio assimilado no processo de crescimento aeróbio:

$$m_{\text{assimilado,Cres},t(115;130)}^{NH_4^+} = \Delta m_{t(0;115)}^{NH_4^+} + \frac{\Delta m_{t(0;115)}^{NO_3^-}}{U_{NH_4^+/NO_3^-}} \quad (\text{eq. 2.35})$$

Com $U_{NH_4^+/NO_3^-} = 0.98$, conforme eq. 1.13

Consumo de acetato no crescimento aeróbio:

$$m_{\text{assimilado,CresAer},t(115;130)}^{Ac} = \Delta m_{t(0;115)}^{NH_4^+} \cdot \frac{U_{Ac/biomassa}}{U_{Ac/NH_4^+}} \quad (\text{eq. 2.36})$$

Com $U_{Ac/NH_4^+} = 0.08$ e $U_{Ac/biomassa} = 0.40$, conforme eq. 1.5

Massa residual de acetato:

$$m_{\text{Res},t(0;115)}^{Ac} = \Delta m_{t(115;130)}^{Ac} - \Delta m_{t(115;130)}^{PHB} \quad (\text{eq. 2.37})$$

No intervalo de tempo de 115 min a 130 min:

Consumo de PHB no processo de crescimento aeróbio:

$$m_{\text{CrescAer},t(130;280)}^{PHB} = \Delta m_{t(130;280)}^{PHB} \cdot Y_{px,aer}^{\max} \quad (\text{eq. 2.38})$$

Massa de PHB gasto em processos energéticos:

$$m_{\text{energia},t(130;280)}^{PHB} = \Delta m_{t(130;280)}^{PHB} - m_{\text{CrescAer},t(130;280)}^{PHB} \quad (\text{eq. 2.39})$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ARRANQUE DO REACTOR

O reactor foi posto em funcionamento em regime de alimentação descontínua. O biofilme aderido às peças era fino e de cor acastanhada.

A quantificação dos sólidos permitiu estudar a evolução do crescimento de biomassa suspensa e aderida, no reactor. Quantificaram-se vários tipos de sólidos: os sólidos totais (ST), os sólidos voláteis (SV), que correspondem à matéria orgânica, os sólidos suspensos totais (SST), que representam as partículas com diâmetro superior a $1 \mu\text{m}$ e finalmente, os sólidos suspensos voláteis (SSV), que correspondem à matéria orgânica particulada (com diâmetro de partícula superior a $1 \mu\text{m}$). A figura 3.1 representa a evolução dos sólidos durante a fase inicial de operação do reactor. Verifica-se que a curva dos SST é muito próxima da curva dos SSV, o que revela que quase todos os sólidos suspensos são constituídos por biomassa. A curva dos sólidos totais (ST) está muito acima dos sólidos voláteis, o que indica que parte dos sólidos totais são inorgânicos. No entanto, como quase todos os sólidos suspensos são constituídos por matéria orgânica, deduz-se que os sólidos inorgânicos estão dissolvidos na fase líquida.

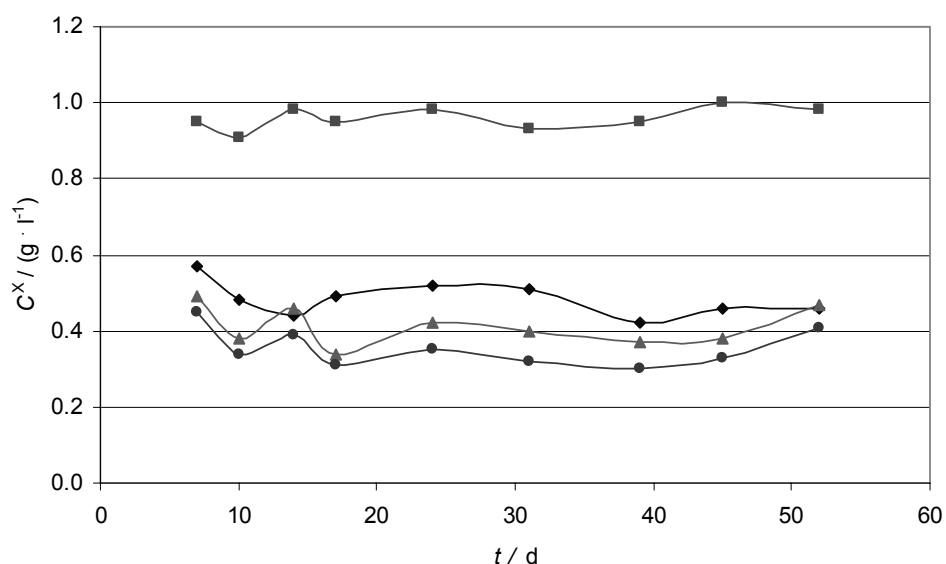


Figura 3.1 – Evolução da concentração de sólidos no reactor no final da fase de reacção, imediatamente antes da descarga (280 min), em regime de alimentação descontínua. ST (—■—), SV (—◆—), SST (—▲—) e SSV (—●—).

Verificou-se a presença de flocos amarelados de biomassa em suspensão na fase líquida, dois dias após o arranque do reactor, sendo a sua concentração no sétimo dia de 490 mg/l. Desde aí, a biomassa em suspensão no reactor sofreu apenas ligeiras variações, mantendo-se num valor próximo de 450 mg/l, o que revela a rejeição de uma quantidade constante de biomassa em cada ciclo. A quantidade de biomassa rejeitada em cada ciclo foi de 90 mg/l. Este valor foi obtido retirando o volume total da descarga para um recipiente, e analisando os sólidos suspensos totais correspondentes. Durante a fase de descarga ocorre as lamas vão sedimentando no reactor, e a quantidade de sólidos em suspensão no volume descarregado vai diminuindo ao longo do tempo. Por esta razão, o valor obtido para a concentração de sólidos suspensos rejeitados é muito inferior ao valor obtido para a concentração de sólidos suspensos no interior do reactor, imediatamente antes da descarga.

A observação no microscópio de uma preparação a fresco de biofilme permitiu detectar a presença de microrganismos heterotróficos identificáveis pela sua cor amarelada e de microrganismos autotróficos nitrificantes detectáveis pela sua forte cor alaranjada (figura 3.2).

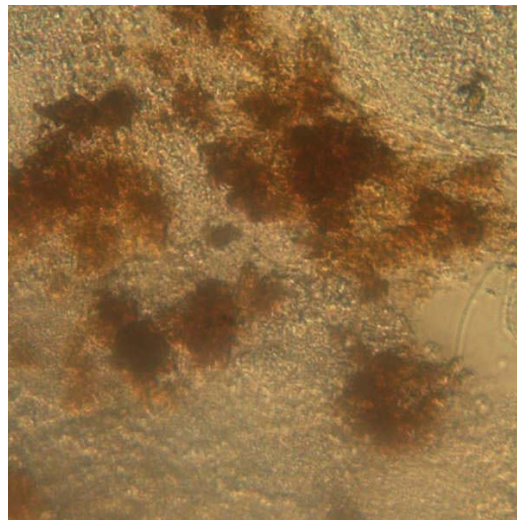


Figura 3.2 – Observação no microscópio de amostra de uma preparação a fresco de biomassa aderida: microrganismos nitrificantes (cor alaranjada) e microrganismos heterotróficos (cor amarelada). Ampliação de 400x.

O crescimento do biofilme era muito mais lento que o da biomassa em suspensão, por isso não era observável com tanta facilidade. De facto, só ao fim de cerca de 50 dias de operação do reactor se verificou o aumento de massa de biofilme por peça de 11.4 mg para 15 mg, tendo-se mantido aproximadamente constante durante o período de estudo.

O biofilme era constituído por microrganismos autotróficos, preferencialmente localizados na parte interior do suporte. Ao longo do tempo, foi-se desenvolvendo uma camada de biomassa heterotrófica na superfície externa das peças. A figura 3.3 ilustra as diversas fases de crescimento do biofilme: inicialmente o biofilme apresenta-se alaranjado, com a parte externa mais clara (figura 3.3 (b)). Com o tempo, as células vão envelhecendo, ficando resíduos celulares de biomassa não viável nas paredes dos suportes, o que lhes confere a cor escura que se observa na figura 3.3 (c).

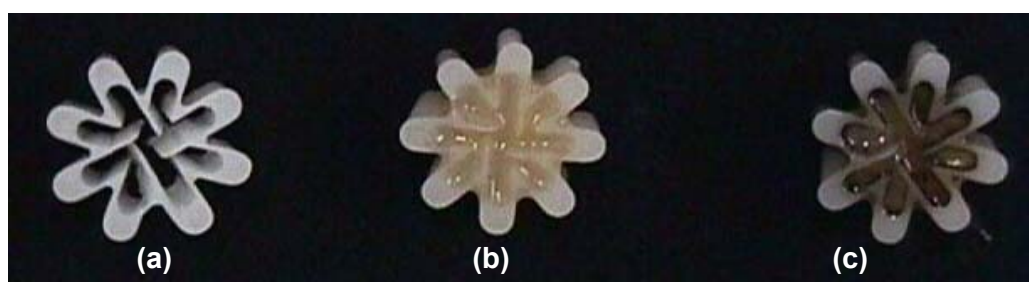


Figura 3.3 – As diversas etapas do crescimento de biofilme no suporte. (a) suporte limpo (b) suporte com 60 dias de operação (c) suporte com 150 dias de operação.

No segundo dia de funcionamento, efectuaram-se as primeiras medições ao carbono, amónio, nitrito e nitrato no interior do reactor, no final da fase de reacção (imediatamente antes da descarga, aos 280 min). A figura 3.4 representa os perfis dos parâmetros obtidos durante o período de estudo em regime de alimentação descontínua.

A quantificação de carbono orgânico na alimentação e no final da fase de reacção, foi efectuada através da determinação da carência química de oxigénio (CQO) nos primeiros 50 dias de operação. Obtiveram-se valores entre 350 mg/l e 250 mg/l. Tendo em conta a composição em acetato da alimentação, o valor teórico de CQO calculado seria de 298 mg/l (considerando um factor de conversão de 1.067 mg de CQO por cada mg de acetato). No final do tempo de reacção, a CQO era muito baixa: entre 15 mg/l e 35 mg/l. O método de análise usado foi o de refluxo fechado (APHA, 1989), que não é adequado para a quantificação de amostras com CQO inferior a 50 mg/l. Abandonou-se por isso a medição da CQO a partir do dia 52 e optou-se pela análise da concentração de acetato por HPLC para estudar a remoção de carbono no reactor.

O perfil de amónio apresentava-se inicialmente oscilante, tendo-se mantido mais estável a partir do dia 24 e com valores muito baixos: entre 0.20 e 0.30 mg/l. A concentração de nitrito na descarga também foi sempre inferior a 1.0 mg/l de N, enquanto que o perfil de nitrato mostrou-se bastante irregular nos primeiros dias devido não só à dinâmica do sistema, mas

também à interferência da matéria orgânica na leitura espectrofotométrica em UV (ver 2.5.6) nas amostras com concentrações de azoto sob a forma de nitrato inferior a 15 mg/l. Entretanto, o método foi otimizado com a diluição da amostra e a adição de padrão, tendo melhorado significativamente a fiabilidade da quantificação. O sistema também evoluiu para um estado mais estável, verificando-se concentrações de azoto sob a forma de nitrato aproximadamente constantes (entre 5 mg/l e 8 mg/l) ao fim de 50 dias.

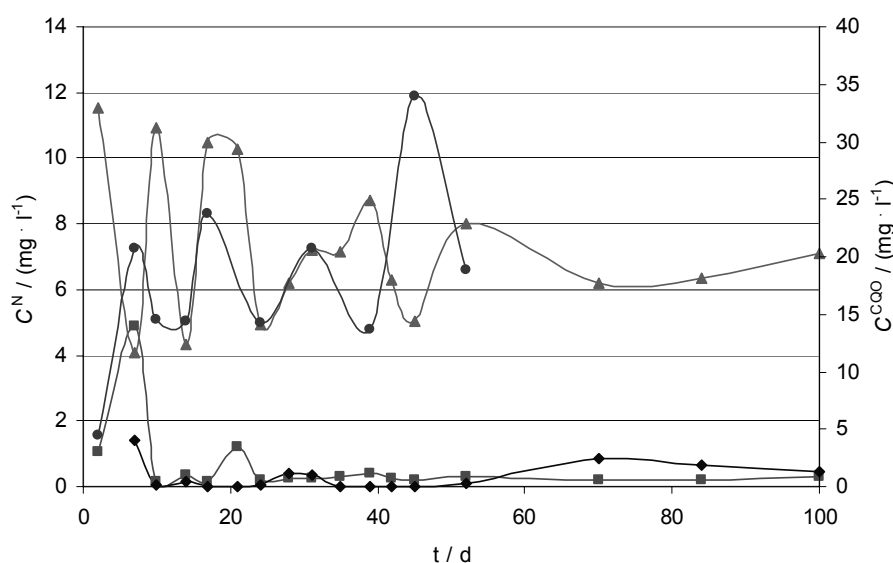


Figura 3.4 – Perfis de concentração de CQO (—●—), amónio(—■—), nitrito (—◆—) e nitrato (—▲—) no reator no final do período de reacção, imediatamente antes da descarga (280 min), em regime de alimentação descontínua.

Imediatamente antes da descarga do reator não foi detectado acetato na fase líquida (valores de CQO < 50 mg/l): todo o carbono era removido ao longo de um ciclo.

Após cerca de 50 dias de operação, considerou-se que o reator atingiu o estado estacionário uma vez que a biomassa suspensa e o biofilme no reator se mostraram aproximadamente constantes, assim como as concentrações dos compostos estudados. Na tabela 3.1, apresentam-se os parâmetros considerados no estado estacionário.

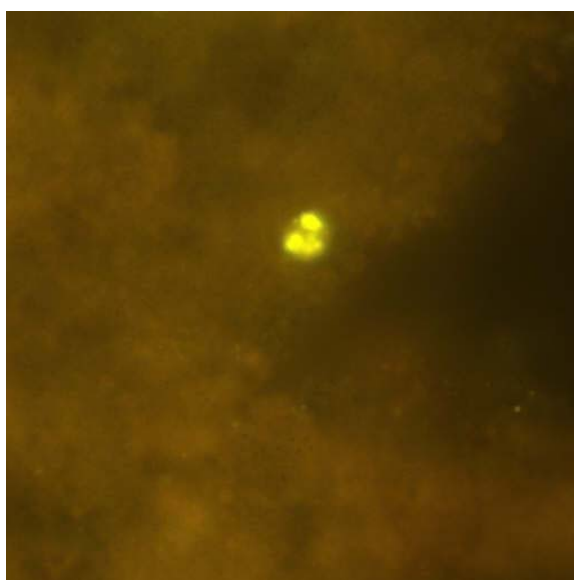
O estudo da acumulação de polímeros de reserva na biomassa iniciou-se com a observação ao microscópio de amostras de biomassa suspensa e de biofilme pelo método de coloração do Nilo. Observou-se a presença de grânulos fluorescentes característicos do PHB em todas as amostras estudadas. A figura 3.5 ilustra uma observação ao microscópio de uma amostra de biofilme tratada com este método.

Tabela 3.1 – Parâmetros obtidos em estado estacionário, imediatamente antes da descarga do reactor.

Parâmetro	Concentração
Acetato, $C^{\text{CH}_3\text{COO}^-}$, mg/l	0.0
Amónio, $C^{\text{N-NH}_4^+}$, mg/l	0.3
Nitrato, $C^{\text{N-NO}_3^-}$, mg/l	6.0
Nitrito, $C^{\text{N-NO}_2^-}$, mg/l	0.6
Biomassa suspensa*, $X^{\text{reactor}}_{\text{SST-suspensão}}$, mg/l *	450
Biomassa suspensa total*, $m^{\text{reactor}}_{\text{SST-suspensão}}$, mg	9821
Biofilme, $X_{\text{ST-biofilme}}$, mg/peça *	15.4
Biomassa aderida total, $m_{\text{ST-biofilme}}$, mg	64788
Biomassa removida em cada ciclo**, $X^{\text{descarga}}_{\text{SST-suspensão}}$, mg/l	90

* no interior do reactor, imediatamente antes da descarga (280 min)

** amostra do volume total da descarga, após homogeneização por agitação.

**Figura 3.5** - Observação no microscópio de uma amostra de biofilme, tratada por coloração de Nilo. Ampliação 400x.

3.2 CINÉTICA DE REMOÇÃO DE AZOTO E DE CARBONO

3.2.1 Regime de alimentação descontínua

3.2.1.1 Remoção de azoto

Estudou-se a cinética de remoção de azoto e de carbono, com recolha a tempos regulares de amostras do reactor e quantificação do amónio, nitrito, nitrato e acetato durante um ciclo completo. Na figura 3.6 apresenta-se um perfil representativo dos ensaios efectuados.

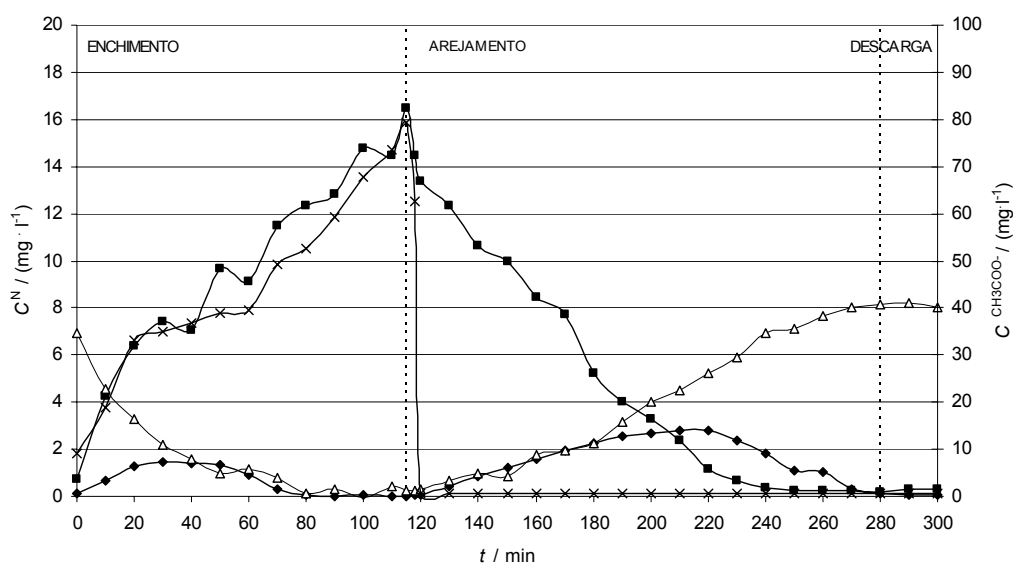


Figura 3.6 – Perfis de concentração de acetato (—X—), amónio (—■—), nitrito (—◆—) e nitrato (—▲—) no reactor em regime de alimentação descontínua.

O carbono sob a forma de polímeros de reserva também foi estudado. Procedeu-se à análise de poli-3-hidroxitirato (PHB) e de poli-3-hidroxiacrilato (PHV) em amostras de biomassa suspensa e de biofilme, a intervalos regulares durante um ciclo completo. A análise simultânea de todos os compostos de azoto e de carbono estudados não foi possível por várias razões: a alteração da dinâmica do ciclo em estudo devido à redução do volume da fase líquida provocada pela recolha de amostras; a dificuldade de meios materiais e humanos para tratar grandes quantidades de amostras simultaneamente e a impossibilidade de conservar amostras para posterior análise destes parâmetros.

Os perfis de PHB e PHV estão representados nos gráficos das figuras 3.8 e 3.9. O correspondente perfil de O_2 está representado na figura 3.10.

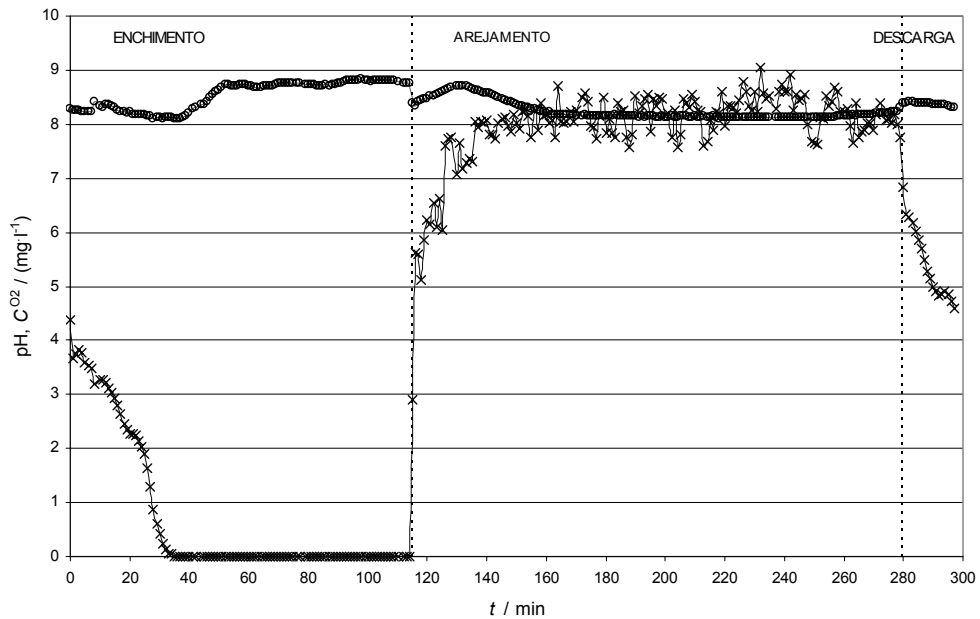


Figura 3.7 – Perfis de concentração de oxigênio (\times) e pH (\circ) no reactor em regime de alimentação descontínua.

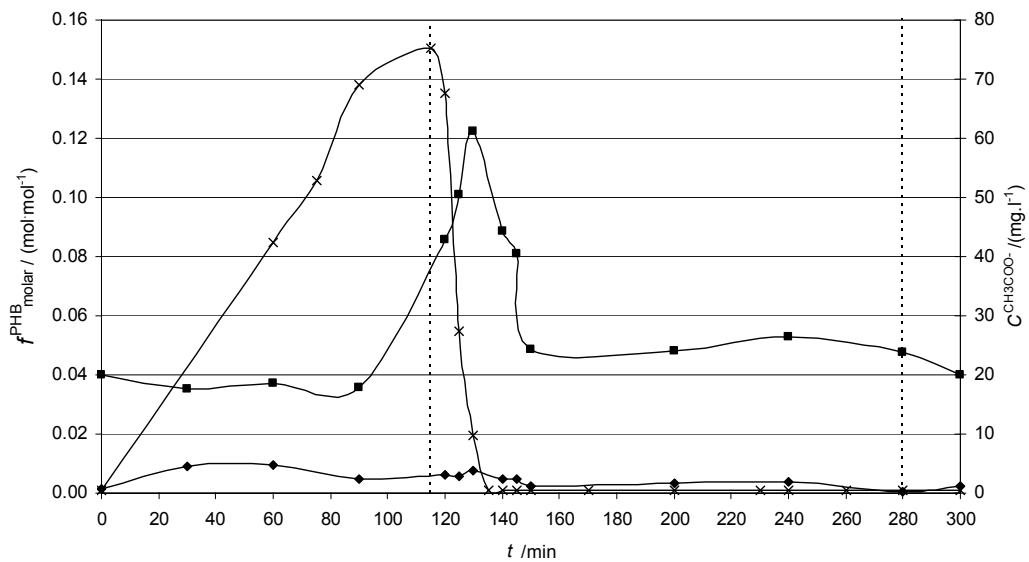


Figura 3.8 – Perfis de concentração de PHB (\blacksquare) e de PHV (\blacklozenge) na biomassa suspensa e do acetato (\times) no reactor em regime de alimentação descontínua.

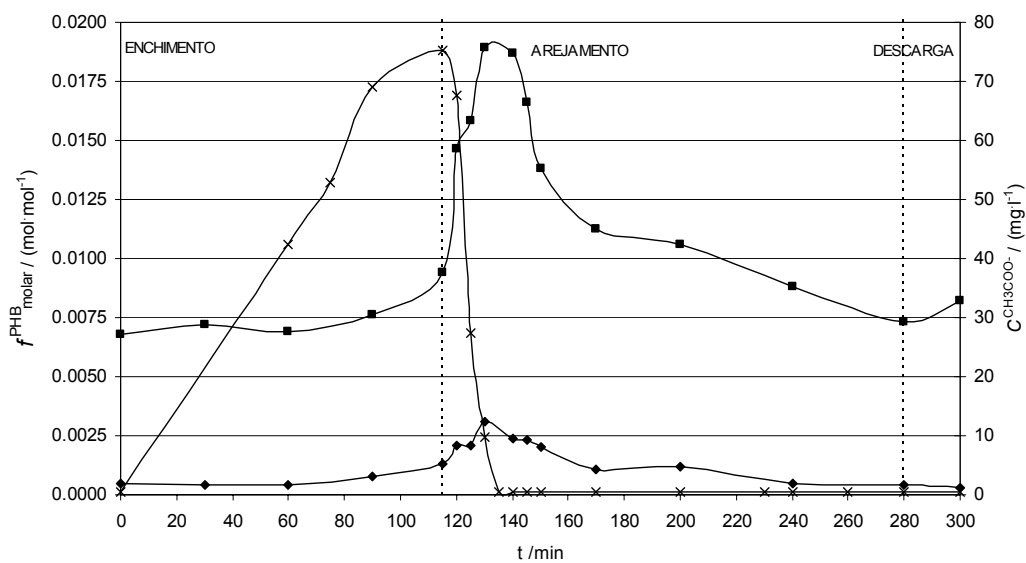


Figura 3.9 – Perfis de concentração de PHB (—■—) e de PHV (—◆—) na biomassa aderida, e do acetato (—×—) no reactor em regime de alimentação descontínua.

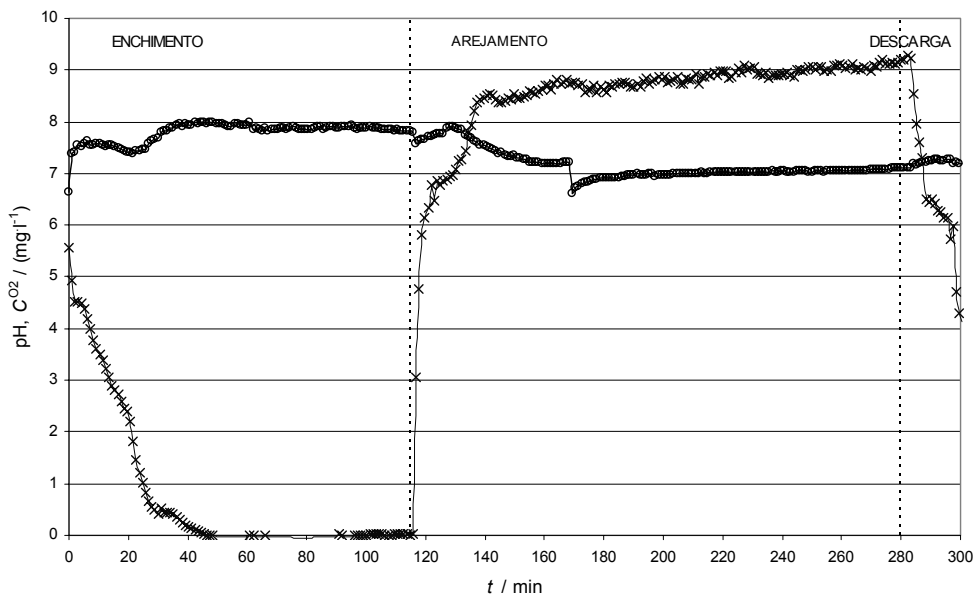


Figura 3.10 – Perfis de concentração de oxigénio (—×—) e pH (—○—) no reactor em regime de alimentação descontínua, durante o ensaio de PHB e PHV.

A tendência de acumulação de PHV é semelhante à de PHB, embora as quantidades de PHV sejam extremamente baixas quando comparadas com o PHB. Por isso, a acumulação de PHV não parece ser significativa neste processo em que o substrato é acetato. Reis *et al.* (2003) e Carrucci *et al.* (2001) verificaram que com acetato como única fonte de carbono, o polímero formado em quantidades significativas é o PHB. O PHV ocorre em quantidades apreciáveis quando o substrato é ácido propiónico (ver tabela 1.4). Por este motivo, a discussão dos resultados relativos à acumulação de polímeros de reserva será apenas abordada relativamente ao PHB e não ao PHV.

Os perfis observados na biomassa suspensa e no biofilme foram semelhantes. No entanto, na biomassa suspensa as fracções de polímeros de reserva são muito superiores às do biofilme. Isto porque a resistência à transferência de massa é maior no biofilme do que na biomassa suspensa.

Tanto na biomassa suspensa como no biofilme, os perfis observados de PHB apresentam um patamar inicial e uma rápida subida no momento em que se interrompe o fornecimento de carbono. O valor máximo é atingido quando todo o acetato é consumido. No final do ciclo, regista-se novamente um patamar correspondente a uma quantidade residual de PHB e PHV nas células.

A existência de PHB residual foi confirmada por Third *et al.* (2003b) numa experiência com testes de biomassa sujeita a um período de “escassez” durante 3 dias. Foram apenas fornecidos os nutrientes necessários para o crescimento celular. Verificaram com estes ensaios que as células contêm uma quantidade de PHB não biodegradável correspondente a uma razão molar de PHB na biomassa (f_{PHB}) de 0.008 mol/mol. No presente estudo, obtiveram-se valores de f_{PHB} 0.04 mol/mol na biomassa suspensa e de 0.007 mol/mol no biofilme.

O valor máximo de f_{PHB} atingido foi de 0.12 mol/mol na biomassa suspensa e de 0.019 mol/mol no biofilme. Beun *et al.* (2002) obtiveram valores máximos de fração de PHB acumulada nas células de 0.13 mol/mol no período de “escassez” num SBR em condições aeróbias, com tempos de retenção celulares de 4 d. Noutros trabalhos, Beun *et al.* (2001) registaram valores de PHB menores: entre 0.02 e 0.04 mol/mol num reactor *airlift* com operação sequencial

A interpretação dos fenómenos ocorridos durante as diversas fases do ciclo do SBRR foi efectuada com base nos perfis apresentados nas figuras 3.6 a 3.10. Efectuaram-se balanços materiais ao azoto e ao carbono representados na figura 3.11, segundo a metodologia de cálculo descrita na figura 2.10. Estes cálculos foram efectuados em três etapas: o enchimento, o arejamento na presença de acetato e o arejamento na ausência de

acetato. A descarga não foi considerada para efeitos de balanço material, porque não está incluída no tempo de processo t_R (ver secção 1.2).

Fase de enchimento:

A fase de enchimento inicia-se quando se adiciona a alimentação. Esta fase também é denominada fase de “abundância” porque corresponde a condições em que os microrganismos podem crescer em meio abundante de substrato. No início do ciclo existe ainda algum oxigénio remanescente do ciclo anterior, constituindo o aceitador final de electrões no metabolismo de crescimento das bactérias heterotróficas descrito pelas equação estequiométrica (1.5). Quando todo o oxigénio é consumido, o crescimento aeróbio dos microrganismos cessa, e o acetato fornecido vai-se acumulando na fase líquida, como se verifica nos perfis de carbono e oxigénio das figuras 3.6 e 3.7.

Simultaneamente o nitrato é o aceitador final de electrões no processo de desnitrificação: o nitrato é praticamente todo convertido a nitrito e este a azoto gasoso de acordo com a equação estequiométrica (1.16). Este processo envolve consumo de acetato e de amónio, com a conseqüentemente produção de biomassa heterotrófica desnitrificante. No entanto, a maioria de acetato e do amónio fornecidos durante este período é acumulada na fase líquida.

Com uma alimentação constante, sem variações bruscas da concentração de carbono no meio, não é de prever que haja lugar a armazenamento de carbono pelas bactérias heterotróficas. De facto, o perfil de PHB na fase de enchimento mantém-se aproximadamente constante, sendo a razão de PHB igual ao seu valor residual.

Durante a fase de enchimento, gastaram-se cerca de 45.41 mmol de carbono sob a forma de acetato. Este carbono foi gasto em:

- (i) armazenamento anóxico de PHB : 15 % (valor obtido experimentalmente);
- (ii) oxidação de acetato na presença de oxigénio remanescente do ciclo anterior: 6 % (calculado a partir da equação 1.3);
- (iii) oxidação de acetato na presença de nitrato, por desnitrificação: 22 % (calculado a partir do consumo de nitrato e da equação 1.14);
- (iv) outros processos intracelulares: 57 %.

Alguns autores estudaram este fenómeno de consumo intracelular de carbono. Dionisi *et al.* (2001) referem-se a um processo de “acumulação” como uma forma de conversão de carbono em espécies intermédias ou percursores no processo de armazenamento de

polímeros de reserva. Beun *et al.* (2002) chamaram-lhe processos de manutenção ou de energia. Third *et al.* (2003b) referem a oxidação de carbono para permitir o transporte de substrato para o armazenamento de PHB nas células.

Fase de reacção com arejamento:

Esta fase é caracterizada pelo corte de alimentação e fornecimento de oxigénio em excesso. Em poucos minutos, todo o acetato acumulado na fase anterior (cerca de 80 mg/l) é gasto.

Pela observação dos perfis de carbono e azoto da figura 3.6 verifica-se que todo o carbono se esgota em pouco minutos. Poder-se-ia supor que todo este carbono foi gasto para crescimento aeróbio de biomassa, de acordo com a equação estequiométrica (1.5) e com o consequente consumo de amónio. No entanto, o rápido consumo de acetato neste intervalo de tempo sugere a existência de um processo alternativo de transformação de carbono: mesmo em condições de excesso de oxigénio e de substrato, os microrganismos heterotrofos têm velocidades de crescimento moderadas. Vários autores referem o armazenamento de carbono sob a forma de polímeros de reserva como processo de resposta rápida a variações bruscas de carbono disponível, em diversas condições processuais:

- Em condições aeróbias em reactor *airlift* (Beun *et al.*, 2001), em SBR (Beun *et al.*, 2000a; Third *et al.*, 2003b), em reactor contínuo sem recirculação de biomassa (Dionisi *et al.*, 2004);
- Em condições anóxicas em SBR (Beun *et al.*, 2000b), em reactor contínuo sem recirculação de biomassa (Dionisi *et al.*, 2001);
- Em condições de concentração controlada de oxigénio em SBR (Third *et al.*, 2003a).

De facto, no instante em que é iniciado o fornecimento de oxigénio, grande parte do acetato consumido é acumulado em poucos instantes sob a forma de PHB (fig. 3.8 e 3.9). A concentração de PHB atinge um valor máximo no instante em que todo o acetato acaba de ser consumido, que corresponde ao início do período de “escassez” propriamente dito. A partir desse instante, o PHB começa a diminuir, passando a ser a fonte de carbono nos processos de crescimento e manutenção de biomassa, até ao valor residual de PHB na células.

Os balanços materiais efectuados ao carbono e ao azoto, e apresentados na figura 3.11 permitem quantificar conversões ocorridas durante a fase de arejamento. Nesta fase de reacção com arejamento, gasta-se todo o acetato presente: cerca de 58.79 mmol de carbono, e verifica-se que este é quase todo gasto em armazenamento sob a forma de PHB (57.84 mmol).

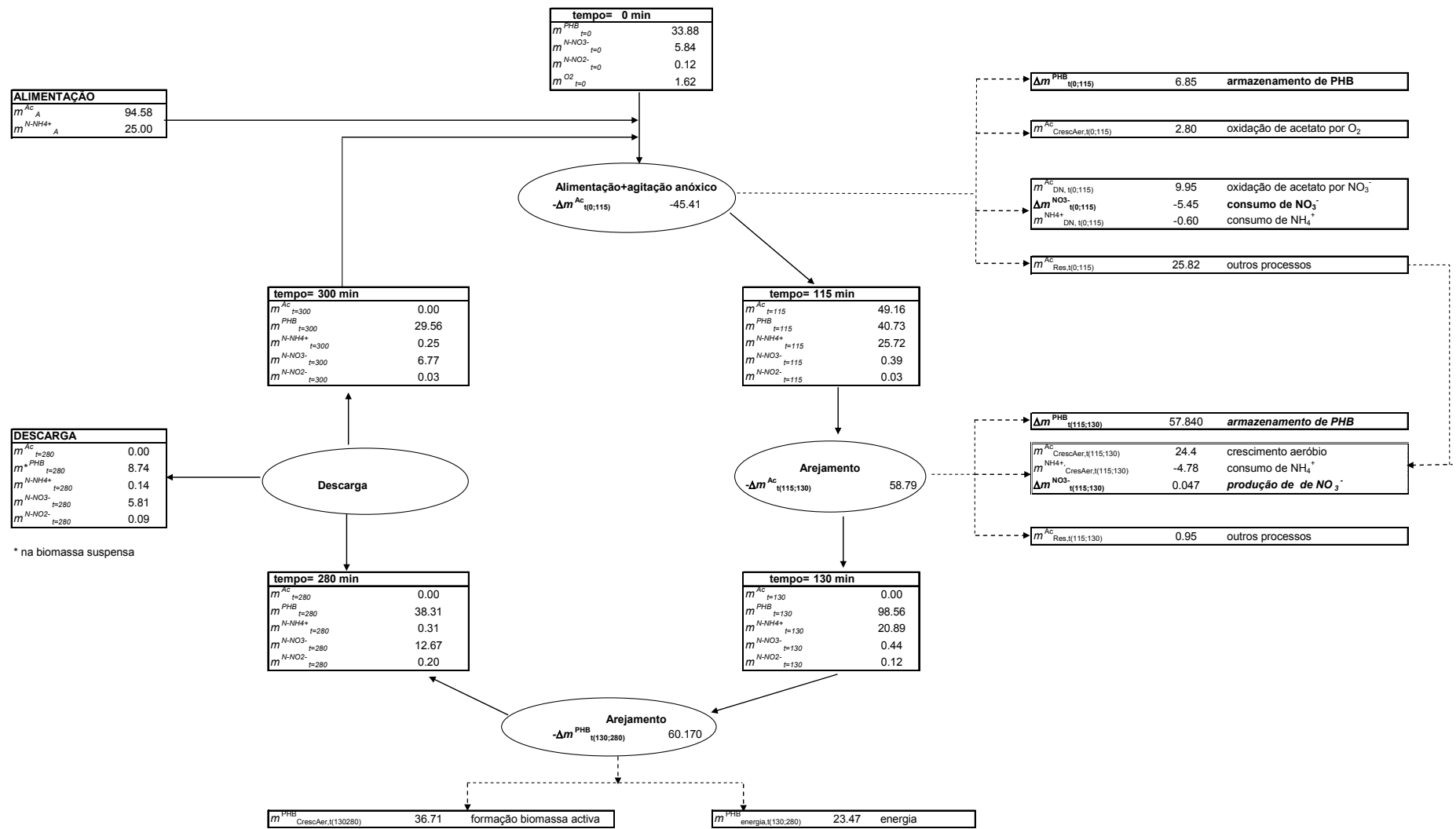


Figura 3.11 – Balanço materiais ao carbono e azoto durante um ciclo de operação em alimentação descontínua.

Apenas uma fracção residual é gasta noutros processos. Esta fracção pode até ser atribuída aos erros inerentes aos valores experimentais.

Simultaneamente, verifica-se um consumo elevado de amónio (4.78 mmol de N). O declive abrupto do perfil de amónio observado na figura 3.6 neste período sugere uma taxa de consumo de amónio muito maior que no período seguinte de ausência de acetato. Estas tendências de consumo de amónio repetiu-se nos vários ensaios efectuados.

Como o carbono é todo gasto no processo de armazenamento, este amónio deveria ser consumido por nitrificação pelos microrganismos autotróficos, aumentando a concentração de nitrato na fase líquida, o que não acontece. A desnitrificação também não ocorre neste período porque não existe nitrato disponível. Este consumo de amónio só pode ser explicado pelo crescimento heterotrófico, com algum carbono disponível sob a forma de espécies intermédias. O excedente de carbono da fase anterior (25.82 mmol) referido em “outros processos” na figura 3.11 poderia ser a chave da questão. Este carbono, que não foi quantificado sob a forma de acetato poderá estar sob a forma de alguma espécie intermédia precursora do processo de crescimento heterotrófico.

A fase de “escassez” propriamente dita, inicia-se quando não há mais acetato disponível, o que acontece cerca de 5 minutos após o início do arejamento. Experimentalmente, é difícil definir o instante exacto em que o acetato se esgota, devido à possibilidade de consumo de acetato pela biomassa contida dentro da própria amostra, depois de ser retirada do reactor. A filtração imediata da amostra evita o consumo de carbono mas não totalmente.

Quando não existe acetato, o PHB passa a ser a fonte de carbono no processo de crescimento de biomassa heterotrófica. A partir da equação estequiométrica (1.8), calculou-se o carbono gasto neste processo. Esta equação tem em conta um valor de rendimento de biomassa em PHB em condições aeróbias, Y_{PX}^{\max} , de 0.61 mol/mol, obtido por Beun *et al.* (2000a) e referido na tabela 1.5.

O amónio é gasto no processo de nitrificação, sendo oxidado a nitrito e seguidamente a nitrato de acordo com as equações estequiométricas (1.11 e 1.12). De facto, o gráfico das figura 3.6 evidencia um aumento de nitrito e de nitrato e um decréscimo simultâneo de amónio. Quando todo o amónio é consumido, a nitrificação continua com a conversão de nitrito a nitrato. Este facto é confirmado pelo aumento de nitrato até que o nitrito se esgote. O processo poderia ser truncado quando o amónio se esgota, que corresponde aproximadamente a 125 min de arejamento, permitindo uma economia de oxigénio considerável. No entanto, a concentração de nitrito na fase líquida ainda é elevada (cerca de 2 mg/l).

Descarga

Durante a fase de descarga a biomassa sedimenta no fundo do reactor. A concentração de O_2 dissolvido diminui até cerca de 4 mg/l a 5 mg/l. Não havendo carbono disponível sob a forma de acetato nem de polímeros de reserva, os processos de crescimento de biomassa heterotrófica ou de desnitrificação nas zonas anóxicas do biofilme não são possíveis. O nitrito é gasto na totalidade no processo de nitrificação, com algum consumo de oxigénio.

O efluente rejeitado apresentou uma concentração de azoto sob a forma de nitrato de cerca de 8 mg/l de $N-NO_3^-$, enquanto que o amónio e o nitrito eram praticamente inexistentes. Tendo em conta a legislação vigente para descargas de águas residuais em zonas sensíveis sujeitas a eutrofização (Dec. Lei 152/97) em que o valor limite de emissão (VLE) mais baixo para azoto é de 10 mg/l, pode-se considerar este que processo cumpre os objectivos propostos para a remoção de azoto.

Calcularam-se as taxas de nitrificação, desnitrificação e de remoção de azoto. A tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos. A metodologia de cálculo está descrita na secção 2.7.

Tabela 3.2 – Taxas de nitrificação, desnitrificação e remoção total de azoto em função do tempo de arejamento, nos ensaios efectuados em alimentação descontínua.

Tempo de arejamento, min	Taxa de nitrificação mmol/(l·h)	Taxa de desnitrificação mmol/(l·h)	Nitrificação %N	Desnitrificação % DN	Remoção de azoto % RN
Σt_{AR}	q_N	q_{DN}			
165	0.430	0.446	67.8	43.6	75.7

Verificou-se que estas condições processuais são muito vantajosas para a remoção de azoto com 76% de azoto removido. Tendo em conta que a legislação vigente exige uma percentagem de redução de azoto entre 70 e 80 % este processo apresenta-se como uma excelente alternativa aos sistemas convencionais de remoção de azoto.

3.2.1.2 Taxas específicas de consumo de acetato e de armazenamento de PHB

À semelhança de um trabalho publicado por Beun *et al.* (2002), calcularam-se para o período de “abundância” as taxas específicas de síntese de PHB (q_{PHB}^{ab}) e de consumo de acetato (q_{Ac}^{ab}). Estes cálculos pressupõem taxas de síntese de PHB e de consumo de acetato de ordem zero e uma concentração constante de biomassa activa presente no reactor (Beun *et al.*, 2002).

A razão $(q_{ab}^{PHB})/(-q_{ab}^{CH_3COO^-})$ indica a fracção de substrato armazenado sob a forma de PHB, e foi calculada pela expressão (2.29a). A tabela 3.3 apresenta os resultados obtidos neste estudo e resultados publicados por alguns autores.

Dos estudos referidos na tabela 3.3, apenas o de Van Aalst van Leeuwen *et al.* (1997) foi efectuado com culturas puras (*Paracoccus pantotrophus*). Os outros estudos usaram culturas mistas. As culturas estudadas foram previamente acondicionadas em ciclos sucessivos durante alguns meses em meio aeróbio, à excepção das culturas de Beccari *et al.* (2002), Majone *et al.* (1998) e van Aalst van Leeuwen *et al.* (1997), que foram cultivadas em vasos aeróbios com adição pulsada de acetato.

Tabela 3.3 – Taxas específicas de consumo de acetato ($-q_{ab}^{CH_3COO^-}$) e de produção de PHB (q_{ab}^{PHB}) e sua razão durante a fase de abundância em SBR. Os desvios padrões estão registados entre parêntesis. Adaptado de Beun *et al.* (2002).

Referência	Alimentação de acetato na fase de abundância (a)	TRC (d)	Temp. (°C)	$(-q_{ab}^{CH_3COO^-})$ mol/(mol·h)	(q_{ab}^{PHB}) mol/(mol·h)	$(-q_{ab}^{CH_3COO^-})/(q_{ab}^{PHB})$ mol/mol
Este estudo	Descontínua 115 min, aeróbio	16	21	0.30 (0.08)	0.22	0.7 (0.02)
Beun <i>et al.</i> (2002)	Pulso, aeróbio.	4.0	20	0.85 (0.09)	0.54 (0.06)	0.6 (0.05)
	Pulso 4 vezes maior, aeróbio.	n.d (b)	20	0.93 (0.03)	0.55 (0.03)	0.6 (0.02)
	Pulso 8 vezes maior, aeróbio.	n.d (b)	20	0.97 (0.03)	0.66 (0.06)	0.7 (0.02)
Beccari <i>et al.</i> (2002)	Pulso, aeróbio	3	25	0.77	0.48	0.6
Beun <i>et al.</i> (2000a)		3.8	20	0.64 (0.10)	0.27(0.07)	0.4 (0.07)
	Pulso, aeróbio	9.5	20	0.43 (0.06)	0.27 (0.05)	0.6 (0.07)
		19.8	20	0.37 (0.06)	0.23 (0.04)	0.6 (0.07)
Beun <i>et al.</i> (2000b)	Pulso, anóxico	4.5	20	0.16 (0.01)	0.063 (0.005)	0.4 (0.04)
		6.3	20	0.17 (0.02)	0.064 (0.01)	0.4 (0.11)
Carta <i>et al.</i> (2001)	Pulso, aeróbio	6.3	20	0.29	0.17	0.6
	Pulso 5 x maior, aeróbio		20	0.29	0.28	0.9
Krishna e Van Loosdrecht (1999)		2.5	15	0.22	0.13	0.6
	Descontínua 55 min, aeróbio	2.5	20	0.25	0.14	0.6
		2.5	25	0.26	0.13	0.5
		2.5	30	0.30	0.063	0.2
		2.5	35	0.43	0.060	0.1
Majone <i>et al.</i> (1998)	Pulso, aeróbio	3	25	0.43	0.26	0.6
		3	25	0.11	0.04	0.4
Van Aalst-van Leeuwen <i>et al.</i> (1997)	Pulso, aeróbio	0.5	37	0.91	0.25	0.3

(a) Pulso: adição de substrato em 3 min.

(b) n.d.: não determinado.

Em alguns ensaios, o acetato foi fornecido por pulso (Beun *et al.*, 2000a e b; Carta *et al.*, 2001). Noutros casos foi fornecido continuamente durante cerca de 40% do tempo total do ciclo (Krishna and van Loosdrecht, 1999 e este estudo). Nos ensaios de Carta *et al.* (2001) a alimentação era uma mistura de acetato e glucose, resultando no armazenamento de PHB e glicogénio. As taxas de consumo de acetato e de consumo de PHB nos trabalhos de Krishna e van Loosdrecht (1999) não eram máximas porque foram limitadas pela taxa de adição de acetato inerente à alimentação descontínua (55 min). Valores semelhantes foram obtidos no presente estudo, com alimentação descontínua de 115 min.

A observação dos resultados registados na tabela 3.3 permite verificar que a taxa específica de produção de PHB é maior em alimentação pulsada que em alimentação descontínua, o que vem confirmar que o processo de armazenamento intracelular de PHB é favorecido pelas condições dinâmicas de fornecimento de carbono. Por outro lado, as condições aeróbias são mais favoráveis ao processo de armazenamento de carbono que as condições anóxicas: verificam-se taxas específicas de armazenamento de PHB maiores na presença de oxigénio.

Em condições aeróbias, a razão da produção de PHB pelo consumo de acetato tem experimentalmente um valor mais ou menos constante de 0.6 mol/mol. Em condições anóxicas este valor baixa para 0.4 a 0.5 mol/mol. No presente estudo, obteve-se um valor de 0.7 mol/mol, próximo do obtido por Beun *et al.* (2002), embora este valor tenha sido resultado de ensaios com alimentação pulsada e em condições de elevada concentração de substrato. Os ensaios levados a cabo por estes autores foram conduzidos em condições muito específicas com o objectivo de estudar exclusivamente a cinética de produção de PHB. Não foi considerado, por exemplo o papel da remoção de azoto, tendo sido adicionado alitiureia (ATU) para inibir o efeito da nitrificação. Estes factores associados a possíveis erros experimentais, podem explicar o valor um pouco maior da razão da produção de PHB pelo consumo de acetato.

Neste sistema e com esta sequência de condições operatórias, o PHB é consumido em crescimento heterotrófico, o que não traz grandes vantagens para a remoção de azoto. Se o carbono intracelular pudesse ser aproveitado para melhorar a desnitrificação, introduzindo por exemplo, um período anóxico enquanto existe PHB disponível, o processo poderia ser melhorado. Neste caso particular, quando o PHB está acumulado nas células, não há ainda nitrato disponível na fase líquida para ocorrer a desnitrificação. O ideal seria implementar um modo operatório com períodos sucessivos aeróbios e anóxicos, na tentativa de aproveitar o carbono intracelular para a desnitrificação, e até reduzir o consumo de oxigénio.

3.2.2 Regime de alimentação contínua

Os ciclos do SBBR estudados com alimentação contínua eram constituídos por uma série de períodos consecutivos de arejamento e de mistura sem arejamento, mantendo o mesmo tempo total e de reacção. A concentração de oxigénio no interior da biomassa era indirectamente controlada pelo fornecimento de ar do tipo “ON/OFF”. Desta forma, as bolhas de ar distribuídas pelos dispersores de oxigénio garantiam a mistura homogénea do reactor. A redução do tempo arejamento para períodos muito curtos permitia assim a saturação da fase líquida com oxigenio, mantendo no entanto condições anóxicas nas camadas internas dos flocos de biomassa.

Efectuaram-se vários ensaios com tempos de arejamento e de mistura diferentes. As concentrações de amónio, nitrito e nitrato oscilavam acompanhando as variações no fornecimento de oxigénio. A figura 3.12 apresenta um perfil típico de concentrações destas espécies obtido em estado estacionário. Os perfis obtidos noutras condições estão representados no apêndice B.

O perfil de carbono não está representado na figura 3.12 porque não foi detectado acetato durante todo o ciclo. Embora as cargas de carbono e de azoto fossem as mesmas que no modo de alimentação descontínua, o caudal de alimentação era muito mais baixo, provavelmente inferior à taxa máxima de consumo de substrato. Em cada instante o acetato era consumido para crescimento e manutenção celular. A taxa de fornecimento de carbono não era suficiente para manter os níveis de biomassa anteriores, originando limitações de crescimento. Consequentemente a concentração de sólidos em suspensão baixou de 0.45 g/l no regime anterior para 0.25 g/l neste regime. Por esta razão, o tempo de retenção celular baixou de 16 dias no regime anterior para 11 dias em regime de alimentação contínua.

Dionisi *et al.* (2001) estudaram o efeito da duração da alimentação no armazenamento de polímeros de reserva em condições anóxicas. Observaram que velocidades de fornecimento de substrato inferiores à sua taxa máxima de consumo, favorecem o crescimento e a manutenção celular de microrganismos, originando quantidades de substrato na fase líquida muito baixas. Quando o substrato é fornecido num curto espaço de tempo com velocidades de fornecimento bastante superiores à sua taxa máxima de consumo, verifica-se a acumulação de carbono e os microrganismos que se desenvolvem são os que têm capacidade de armazenar carbono sob a forma de polímeros de reserva. Trabalhos anteriores de *Van den Eynde et al.* (1983) demonstraram que o tipo de alimentação (contínua ou intermitente) influencia a fisiologia dos microrganismos.

O ciclo monitorizado revela um perfil de oxigénio regular, com concentrações a oscilar entre 0 mg/l durante os períodos de mistura e 7.5 mg/l nos períodos arejados.

Uma característica importante destes perfis é a constância dos valores ao longo do ciclo: todas as espécies analisadas apresentaram no início e no fim do ciclo valores semelhantes, o que permite concluir que o sistema operava em estado estacionário.

A concentração de azoto sob a forma de amónio no início e no fim do ciclo era de cerca de 2.7 mg/l e 2.2 mg/l, respectivamente. O nitrito apresentava um valor de cerca 0.7 mg/l tanto no início como no fim do ciclo. Quanto ao nitrato, os valores eram de 10.3 mg/l e 11.0 mg/l no início e no final do ciclo, respectivamente.

Nos períodos arejados é notório o efeito da nitrificação na concentração de amónio e no perfil de pH: o amónio diminui e o pH acompanha a tendência. Consequentemente, a concentração de nitrato aumenta. O crescimento de biomassa heterotrófica também contribui para o consumo de amónio durante estes períodos.

Durante os períodos de mistura, o oxigénio é todo consumido. No entanto, a sua taxa de consumo parece não ser constante: nos primeiros minutos, o declive do perfil de oxigénio é maior seguindo-se um decréscimo mais lento. Este facto pode ser explicado com base nas limitações difusionais que ocorrem na biomassa. No início dos períodos de mistura, a concentração de oxigénio é elevada e permite a ocorrência de crescimento heterotrófico e de nitrificação. Em condições de excesso de carbono com limitações de oxigénio, a biomassa heterotrófica compete pelo oxigénio com a biomassa nitrificante e a nitrificação é preterida. Neste caso particular em que a taxa de fornecimento de carbono é baixa, a biomassa heterotrófica cresce com limitações de carbono, e não consome todo o oxigénio disponível. Este consegue penetrar até às camadas mais internas do biofilme e permitir a ocorrência da nitrificação. Quando a concentração de oxigénio já não é suficiente para penetrar em profundidade no biofilme (Third *et al.* (2003b) referem um valor de 2 mg/l abaixo da qual a nitrificação é inibida, mas este valor depende de muitos factores tais como a espessura do biofilme e a quantidade de carbono disponível), o oxigénio é apenas consumido para crescimento heterotrófico nas camadas mais externas do biofilme e na biomassa suspensa e consequentemente a taxa de consumo de oxigénio é menor.

Os processos de nitrificação e desnitrificação em simultâneo (SND) não parecem ocorrer neste tipo de ciclo. A SND ocorre normalmente em condições de abundância de carbono, quando se controla a concentração de oxigénio a um nível que simultaneamente permita a ocorrência de nitrificação e não iniba a desnitrificação.

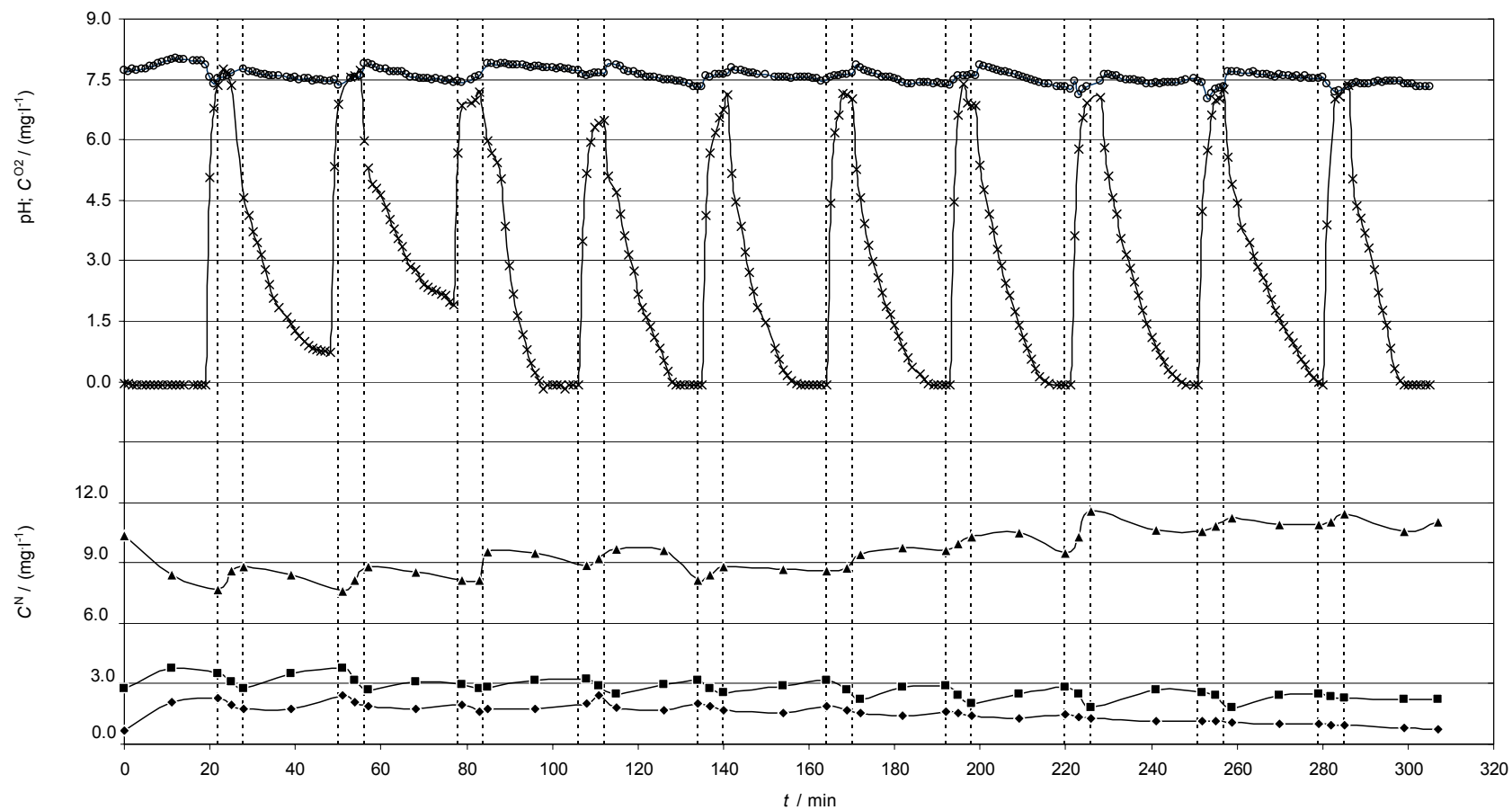


Figura 3.12 – Perfis de concentração de oxigénio (—x—), pH (—o—), amónio (—■—), nitrito (—◆—) e nitrato (—▲—) no reactor em regime de alimentação contínua, com $\Sigma t_A=60$ min e $\Sigma t_M=220$ min.

A taxa de fornecimento de carbono é um factor fundamental no processo de SND. O carbono fornecido deve ser suficiente para permitir o crescimento de biomassa heterotrófica com o oxigénio disponível, e para difundir no interior das camadas mais internas dos flocos de biomassa onde se reúnem as condições anóxicas, sendo consumido no processo de desnitrificação. No caso deste tipo de ciclo, o carbono fornecido é baixo, e por isso não é suficiente para difundir até às camadas internas dos flocos.

A partir de cerca de metade dos períodos de mistura, a concentração de oxigénio é nula, podendo considerar-se que o sistema atingiu condições anóxicas. Nestas condições, ocorre o processo de desnitrificação, com o conseqüente consumo de nitrato e de nitrito. A concentração de amónio aumenta devido à alimentação contínua e porque, sem oxigénio disponível, deixa de ser consumido por nitrificação.

O efeito da acumulação de polímeros de reserva em regime de alimentação contínua foi estudado pela análise de PHB e de PHV em amostras de biomassa suspensa e no biofilme durante um ciclo.

Em estado estacionário, o tipo de alimentação deste modo de operação não introduz condições dinâmicas no sistema relativamente ao carbono. Em cada instante, a quantidade de carbono disponível é baixa, e imediatamente consumida. Em nenhuma etapa estudada neste regime se verificou abundância de carbono na fase líquida que justificasse a acumulação de carbono intracelular. Não se previa por isso a presença significativa de polímeros de reserva nas células.

Efectuou-se a análise de PHB e de PHV em amostras de biomassa suspensa e no biofilme apenas durante parte de um ciclo, uma vez que não se previa acumulação significativa de carbono. Os perfis estão representados nas figuras 3.13 e 3.14.

Verificou-se na biomassa suspensa uma razão molar máxima de PHB de cerca de 0.015 mol/mol. Este valor foi muito inferior ao PHB residual obtido em regime de alimentação descontínua (0.04 mol/mol). Os valores para PHV são tão baixos que não têm qualquer significado físico.

O mesmo aconteceu na biomassa aderida, com valores máximos da razão molar de PHV de 0.004 mol/mol, inferiores ao valor de PHB residual (0.007 mol/mol) obtido no modo de alimentação descontínua.

Estes resultados sugerem, como era de prever que o regime de alimentação contínua não favorece o processo de acumulação de polímeros de reserva.

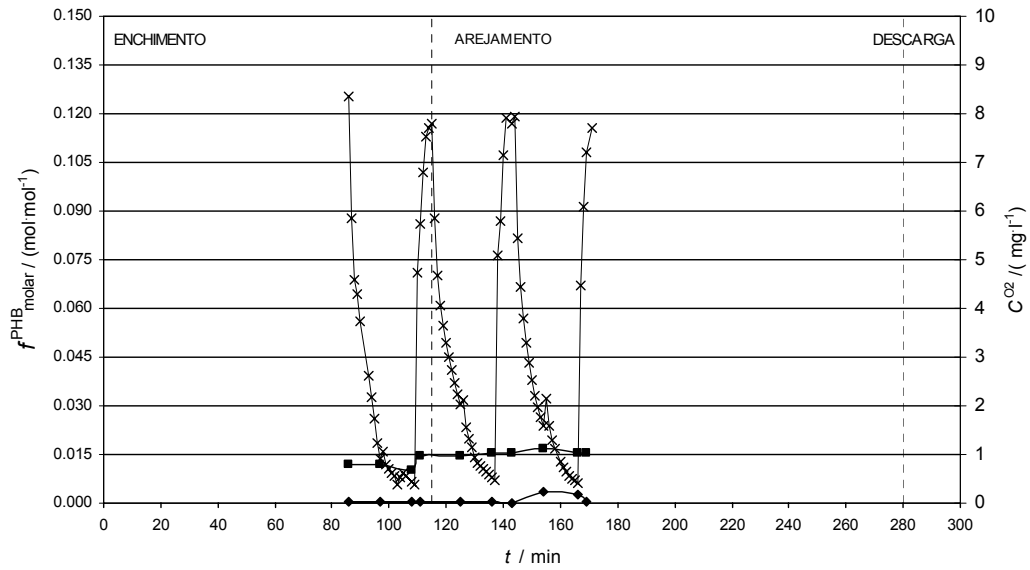


Figura 3.13 – Perfis de concentração de PHB (\blacksquare) e PHV (\blacklozenge) na biomassa suspensa, e respectivo perfil de O_2 (\times) , no reactor durante parte de um ciclo, em modo de alimentação contínua.

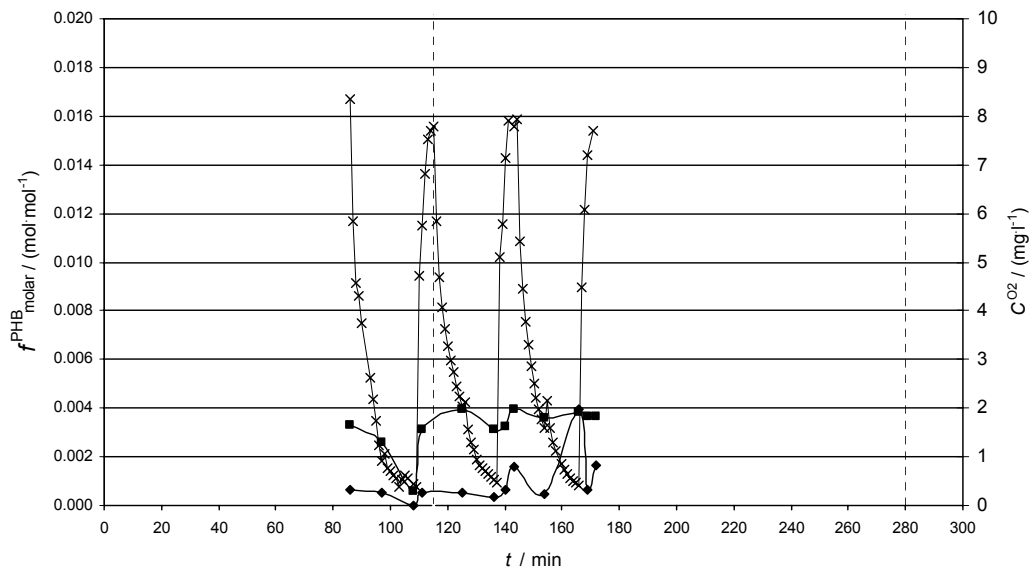


Figura 3.14 – Perfis de concentração de PHB (\blacksquare) e PHV (\blacklozenge) no biofilme, e respectivo perfil de O_2 (\times) , no reactor durante parte de um ciclo, em modo de alimentação contínua.

3.3 EFEITO DO OXIGÉNIO NA REMOÇÃO DE AZOTO

Estudou-se o efeito da concentração de oxigénio na remoção de azoto em regime de alimentação contínua, com o objectivo de determinar a mínima concentração de oxigénio que maximiza a remoção de azoto, e comparar com o regime de alimentação descontínua.

Efectuaram-se ensaios para diversas condições de arejamento ao longo de 156 dias. Iniciou-se o estudo com períodos de 10 min de mistura e 10 min de arejamento, correspondendo a 160 min de arejamento durante um ciclo. As alterações no sistema fizeram-se imediatamente sentir: aumentou a concentração de nitrato e diminuiu a concentração de amónio na fase líquida, revelando uma maior capacidade de nitrificação. Este facto era previsível uma vez que devido à baixa velocidade de fornecimento de carbono, as bactérias heterotróficas não tinham capacidade para competir pelo oxigénio com as bactérias nitrificantes. Por outro lado, a desnitrificação era baixa devido à ausência de condições anóxicas no interior do reactor, provocada pelo excesso de oxigénio.

A diminuição do tempo de arejamento para 50 min na etapa seguinte demonstrou favorecer o processo de desnitrificação, verificando-se um decréscimo na concentração de nitrato, mas com uma baixa percentagem de nitrificação.

No intuito de fortificar a biomassa autotrófica e assim aumentar a capacidade de nitrificação do sistema, efectuaram-se alguns ensaios com alimentação sem acetato.

Durante esse período, aumentou-se gradualmente o tempo de arejamento, tendo-se obtido taxas de nitrificação crescentes, como se pode verificar pela análise da figura 3.15.

Sem carbono no meio, as bactérias heterotróficas não têm condições para crescer, ficando todo o oxigénio disponível para o metabolismo das bactérias autotróficas. De facto, durante o período de alimentação sem acetato, verificou-se um decréscimo na biomassa em suspensão de 0.30 g/l para 0.12 g/l. Por outro lado, a massa de biofilme por peça de suporte também diminuiu de 9.3 mg no dia em que se retirou o carbono da alimentação, para 7.3 mg no final deste processo de enriquecimento. Este decréscimo revela que parte da biomassa aderida ao suporte era heterotrófica. A competição pelo oxigénio destes microrganismos com as bactérias autotróficas prejudica a actividade nitrificante e explica as baixas percentagens de nitrificação obtidas durante as etapas anteriores.

Introduzidas novamente as condições de alimentação iniciais com acetato, verificou-se uma redução brusca da concentração de amónio de 6.70 mg/l de N para 1.70 mg/l de N. O nitrato também baixou drasticamente de 29.8 mg/l de N para 0.7 mg/l de N em dois dias de operação com carbono. As bactérias heterotróficas ainda presentes no reactor foram sujeitas a um período prolongado de fome. Na presença do carbono imediatamente reiniciaram os seus

metabolismos de crescimento e de desnitrificação, consumindo amónio e nitrato. A concentração de sólidos em suspensão confirma o aumento da actividade de crescimento heterotrófico: verificou-se um aumento de 0.12 g/l para 0.25 g/l, seguindo-se um período aproximadamente constante.

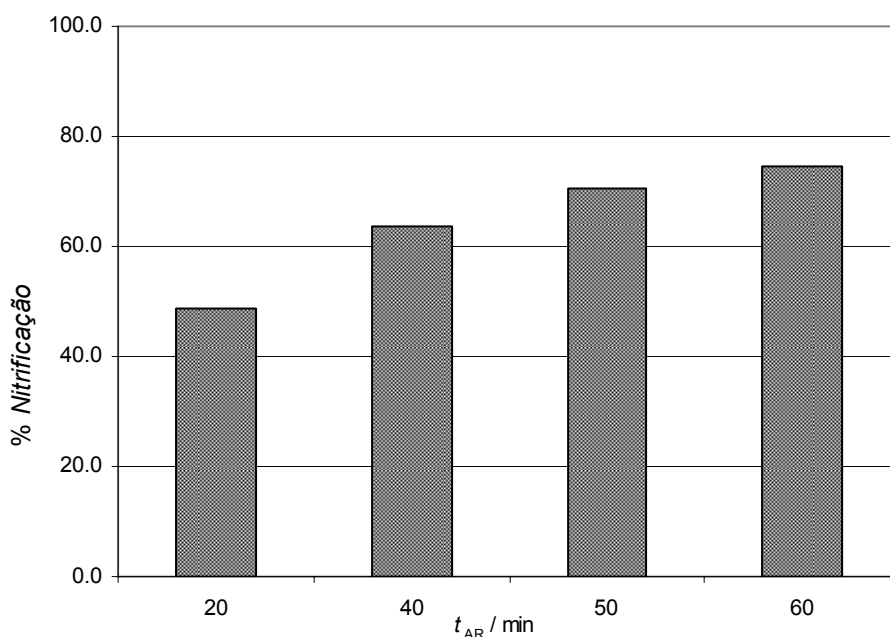


Figura 3.15 – Percentagens de nitrificação obtidas sem acetato na alimentação e com diferentes tempos de arejamento, para fortificação da biomassa autotrófica.

Com a manipulação da taxa de fornecimento de oxigénio, pretende-se reunir as condições que em estado estacionário permita obter um compromisso entre as taxas de nitrificação e de desnitrificação. Este compromisso traduz-se num valor percentual elevado de remoção de azoto, e permite obter descargas de azoto inferiores ao valor imposto pela a legislação vigente.

Em cada etapa, calcularam-se as taxas de nitrificação, desnitrificação e de remoção de azoto. A tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos em função dos tempos de arejamento. A metodologia de cálculo está descrita na secção 2.7.

A taxa máxima de nitrificação foi calculada considerando que este processo ocorre apenas durante os períodos arejados. No entanto, quando se corta o fornecimento de oxigénio, existe um pequeno período de tempo aeróbio, contabilizado no tempo de mistura. Como não é possível identificar o momento preciso em que a nitrificação pára, calculou-se uma taxa de nitrificação mínima considerando a duração total dos períodos arejados e de mistura. O valor

real da taxa de nitrificação situa-se entre a taxa mínima e a taxa máxima. Com o aumento dos períodos de arejamento, a capacidade de nitrificação aumenta. A taxa mínima de nitrificação também aumenta, uma vez que o tempo de reacção é aproximadamente constante em todos os ensaios. A variação da taxa máxima de nitrificação já não é tão previsível uma vez que o aumento da capacidade de nitrificação pode não acompanhar o aumento do tempo de arejamento.

Tabela 3.4 – Taxas de nitrificação, desnitrificação e remoção total de azoto em função do tempo de arejamento, nos ensaios efectuados em alimentação contínua com acetato.

Tempo de arejamento, min	Taxa de nitrificação mmol/(l·h)		Taxa de desnitrificação mmol/(l·h)	% Nitrificação	% Desnitrificação	% Remoção de N
	q_N^{\min}	q_N^{\max}	q_{DN}^{\min}			
Σt_{AR}						
20	0.075	1.076	0.065	17.0	13.4	43.6
50	0.210	0.686	0.277	27.0	24.0	54.2
60	0.266	1.243	0.225	58.8	39.0	69.2
160	0.270	0.559	0.207	66.1	24.5	54.8

No cálculo da taxa de desnitrificação foi apenas considerado o seu valor mínimo, usando a totalidade dos tempos de mistura, uma vez que não é possível identificar com rigor os períodos de tempo anóxicos.

A figura 3.16 apresenta graficamente os valores das percentagens de nitrificação, desnitrificação e remoção de azoto em todos os ensaios efectuados, em função do tempo de fornecimento de oxigénio registados na tabela 3.3.

A observação da figura 3.16 permite concluir que o aumento do fornecimento de oxigénio reflete-se num aumento da nitrificação, originando maior concentração de nitrato na fase líquida.

A desnitrificação também pode ser beneficiada com o aumento do tempo de arejamento devido à maior disponibilidade de nitrato produzido pela nitrificação. No entanto, esta tendência é invertida quando a quantidade de oxigénio é excessiva. A difusão do oxigénio nas camadas internas dos flocos da biomassa inibe a desnitrificação, uma vez que deixam de existir condições anóxicas (Beun *et al.* 2001). Havendo amónio disponível na fase líquida, o oxigénio é gasto em nitrificação, permitindo a criação de zonas anóxicas no interior dos grânulos de biomassa.

A remoção de azoto segue a mesma tendência que a desnitrificação, uma vez que este é o processo o que mais contribui para a remoção de azoto. O crescimento de biomassa

heterotrófica constitui a outra contribuição para a remoção de azoto. Com alimentação contínua e em regime de carbono limitante esta contribuição é aproximadamente constante de cerca de 30%.

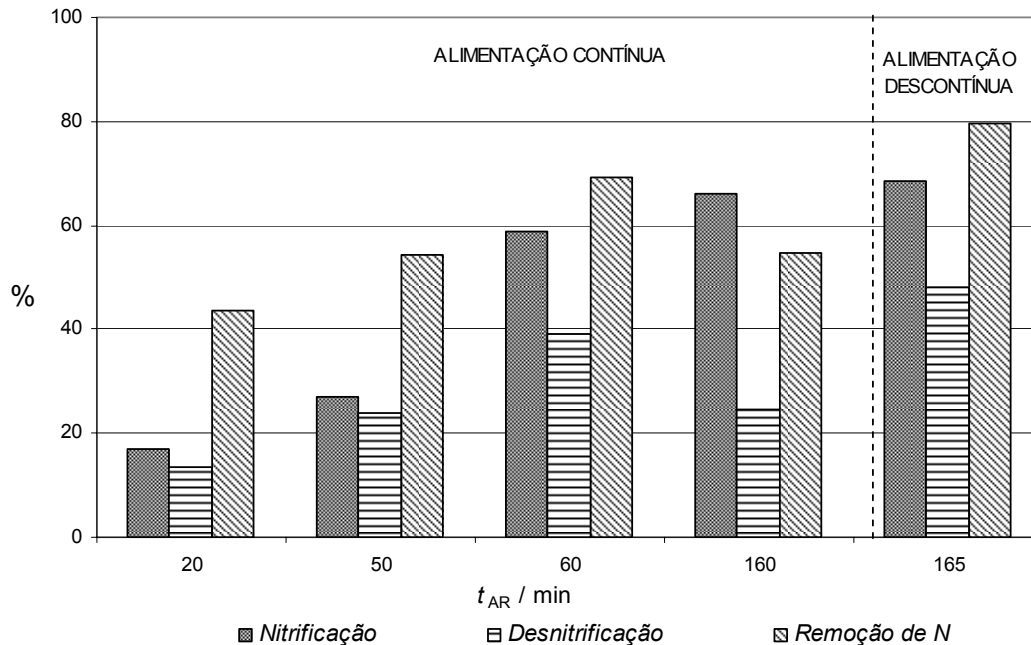


Figura 3.16 – Variação das percentagens de nitrificação, desnitrificação e remoção de azoto em todos os ensaios efectuados, em função do tempo de fornecimento de oxigénio.

Obteve-se um valor máximo de remoção de azoto de 69.2 % com 60 minutos de arejamento, dos quais 39.0 % por desnitrificação e 30.2 % por assimilação de biomassa. Maiores tempos de arejamento originaram remoções de azoto menos eficazes.

As condições mais favoráveis para a remoção de azoto foram obtidas em regime de alimentação descontínua: 75.7 % de remoção de azoto com 165 minutos de arejamento, dos quais 43.6% por desnitrificação e 32.1% por assimilação de biomassa. No entanto, o consumo de oxigénio foi maior que no modo de fornecimento oscilante com alimentação contínua.

Apesar do tempo de mistura ser menor que nos ensaios efectuados com alimentação contínua, o período de tempo em que o reactor esteve em condições anóxicas (oxigénio nulo) foi maior, o que favoreceu a desnitrificação nos ensaios de alimentação descontínua.

Alguns autores estudaram o efeito do fornecimento de oxigénio por oscilação de elevada frequência (HFO), em sistemas de remoção de azoto (Villaverde *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999). Estes estudos foram levados a cabo em condições de baixa concentração de oxigénio (até 2 mg/l) e com oscilações até 1 mg/l, com o objectivo de otimizar o processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (SND). Zhao *et al.*,(1999)

obtiveram percentagens de desnitrificação de cerca de 50 % do azoto fornecido num reactor contínuo com arejamento intermitente a baixas concentrações de oxigénio dissolvido (0.6 mg/l, fornecido em impulsos de 8 min). O mesmo sistema em condições de arejamento total apresentava 15% de desnitrificação.

No presente estudo, em condições de oscilação de fornecimento de oxigénio, obtiveram-se percentagens de desnitrificação de 39 %, um pouco inferiores aos valores apresentados no trabalho de Zhao *et al.* (1999), mas com a vantagem de utilizar o oxigénio fornecido como força motriz da mistura do sistema.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO

CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO

O SBBR demonstrou ser um sistema eficaz na remoção de azoto, permitindo elevadas percentagens de remoção de azoto fornecido. A biomassa autotrófica, de crescimento lento, aderida ao suporte origina elevados tempos de retenção celulares, permitindo obter maiores taxas de nitrificação. No entanto, é fundamental a manipulação das condições processuais dos SBBR para a optimização da remoção de azoto.

Estudou-se o efeito do tipo de alimentação e da quantidade de oxigénio fornecido no rendimento do processo.

A maior percentagem de remoção de azoto obtida foi de 75.7 % em condições de alimentação descontínua. Nestas condições verificou-se um armazenamento de cerca de 70% de carbono sob a forma de PHB. Este carbono armazenado foi consumido em condições aeróbias para produção de biomassa heterotrófica. A mais valia do carbono intracelular é o facto de constituir um interessante poder reductor para o processo de desnitrificação, quando não existe mais acetato disponível na fase líquida. Para isso, as condições de arejamento devem ser rigorosamente controladas de forma a implementar condições anóxicas para a desnitrificação, e conseqüente remoção de azoto. Este tipo de metodologia operacional tem a grande vantagem de reduzir a produção excessiva de lamas, para além de eliminar a necessidade de adição de fonte externa de carbono no processo de nitrificação/desnitrificação convencional. Neste estudo, o reactor tal qual foi projectado usava a dispersão do oxigénio com força motriz para garantir a homogeneização da fase líquida e do leito de suportes. A redução do caudal de fornecimento de oxigénio implicaria uma deficiente mistura do sistema. Por outro lado, o controlo rigoroso da concentração de oxigénio na corrente de arejamento implica a diluição da corrente de ar com azoto, o que torna o processo economicamente inviável. Apesar de tudo, este modo de funcionamento foi o que demonstrou maior eficácia na remoção de azoto, com uma descarga de azoto total de 6.9 mg/l. Tendo em conta os valores mais baixos exigidos pelo Dec. Lei 152/97 para descargas em zonas consideradas sensíveis (10 mg/l de azoto total), pode-se considerar que este processo tem um excelente desempenho.

O processo com alimentação contínua parece ser menos eficaz: a maior remoção de azoto obtida nestas condições foi de 69.2 %. Não se detectou a presença de polímeros de reserva durante todo o processo. A alimentação contínua não promove condições dinâmicas na concentração de carbono no reactor, condição fundamental para o armazenamento de polímeros de reserva. No entanto este tipo de processo é muito interessante do ponto de vista económico porque permite o tratamento de águas residuais de baixos caudais, com um único tanque, e com taxas de remoção de azoto próximas de 70 %. Este processo originou um

caudal de descarga de azoto total de cerca de 14.0 mg/l, inferior ao requisito exigido pelo Dec. Lei 152/97 para cargas orgânicas inferiores a 10000 e.q.

O estudo do efeito do oxigénio permitiu concluir que o aumento do tempo de arejamento favorece o processo de nitrificação, mas quando em excesso inibe a desnitrificação, e consequentemente a remoção de azoto. A melhor remoção de azoto foi obtida com períodos de 6 minutos de arejamento e de 22 minutos de mistura, num total de 60 minutos de arejamento e de 220 minutos de mistura por ciclo. Maiores tempos de arejamento originaram maiores percentagens de nitrificação, mas menores percentagens de desnitrificação e de remoção de azoto. Este pressuposto traz grandes vantagens económicas uma vez que o consumo de oxigénio constitui um dos maiores custos de operação nos sistemas de tratamento de águas residuais.

O *up-grade* de sistemas de lamas activadas para reactor sequenciais descontínuos com biofilmes em regime de alimentação contínua surge como uma solução viável para as estações de tratamento de águas residuais existentes, tendo em conta as restrições legais de descarga de azoto em aquíferos impostas pelo Dec. Lei 352/98. No entanto impõem-se estudos mais detalhados para melhor prever o processo e aproximá-lo da realidade. Sugerem-se alguns trabalhos futuros:

- Minimizar o fornecimento de oxigénio em regime de alimentação descontínua, de forma a tirar maior partido do carbono intercelular armazenado: alterar o sistema de mistura do reactor de forma a poder aproveitar o PHB para desnitrificação;
- Estudar o efeito das variações de concentração e de caudal na alimentação, em regime de alimentação contínua;
- Implementar o sistema com uma alimentação constituída por efluente real doméstico;
- Implementar o processo à escala piloto.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Andreasen K. and Nielsen P. H. 2000. Growth of *Microthrix Parvicella* in nutrient removal activated sludge plants: Studies of in situ physiology. *Water Research* **34** (5), 1559-1569.

Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam T. B. S. and Srinath, E. G. 1976. Inhibition of nitrification by ammonium and nitrous acid. *Journal of Water Pollution and Control Federation* **48**, 835-852.

APHA. 1989; Standard methods for the examination of water and wastewater, 17th ed.

Bamelle B., Nguyen K. M., Capdeville B., Cornier J. C., Deguin A. 1992. Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. *Water Science and Technology* **26** (5-6), 1017-1025.

Beccari M., Dionisi D., Giuliani A., Majone M, Ramadori R. 2002. Effect of different carbon sources on aerobic storage by activated sludge. *Water Science and Technology* **45**, 157-168.

Beun J.J., Paletta F., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. 2000a. Stoichiometry and kinetics of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **67** (4), 379-388.

Beun J.J., Verhoef E.V., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. 2000b. Stoichiometry and kinetics of poly- β -hydroxybutyrate metabolism under denitrifying conditions in activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **68** (5), 496-507.

Beun J.J., Heijnen J.J. and van Loosdrecht M.C.M. 2001. N-removal in a granular sequencing batch airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **75** (1), 82-92.

Beun J.J., Dircks K., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. 2002. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. *Water Research* **36**, 1167-1180.

Campos J.L., Alves C.F. and Brito A.G. 2000. Study of different supports in a SBBR. in Proceedings of 2nd International Symposium on Sequencing Batch Reactor Technology, II, 51-54; 10-12 Julho; Narbonne, França.

Carta F., Beun J.J., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. 2001. Simultaneous storage and degradation of PHB and Glycogen in activated sludge cultures. *Water Research* **35** (11), 2693-2701.

Carucci A., Dionisi D., Majone M., Rolle E. and Smurra P. 2001. Aerobic storage by activated sludge on real wastewater. *Water Research* **35** (16), 3833-3844.

Comett I., Gonzalez-Martinez S. and Wilderer P. 2004. Treatment of leachate from anaerobic fermentation solid wastes using two biofilm support media. *Water Science and Technology* **49** (11), 287-294.

Christensson M. and Welander T. 2004; Treatment of municipal wastewater in a hybrid process using a new suspended carrier with large surface area. *Water Science and Technology* **49** (11), 207-214.

Chudoda J., Dohanyos M. and Grau P. 1985. Control of activated sludge filamentous bulking. Experimental verification of a kinetic selection theory. *Water Research*, **19** (2), 192-196.

Conselho da União Europeia (1991), Directiva nº 91/271/CEE do Conselho de 30 de Maio de 1991 relativa ao tratamento de águas residuais. *Jornal Oficial* nº L **135** de 30/05/1991.

Demoulin G., Rüdiger A. and Goronsky M.C. 2001. Cyclic activated sludge technology – recent operating experience with a 90,000 p.e. plant in Germany. *Water Science and Technology* **43** (3), 331-337.

Demuyne C., Vanrolleghem P., Mingneau C., Liessens J. e Verstraete W. 1994. NDBEPR process optimization in SBRs: Reduction of external carbon source and oxygen supply. *Water and Science Technology* **30** (6), 37-43.

Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de Junho. Tratamento de águas residuais urbanas. *Diário da República – I Série-A* **139** de 19/06/1997, 2959-2966.

Decreto-Lei nº 149/2004 de 22 de Junho. Altera o Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de Junho, *Diário da República – I Série-A* **145** de 22/06/2004, 3805-3809.

Dircks K., Henze M. van Loosdrecht M.C.M., Mosbaek H. e Aspergren H. 2001. Storage and degradation of poly- β -hydroxybutyrate in activated sludge under aerobic conditions. *Water Research* **35** (9), 2277-2285.

Dionisi D., Majone M., Papa V. and Beccari M. 2004. Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. *Biotechnology and Bioengineering*, **85** (6), 569-579.

Dionisi D., Majone M., Ramadori R. e Beccari M. 2001. The storage of acetate under anoxic conditions. *Water Research* **35** (11), 2661-2661.

Dold P.L. and Marais G.V.R. 1987. Benefits of including unaerated zones in nitrifying activated sludge plants. *Water Science and Technology* **19** (1-2); 195-207.

Fdz-Polanco F., Garcia P. and Villaverde S. 1994. Temperature effect over nitrifying bacteria activity in biofilters: activation and free ammonia inhibition. *Water Science and Technology* **30**, 121-130.

Garrido J. M., van Benthum W. A. J., van Loosdrecht M. C. M., and Heijnen J. J. 1997. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. **53**, 168-178.

Grady C.P.L. and Daigger G. T., Lim H. C. 1999. Biological Wastewater treatment. 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc.

Hao X., Heijnen J. J. and van Loosdrecht M. C. M. 2002. Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnology and Bioengineering*. **77** (3), 265-277.

Hao O. L. and Huang J. 1996. Alternating aerobic-anoxic process for nitrogen removal: Dynamic modelling. *Water Environmental Research*. **68** (1), 83-93.

Heijnen J. J. Advanced Course in Environmental Biotechnology, Chapter 1: Mass and energy balances in microbial growth, Universidade Técnica de Delft (Holanda), 20–29 de Junho, 2001.

Hellinga C., Schellen A.A.J.C., Mulder J.W., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. 1998. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology* **37**, 168-178.

Henze M., Harremoes P., Jansen J.C. and Arvin E. 1995. Wastewater Treatment – Biological and Chemical Processes; Springer Verlage, Berlin.

Hollender J., van Derkrol D., Kornborger L., Greden E. and Dott W. 2002. Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphate removal in a sequencing batch reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18** (4), 355-360.

Hornthvedt B. R., Rambeck M. and Bakke R. 1998. Oscillating conditions for influencing the composition of mixed biological cultures. *Water Science and Technology* **37** (4-5), 259-262.

Irvine R. L. and Ketchum Jr. L. H. 1997. Sequencing batch reactor for biological wastewater treatment. *C.R.C. Critical Review in Environmental Control*, **18**, 225.

Jetten S. M., Logeman S. M., Muyzer G., de Vries S., van Loosdrecht M. C. M., Robertson L. A. and Kuenen J. G. 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Anthonie van Leewenhock*, **71**; 75-93.

Jetten M. S. M., Strous M., Schoonen K. T., Schalk J., van Dongen L. G. J. M., van de Graaf A. A., Logeman S., Muyzer G., van Loosdrecht M. C. M. e Kuenen J. G. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 421-437.

Jetten S. M., Schmid M., Schmidt I., Wubben M., van Dongen U. Abma W., Sliemers O., Revsbech N. P., Beaumont H. J. E., Ottosem L., Volcke E., Laanbroek H. J., Campos-Gomez J. L., Cole J., van Loosdrecht M. C. M., Mulder J. W., Fuerst J., Richardson D., van de Pas K., Mendez-Pampin R., Third K., Cirpus I., van Spanning R., Bollman A., Nielsen L., Op den Camp H., Schultz C., Gundersen J., Vanrolleghem P., Strous M., Wagner M e Kuenen G. 2002. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Reviews in Environmental Science & BioTechnology*. **1**, 51-63.

Kato M., Bao H.J., Kang C.K., Fulkui T. and Doi Y.; 1996; Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Applied. Microbiology and Biotechnology*, **45**, 363-370.

Krishna C. and van Loosdrecht M.C.M. 1999. Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. *Water Research* **33**, 2374-2382.

Lemos P. C, Viana C., Salgueiro E. N, Ramos A. M, Crespo J. P. S. G and Reis A. M. M. 1998. Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture. *Enzyme Microbiology and Technology* **22**, 662-671.

Majone M., Massanisso P., Carucci A., Lindrea K. and Tandoi V. 1996. Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking. *Water Science and Technology* **34** (5-6), 223-232.

Majone M., Massanisso P. and Ramadori R. 1998. Comparison of carbon storage under aerobic and anoxic conditions. *Water Science and Technology* **38** (8-9), 77-84.

Majone M., Dircks K. and Beun J.J. 1999. Aerobic storage under dynamic conditions in activated sludge processes. The state of the art. *Water Science and Technology* **39** (1), 61-73.

Martins A. M. P., Pagilla K., Heijnen J. J. and van Loosdrecht M. C. M. 2004. Filamentous bulking sludge - a critical review. *Water Research* **38**, 793-817.

McSwain B.S., Irvine R.L. and Wilderer P.A. 2004. The effect of intermittent feeding on aerobic granule structure. *Water Science and Technology* **49** (11), 19-25.

Mulder J. W., van Loosdrecht M. C. M., Hellinga C. and van Kempen R. 2001. Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water and Science Technology* **43**, 127-134.

Münch E.V., Lant P.A. and Keller J. 1996. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactor. *Water Research* **30** (2), 277-284.

Nielsen M., Bollman A. Sliemers O. Jetten M., Schmid M., Strous M., Schmidt I., Larsen L. H., Nielsen L. P. and Revsbech N. P. 2005. Kinetics, diffusional limitations and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor. *FEMS Microbiology Ecology*. **51** (2), 247-256.

- Orhon D. and Artan N. 1994. Modelling of activated sludge systems. Technomic Pub. Comp. Inc.
- Okabe S., Hiratia K., Ozawa Y. and Watanabe Y. 1996. Spatial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **50**, 24-35.
- Pochana K. and Keller J. 1999. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Science and Technology* **39** (6), 61-68.
- Reddy M., Andryszak B. and Atoulikian R., 1998. Biological and Chemical Systems for nutrient removal; a special publication prepared by the Task Force on biological and chemical systems for Nutrient Removal; Water Environment Federation.
- Rees G. N., Vasiliadis G., May J. W. and Bayly R. 1992. Differentiation of polyphosphate and poly- β -hydroxybutyrate granules in an *Acinetobacter* sp. isolated from activated sludge. *FEMS Microbiology Letters* **94**, (1-2), 171-173.
- Reis A.M.C., Serafim L.S., Lemos P.C. and Ramos A.M. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by mixed microbial cultures; *Bioprocess Biosystem Engineering* **25**; 377-385.
- Roels J.A. 1983. Energetics and kinetics in biotechnology. New York. Elsevier.
- Saito Y., Soejima T., Tomozawa T., Doi Y. and Kiya F. 1995. Production of biodegradable plastics from volatile acids using activated sludges. *Environmental Systems Engineering* **52**, 145-154.
- Salehizadeh H. and van Loosdrecht M.C.M. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed cultures: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances* **22**, 261-279.
- Sasaki K., Yamamoto Y., Tsumura K., Hatsumata S., Tatewaki M. 1993. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus in an intermittently aerated 2-tank activated sludge process using DO and ORP-bending-point control. *Water Science and Technology* **28** (11-12), 513-521.
- Sasaki, K., Yamamoto, Y., Tsumura, K., Ouchi, S., Mori, Y. 1996. Development of 2-reactor intermittent-aeration activated sludge process for simultaneous removal of nitrogen and phosphorus. *Water Science and Technology* **34** (1-2), 111-118.
- Satoh H., Mino T. and Matsuo T. 1992. Uptake of organic substrate and accumulation of hydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in biological excess phosphorous removal process. *Water Science and Technology* **26**, 933-942.
- Smolders G.J.F., Vander Meij J., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. 1994. Model of anaerobic metabolism of biological phosphorous removal processes: stoichiometry and pH influence. *Biotechnology Bioengineering* **43**, 461-470.
- Strous M., van Gerven E., Zheng P., Kuenen J. G. and Jetten M. S. M. 1997. Ammonium removal from ammonium-rich waste streams with the Anammox process. *Water Research* **31**, (8), 1955-1962.
- Schmidt I., Sliekers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J. G., Jetten M. S. M. and Strous M. 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews* **27** (4), 481-492.
- Teichgräber B., Sreff D., Ekkerlein C. and Wilderer P.A. 2001. SBR technology in Germany – an overview. *Water Science and Technology* **43** (1), 323-330.

Third K.A., Newland N., Burnett N. and Cord-Ruwisch R. 2003a. The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **82** (2), 238-250.

Third K.A., Burnett N. and Cord-Ruwisch R. 2003b. Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (PHB) as electron donor in an SBR. *Biotechnology and Bioengineering* **83** (6), 706-720.

Thomsen J. K., Geest T., Cox R. P. 1994. Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*. **60** (2), 536-541.

Tijhuis L., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. 1994. Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnology and Bioengineering* **44**, 595-608.

Tomei M.C., Di Iaconi C., Di Pinto A.C., Mappa G. and Ramadori R. 1996. Development of an expert system for nitrogen removal control. *Water Pollution Control* **6**, 45-50.

Turk, K., Manovic D. S.. 1989. Stability of nitrite build-up in an activated sludge system. *Journal of Water Pollution Control Federation*. **61**, 1440-1448.

Van Aalst-van Leeuwen M.A., Pot M.A., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. 1997. Kinetic modelling of poly(β -hydroxybutyrate) production and consumption by *Paracoccus pantrophus* under dynamic substrate supply. *Biotechnology and Bioengineering* **55**, 773-782.

Van Benthum W. A. J., van Loosdrecht M. C. M., and Heijnen J. J. 1997. Control of heterotrophic layer formation on nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **53**, 397-405.

Van den Eynde E., Geerts J., Maes B. and Verachtert H. 1983. Influence of feeding pattern on the glucose metabolism of *Arthrobacter* sp. and *Sphaerotilus natans*, growing in chemostat culture, simulating activated sludge bulking. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **17**, 35-43.

Van Dongen U., Jetten M. S. M. and van Loosdrecht M. C. M. 2001. The Sharon-Anammox process for the treatment of ammonium rich wastewater. *Water and Science Technology* **44**, 153-160.

Van Loosdrecht M.C.M., Pot M.A. and Heijnen J.J. 1997. Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Water Science and Technology* **35** (1), 41-47.

Van Loosdrecht M. C. M. e Jetten M. S. M. Method for treating ammonia-comprising wastewater. Patent PCT/NL97/00482.

Van Loosdrecht M.C.M., van Benthum W.A.J., and Heijnen J.J. 2000. Integration of nitrification and denitrification in biofilm airlift suspension reactors. *Water Science and Technology* **41** (4-5), 97-103.

Villaverde S., Fernandez M. T., Uruena M. A., Fdz-Polanco F. 1997. Influence of substrate concentration on the growth and activity of a nitrifying biofilm in submerged biofilters. *Environmental Technology*. (18). 921-928.

Villaverde S., García P. A., Lacalle M. L. e Fdz-Polanco F. 2000. New operational strategy for SBR technology for total nitrogen removal from industrial wastewater highly loaded with nitrogen. *Water and Science Technology* **41**, (12), 85-93.

Villaverde S. 2004. Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*. **3**, 171-183.

Weon S-Y., Lee C-W., Lee S-I. and Koopman B. 2002. Nitrite inhibition of aerobic growth of *Acenitobacter* sp. *Water Research*. **36** (18), 4471-4476.

Wilderer P.A., Irvine R.L. and Doellerer J. 1997. Sequencing batch reactor technology-batch application of periodic processes. *Water and Science Technology* **35** (1), 278.

Wilderer P.A., Irvine R.L. and Goronsky M.C. 2001. Sequencing batch reactor technology. *IWA Scientific and Technical Report n° 10*. IWA Publishing. London UK.

Yoo H., Ahn K.H., Lee H.J., Lee K.G., Kwak Y.j. and Song K.G. 1999. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Water Research.*, **33**, (1), 145-154.

Zhao H. W., Mavinic D. S., Oldham W. K., and Koch F. A. 1999. Controlling factors for simultaneous nitrification and denitrification in a two-stage intermittent aeration process treating domestic sewage. *Water Research*. **33**, (4), 961-977.

Zeng R.J., Lemaire R., Zhiguo Y., Keller J. 2003. Simultaneous nitrification and denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **84** (2), 170-178.

APÊNDICES

APÊNDICE A

METODOLOGIAS ANALÍTICAS

1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES SEGUNDO VISHNIAC E SANTER

Material:

- Medidor de pH de bancada;
- Matraz de 1000 ml;
- Vareta de vidro;
- Placa de agitação magnética;
- Barra de agitação magnética;
- Balão de 1000 ml.

Reagentes e procedimento:

Para 1l de solução, pesar:

- 6.31 g de cloreto de cálcio dihidratado; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 5.06 g de cloreto de manganês tetrahidratado; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;
- 5.00 g de sulfato de ferro heptahidratado; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 1.10 g de heptmolibdato de amônio tetrahidratado; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;
- 55.4 g de EDTA; $\text{AEDTHNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 1.57 g de sulfato de cobre pentahidratado, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- 1.57 g de cloreto de cobalto (II) hexahidratado, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- 1.04 g de cloreto de zinco, ZnCl_2 ;

Misturar os reagentes num matraz e adicionar 600 ml de água destilada.

Adicionar NaOH sólido até obter pH = 6. A cor final da solução é verde escura.

Transferir para um balão de diluição de 1000 ml e perfazer o volume com água destilada. Guardar no frigorífico.

Nota:

Inicialmente os reagentes não se dissolvem. À medida que se vai adicionando NaOH, consegue-se uma mistura solúvel.

A solução é inicialmente verde e muda de cor para castanho ao fim de alguns dias, mas a sua validade mantém-se.

2. CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO (CQO) – SM5220 (APHA, 1989).

Material:

- Tubos de digestão em borossilicato 16 mm x 100 mm com rolhas roscadas revestidas a Teflon;
- Bloco de aquecimento de liga de alumínio, com 45 mm a 50 mm de altura e com aberturas de tamanho suficiente para se ajustarem aos tubos de digestão, capaz de operar a $150^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Reagentes:

- Solução de digestão de dicromato de potássio 0.0167 M: adicionar a aproximadamente 500 ml de água destilada, 4.913 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, reagente de grau 1, previamente seco a 105°C durante 2 h, 167 ml de H_2SO_4 concentrado e 33.3 g de HgSO_4 . Dissolver, deixar arrefecer até à temperatura ambiente e diluir a 1000 ml com água destilada;
- Reagente de ácido sulfúrico: adicionar Ag_2SO_4 puro, em cristais ou em pó, a ácido sulfúrico concentrado, na proporção de 5.5 g de Ag_2SO_4 por kg de H_2SO_4 . Deixar em repouso 1 ou 2 dias para dissolver o Ag_2SO_4 ;
- Indicador de ferroína: dissolver 1.485 g de monohidrato de fenantrolina e 695 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em água destilada e diluir até 100 ml (de preferência este indicador deve ser comprado já preparado);
- Solução titulante de sulfato de amónio ferroso (FAS) ≈ 0.10 M: dissolver 39.2 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em água destilada. Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. Arrefecer e diluir até 1000 ml com água destilada Padronizar a solução diariamente com a solução de digestão;
- Solução padrão de hidrogenoftalato de potássio (KHP): triturar lentamente e depois secar a 120°C até peso constante o hidrogenoftalato de potássio ($\text{HOOC}_6\text{H}_4\text{COOK}$). Dissolver 212.5 mg em água destilada e diluir a 1000 ml com água destilada. O KHP tem CQO teórica de 1.176 mg de O_2 por mg de KHP, e a solução anterior tem uma CQO teórica de 250 mg/l. Esta solução é estável durante 3 meses se for guardada num frigorífico, e se não fôr visível desenvolvimento biológico.

Procedimento:

A amostra deve conter um valor de CQO inferior a 250 mg de O_2 por litro. Efectuar diluições caso necessário. Analisar em duplicado.

Lavar os tubos de digestão e as rolhas com H₂SO₄ a 20 % antes de serem usados pela 1ª vez para evitar a contaminação.

Colocar 2.5 ml de amostra no tubo e adicionar 1.5 ml de solução de digestão. Medir cuidadosamente 3.5 ml de reagente de ácido sulfúrico. Esta mistura é extremamente exotérmica e merece todo o cuidado para evitar eventuais queimaduras do operador. Rolhar os tubos e agitar no vortex até homogeneização completa da mistura. Colocar os tubos no bloco de aquecimento pré-aquecido a 150 °C e deixar refluxar durante 2 h. Arrefecer à temperatura ambiente e colocar os tubos no suporte.

Transferir o conteúdo de cada tubo para um goblé para titulação (verter completamente e lavar o tubo quantitativamente com água destilada). Adicionar uma ou duas gotas de indicador de ferroína e uma barra de agitação magnética. Proceder à titulação com FAS 0.1 M num agitador magnético. O ponto de viragem é detectado pela mudança de cor de azul esverdeado para castanho avermelhado.

Proceder do mesmo modo para o branco que contém os reagentes e um volume de água destilada igual ao da amostra, bem como para uma ou duas soluções padrão de KHP. Para padronizar a solução de FAS titular uma mistura igual ao branco sem digestão.

Nota:

Usar luvas durante todo o ensaio.

Usar uma protecção para o rosto e proteger as mãos do calor produzido enquanto agitar o conteúdo dos tubos. Antes de ligar o aquecimento, homogeneizar cuidadosamente a mistura a refluxar para evitar o aquecimento local no fundo do tubo e a eventual projecção do conteúdo do tubo.

A concentração de matéria orgânica, expressa em mg/l (O₂) é calculada pela equação A.1:

$$CQO = \frac{(A - B) \times M \times 8000}{V} \quad (\text{eq. A.1})$$

$$\text{Com : } M = \frac{C \times 0.10}{D} \quad (\text{eq. A.2})$$

CQO: Carência Química de Oxigénio, em mg O₂ /l;

A: volume de solução FAS usado para titular o branco, em ml;

B: volume de FAS usado para titular a amostra, em ml;

M: molaridade da solução de FAS;

V: Volume de amostra em ml;

C: volume de solução de $K_2Cr_2O_7$ 0.0167 M titulada, em ml;

D: volume de solução de FAS gasto na titulação, em ml.

3. SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS (SST) E SÓLIDOS SUSPENSOS VOLÁTEIS (SSV) - SM2540 D/E (APHA, 1989).

Material:

- Estufa de secagem a 105 °C;
- Mufla a 550 °C +/- 50 °C;
- Excicador;
- Balança analítica;
- Sistema de filtração por vácuo com trompa de água;
- Filtros de fibra de vidro (Whatman GF/C ϕ 47 mm; cat nº 1822047);
- Cadinhos de alumínio;

Procedimento:

Efectuar as determinações em triplicado.

Lavar os filtros de fibra de vidro com 3 porções de 20 mL água destilada e colocá-los em cadinhos de alumínio previamente numerados.

Colocar na mufla o conjunto filtro+cadinho durante cerca de 30 min.

Retirar da mufla o cadinho com o filtro e deixar arrefecer num excicador até peso constante.

Pesar o conjunto cadinho + filtro (**A** gramas).

Colocar o filtro num sistema de filtração por vácuo e filtrar a amostra; o volume **V** da amostra deve ser tal que o resíduo total deve estar entre 2 mg e 200 mg.

Deixar secar na estufa a 105 °C o cadinho com o filtro até peso constante (variação < 4%). Colocar no excicador.

Pesar o cadinho com o filtro depois de arrefecer (**B** gramas).

Colocar o cadinho com o filtro na mufla a 550 °C +/- 50 °C durante 2 h.

Pesar o cadinho com o filtro após arrefecimento num excicador (**C** gramas). Calcular o valor dos sólidos pelas equações A.3 e A.4.

Cálculos:

$$SST = \frac{(B - A) \times 1000}{V} \quad (\text{eq. A.3})$$

$$SSV = \frac{(B - C) \times 1000}{V} \quad (\text{eq. A.4})$$

SST: sólidos suspensos totais, em g/l;

SSV: sólidos suspensos voláteis, em g/l;

A: massa do conjunto cadinho + filtro; em g;

B: massa do conjunto cadinho+ filtro + amostra seca na estufa, em g;

C: massa do conjunto cadinho+ filtro + amostra seca na mufla, em g;

V: volume de amostra filtrada em ml.

4. DETERMINAÇÃO DE BIOFILME ADERIDO NO SUPORTE.

Material:

- Estufa a 105 °C;
- Balança analítica;
- Cadinhos de porcelana;
- Excicador.

Procedimento:

Retirar do reactor duas peças de suporte com biofilme do reactor, colocá-las num cadinho de porcelana e levar à estufa a 105 °C até peso constante (de um dia para o outro).

Arrefecer num excicador e pesar numa balança analítica (**m1**).

Adicionar ao cadinho 5 mL de ácido cromosulfúrico 2 % CrO₃ (solução sulfocrómica) e deixar as peças em contacto com o reagente durante algumas horas até remoção total da biomassa. Se for necessário usar uma espátula.

Retirar a solução sulfocrómica do cadinho, lavar com um pouco de água destilada levar de novo à estufa a secar durante 12 h até peso constante.

Retirar da estufa, colocar no excicador e pesar novamente o conjunto (**m2**). A biomassa aderida por suporte é calculada pela equação A.5.

$$X_A = \frac{(m_1 - m_2)}{n} \quad (\text{eq. A.5})$$

X_A: biomassa aderida por suporte, mg/peça;

m₁: massa inicial do suporte em mg;

m₂: massa final do suporte em mg;

n: número de peças de suporte.

5. DETERMINAÇÃO DE AMÓNIO - SM4500 NH₃ C (APHA, 1989)

Material:

- Balança analítica;
- Estufa a 105 °C;
- Espectrofotómetro de UV/VIS (Unicam Hélios – type: hélios gamma);
- Sistema de filtração por vácuo com trompa de água;
- Filtros de fibra de vidro (Whatman GF/C ϕ 47 mm; cat nº 1822047);
- Cuvete de vidro.

Reagentes:

- Solução padrão de amónio (N-NH₄⁺) 1 g/l: dissolver 1.9095 g de NH₄Cl (previamente seco na estufa a 105 °C durante 1 h) em 500 ml de água destilada;
- Solução padrão de amónio intermédia (N-NH₄⁺) 10 mg/l: diluir a solução padrão de amónio de forma a obter a concentração de 10 mg/l. Ou seja, pipetar 5 ml de solução padrão de amónio para um balão volumétrico de 500 ml e perfazer o restante volume com água destilada.

Procedimento

Para o traçado da curva de calibração preparar, a partir da solução padrão de amónio intermédia, 6 soluções padrão com as seguintes concentrações de N-NH₄⁺: 0 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l; 3 mg/l; 4 mg/l; 5 mg/l.

Para uma porção de 5 ml de amostra previamente filtrada adicionar 0.25 ml de reagente de Nessler e agitar.

Deixar reagir durante 15 minutos.

Preparar um branco de igual modo.

Ler a absorvância a 425 nm.

Interferências

Algumas aínas reagem com o reagente de Nessler dando uma cor amarela, no tempo requerido para o teste.

6. DETERMINAÇÃO DE NITRATO - SM4500 NO₃ B modificado (APHA, 1989).

Material:

- Balança analítica;
- Estufa a 105 °C;
- Espectrofotômetro de UV/VIS (Unicam Hélios – type: hélios gamma);
- Sistema de filtração por vácuo com trompa de água;
- Filtros de fibra de vidro (Whatman GF/C φ 47 mm; cat nº 1822047);
- Sistema de filtração por vácuo com trompa de água;
- Filtros de fibra de vidro (Whatman GF/C φ 47 mm; cat nº 1822047);
- Cuvete de quartzo.

Reagentes:

- Solução de ácido sulfâmico 0.05 M: dissolver 4.8545 g do reagente em 1 l de água destilada;
- Solução padrão de nitrato (N-NO₃⁻) 100 mg/l: dissolver 0.7218 g de KNO₃ anidro, seco a 105 °C durante 24 h (deve ficar bem seco para se obter uma concentração correcta), em 1 l de água destilada;
- Solução padrão de nitrato (N-NO₃⁻) 50 mg/l: diluir a solução padrão de nitrato 100 mg/l de forma a obter esta concentração.

Procedimento

Para o traçado da curva de calibração preparar a partir da solução padrão de N-NO₃⁻ de 50 mg/l, 8 soluções padrão com as seguintes concentrações de N-NO₃⁻ : 0 mg/l; 2 mg/l; 4 mg/l; 5 mg/l; 6 mg/l; 8 mg/l; 10 mg/l; 13 mg/l.

Adicionar 1 ml de solução padrão 50 mg/l a 4 ml de amostra previamente filtrada. Desta forma dilui-se a matéria orgânica e aumenta-se a leitura da absorvância, diminuindo a interferência da matéria orgânica.

Preparar um ensaio apenas com padrão 50 mg/l: adicionar 1 ml de padrão a 4 ml de água destilada. Este valor é utilizado para subtrair à leitura das amostras.

Diluir a amostra bem como as soluções padrão com a solução de ácido sulfâmico 0.5 M, na proporção de 1:1, isto é, para uma porção de 5 ml de amostra ou de uma porção diluída com água destilada adicionar 5 ml de ácido sulfâmico.

Preparar um ensaio branco: adicionar 5 ml de água destilada a 5 ml de ácido sulfâmico.

Ler a absorvância a 220 nm e a 275 nm. O zero de absorvância no espectrofotômetro é feito aos dois comprimentos de onda, utilizando cuvetes de quartzo.

Com os valores da absorvância lida a 220 nm para as soluções padrão, construir a curva calibração (a correção a 275 nm não é necessária para os padrões uma vez que estes não contêm matéria orgânica).

Para as amostras, subtrair duas vezes a absorvância lida a 275 nm da absorvância lida a 220 nm, para se obter a absorvância do íão nitrato. Se o valor da correção for superior a 10 % da leitura a 220 nm, este método não deverá ser usado.

A absorvância usada para calcular a concentração de nitrato é calculada da seguinte forma:

$$\text{Abs} = (A_{\text{amostra}} - A_{\text{padrão}})_{220\text{nm}} - 2 \times A_{\text{amostra},275\text{nm}} \quad (\text{eq.A.6})$$

Abs: absorvância total da amostra, em UA;

$A_{\text{amostra}, 220 \text{ nm}}$: leitura de absorvância da amostra a 220 nm, em UA;

$A_{\text{padrão}, 220 \text{ nm}}$: leitura de absorvância do padrão a 220 nm, em UA;

$A_{\text{amostra}, 275 \text{ nm}}$: leitura de absorvância da amostra a 275 nm, em UA;

7. DETERMINAÇÃO DE NITRITO - SM4500 NO₂ B (APHA, 1989)

Material:

- Balança analítica;
- Estufa a 105 °C;
- Espectrofotômetro de UV/VIS (Unicam Hélios – type: hélios gamma);
- Sistema de filtração por vácuo com trompa de água;
- Filtros de fibra de vidro (Whatman GF/C ϕ 47 mm; cat nº 1822047);
- Cuvete de vidro.

Reagentes

- Reagente de Sulfanilamida: adicionar 300 ml de água destilada a um balão de 500 ml. Numa haste adicionar lentamente 50 ml de HCL concentrado. Dissolver 5 g de sulfanilamida e perfazer o volume com água;
- Solução de N-(1-naftil)-etilenodiamina dihidrocloro: dissolver 500 mg do reagente em 500 ml de água destilada. Guardar no escuro. Após um mês, observa-se o desenvolvimento de uma cor castanha sendo necessário preparar reagente fresco;
- Solução padrão de nitrito (N-NO₂⁻) 50 mg/l: dissolver 0.24630 g de NaNO₂ anidro seco a 105 °C durante uma 1 h em 1 l de água destilada;
- Solução padrão de nitrito (N-NO₂⁻) intermédia 0.50 mg/l: diluir 10 ml de solução padrão de nitrito a 1 l com água destilada.

Procedimento

Para o traçado da curva de calibração preparar, a partir da solução intermédia de nitrito, 6 soluções padrão com as seguintes concentrações de N-NO₂⁻: 0.00 mg/l; 0.05 mg/l; 0.10 mg/l; 0.15 mg/l; 0.20 mg/l; 0.25 mg/l.

Utilizar uma porção de 5 ml de amostra, previamente filtrada e adicionar 100 μ l de solução de sulfanilamida. Agitar e deixar reagir durante 2 min.

Adicionar 100 μ l de N-(1-naftil)-etilenodiamina dihidrocloro e agitar.

Deixar reagir durante 10 min.

Preparar um branco de igual modo.

Ler a absorvância a 543 nm.

Construir a curva de calibração com os padrões.

8. DETERMINAÇÃO DE POLÍMEROS DE RESERVA PHB (POLI-3-HIDROXIBUTIRATO) E PHV (POLI-3-HIDROXIVALERATO) EM BIOMASSA SUSPensa E ADERIDA.

Material e reagentes:

- Cromatografo gasoso Chrompack CP9001;
- Bloco de aquecimento de liga de alumínio, com 45 mm a 50 mm de altura e com aberturas de tamanho suficiente para se ajustarem aos tubos de digestão., capaz de operar a $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Microbalança Mettler Toledo Ag 245 (máx. 210 g, d 0,01 mg);
- Centrifuga Heraeus – Megafure 1.0R Sepatech.
- Estufa entre 50°C e 60°C ;
- Tubos de digestão em borossilicato 16 mm x 100 mm com rolhas roscadas revestidas a Teflon (tipo CQO);
- Seringa de GC de $1\mu\text{l}$ – Hamilton 7001 N;
- Vials de GC 1.5 ml ou 2.0 ml;
- Tubos de fundo cónico de 45 ml em PP (tipo Greiner);
- Frascos de vidro de 10 ml, rolhas de butil cinzentas e cápsulas de alumínio adequadas aos frascos (20 mm);
- Seringas descartáveis de 1 ml e de 2 ml;
- Filtros tipo acrodisc resistentes a solventes orgânicos (Gelman, GHP Acrodisc de 13 mm e porosidade de $0.2\mu\text{m}$, PN 4554T);
- Padrão de PHB e PHV (copolymer of (R)-3-Hydroxybutyric acid and (R)-3-Hydroxyvaleric acid (7:3), Fluka, ref.27819);
- Solução de padrão interno de ácido benzóico em diclorometano (1 mg/ml);
- Mistura de 1-propanol:HCl 75:25 (v:v);
- Solução de formaldeído 2% (v/v).

Procedimento:

Preparação das soluções padrão para o traçado da curva de calibração:

Numa microbalança pesar o padrão de PHB/PHV para frascos de 10 ml. Os padrões devem estar na gama de 0.5 mg a 2.5 mg de polímero (com intervalos de ≈ 0.25 mg). Efectuar o passo de digestão e extracção juntamente com as amostras.

Preparação das amostras de biomassa em suspensão:

Colocar uma amostra de biomassa em suspensão (50 ml) em dois tubos de fundo cónico de 45 ml. Adicionar 15 ml de solução de formaldeído 2% (v/v) a cada tubo. Centrifugar os tubos a 4000 rpm durante 15 min. Com um pipeta, retirar a solução límpida sobrenadante e verter o pellet para um dos tubos, de forma a ficar apenas com um tubo por amostra. Centrifugar novamente a 4000 rpm durante 15 min. Retirar o sobrenadante e colocar o tubo na estufa a 60 °C durante 48 h para secagem total do pellet de biomassa. Retirar da estufa e colocar no excicador.

Preparação das amostras de biofilme:

Retirar 4 peças de suporte e colocar num tubo de fundo cónico de 45 ml. Adicionar um volume suficiente de solução de formaldeído 2% (v/v) para cobrir as peças (30 ml). Agitar vigorosamente no agitador vórtex.

Centrifugar os tubos com as peças a 4000 rpm durante 15 min para que libertem a maior quantidade possível de biomassa. Com uma espátula, remover toda a biomassa aderida nas peças de suporte, e recolher para o tubo original. Retirar as peças dos tubos e centrifugar novamente a 4000 rpm. Rejeitar a fase líquida ficando apenas o pellet no fundo do tubo. Secar os tubos numa estufa a 60 °C durante 48 h até que o pellet de biomassa seque totalmente.

Notas:

Durante a pesagem do padrão deve ter-se especial atenção à atracção electrostática que pode levar à perda de produto;

O volume de amostra e o número de peças indicado tem como referência as seguintes características da biomassa em suspensão: SSV \approx 500 mg/l e biomassa aderida por suporte \approx 15 mg. Este volume deve ser ajustado de acordo com as características das amostras. Para amostras com baixo conteúdo de PHB deve aumentar-se a quantidade de biomassa a analisar, deste modo obtêm-se resultados mais precisos.

O formaldeído cessa a actividade biológica, evitando assim a possível degradação do PHB durante o processamento das amostras.

Reacção de esterificação:

Pesar a biomassa seca e colocar em tubos de digestão. Colocar também os padrões previamente pesados em tubos de digestão e providenciar um ensaio em branco com um tubo de digestão vazio.

Proceder à adição dos reagentes: numa hotte, adicionar aos tubos de digestão contendo as amostra (biomassa, padrões e um tubo vazio para o ensaio em branco) 1.5 ml de padrão interno de ácido benzóico em diclorometano (1 mg/ml) e 1.5 ml de solução de 1-propanol:HCl (75:25 v/v).

Fechar os tubos com as rolhas apropriadas tendo o cuidado de verificar se estas se encontram em bom estado.

Agitar vigorosamente (vortex) para favorecer o contacto inicial dos reagentes com a biomassa ou os padrões.

Colocar os tubos no digestor a 100 °C e deixar digerir durante 3.5 h.

Retirar os tubos do digestor e arrefecer à temperatura ambiente.

Notas:

Preparar as amostras numa hotte. Evitar a exposição ao solvente, o diclorometano é tóxico.

O solvente contendo o padrão interno é estável durante pelo menos 2.5 anos, desde que vedado convenientemente uma vez que pode evaporar. A mistura de 1-propanol:HCl deve ser preparada regularmente.

Não agitar os tubos antes de estes estarem bem fechados.

É de vital importância utilizar o n-propanol e NÃO o isopropanol, pois o isopropanol irá impedir a reacção de esterificação, reduzindo significativamente os rendimentos e produzindo resultados errados.

Extracção:

Verter o conteúdo dos tubos de digestão já frios para frascos de vidro de 10 ml. Lavar os tubos com 2 ml de água ultrapura, agitar e verter para dentro dos frascos. Selar os frascos com rolha em butil cinzenta e cápsula de alumínio. Agitar vigorosamente (~1 min no vortex), assegurando assim que as duas fases entram completamente em contacto e optimizando a extracção.

Colocar os frascos invertidos num suporte durante 20 min para permitir a separação das fases. A fase desejada é a mais pesada, a que contém o éster.

Com uma seringa de 1 ml retirar cuidadosamente a fase inferior, de forma a evitar a mistura das fases. Os resíduos celulares localizam-se na interface das duas fases.

Transferir a fase orgânica para vials de GC de 1.5 ml e adicionar Na₂SO₄ para assegurar a desidratação total da fase orgânica;

Agitar os vials no vortex e guardar a 0 °C.

Notas:

O Na₂SO₄ adicionado à fase orgânica forma um precipitado branco, após reacção com a água, depositando-se no fundo do frasco sob a forma de uma “pedra branca”;

As amostras guardadas no congelador podem eventualmente formar água. Para garantir que a amostra injectada no GC não contém água, deve-se filtrar apenas as amostras que vão ser analisadas no próprio dia.

Análise das amostras por cromatografia gasosa:

Injectar as amostras em cromatógrafo gasoso com as seguintes condições:

Coluna: Tecnokroma TR-WAX (eq.CP-SIL 52 CB) 30m × 0.32 mm × 0.25 µm;

Volume injectado: 1 µl (injector split/splitless);

Temperatura do injector: 220 °C;

Temperatura do detector (FID): 250 °C ;

Perfil de temperaturas: 0 min – 2 min a 50 °C ; 2 min – 12 min até 225 °C (15 °C/min) ; 12 min – 17 min a 225 °C.

Caudal de ar: 250 ml/min;

Caudal de hidrogénio: 30 ml/min;

Caudal de gás de arraste (hélio): 1 ml/min (pressão na coluna 50 KPa);

Caudal de gás de make-up (azoto): 30 ml/min;

Notas:

O uso de um padrão interno nas análises em GC aumenta a precisão do método, pois elimina os eventuais erros de manuseamento das amostras;

Não introduzir água na coluna de GC, a água degrada este tipo de coluna. Assegure-se que só injecta a fase orgânica na coluna. Para secar a fase orgânica adiciona-se Na₂SO₄ até formar “pedra branca”.

Para eliminar eventuais interferências de factores externos é aconselhável analisar sempre um padrão de PHB e um ensaio em branco em conjunto com as amostras.

Regularmente deve ser efectuada a limpeza da coluna. Para isso é programada uma rampa de temperatura, de modo a subir lentamente de temperatura até á temperatura máxima permitida pela coluna (rampa de 0.3 °C/min até 230 °C).

Análise dos resultados:

A identificação dos picos é feita a partir dos tempos de retenção dos padrões respectivos. As áreas dos compostos a analisar são corrigidas pelas áreas obtidas nos brancos, nos correspondentes tempos de retenção.

A calibração do método é efectuada correlacionando a razão entre a área do pico do ester hidroxialkil (PHB ou PHV) e a área do pico do ester benzil (padrão interno) com a massa de polímero (PHB e PHV) correspondente. Deve-se ter em conta que o padrão utilizado é uma mistura de PHB e PHV na razão 7:3. Logo, um padrão de massa 1.03 mg tem 0.31 mg de PHV e 0.72 mg de PHB. A figura A.1 apresenta um cromatograma de uma amostra de biomassa suspensa.

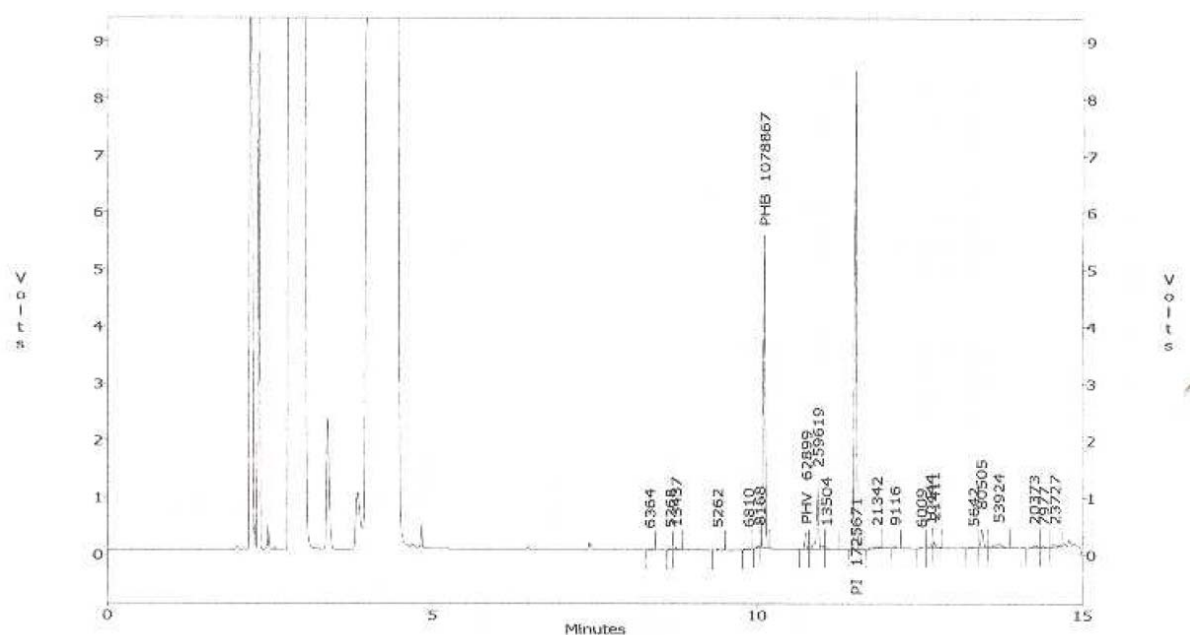


Figura A.1 – Cromatograma obtido para análise de PHB e de PHV numa amostra de biomassa suspensa. Análise efectuada em cromatografia gasosa com detector FID, injetor split/splitless e com coluna Tecnokroma TR-WAX de 30 m · 0.32 mm · 0.25 µm. Caudal de ar: 250 ml/min; hidrogénio: 30 ml/min; gás de arraste (hélio): 1 ml/min (pressão na coluna: 50 kPa); gás *make-up* (azoto): 30 ml/min; temperatura do injetor: 220 °C; temperatura do detector: 250 °C; perfil de temperaturas do forno da coluna: 2 min a 50 °C; 15 °C/min até 225 °C em 10 min; 5 min a 225 °C (tempo total de análise: 17min). PI: ácido benzóico.

APÊNDICE B

MONITORIZAÇÃO DO REACTOR EM ENSAIOS DE ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA

Nas figuras B.1, B.2 e B.3 apresentam-se os perfis de concentração de oxigénio, pH, amónio, nitrato e nitrito obtidos ao longo de um ciclo, em diferentes condições de arejamento.

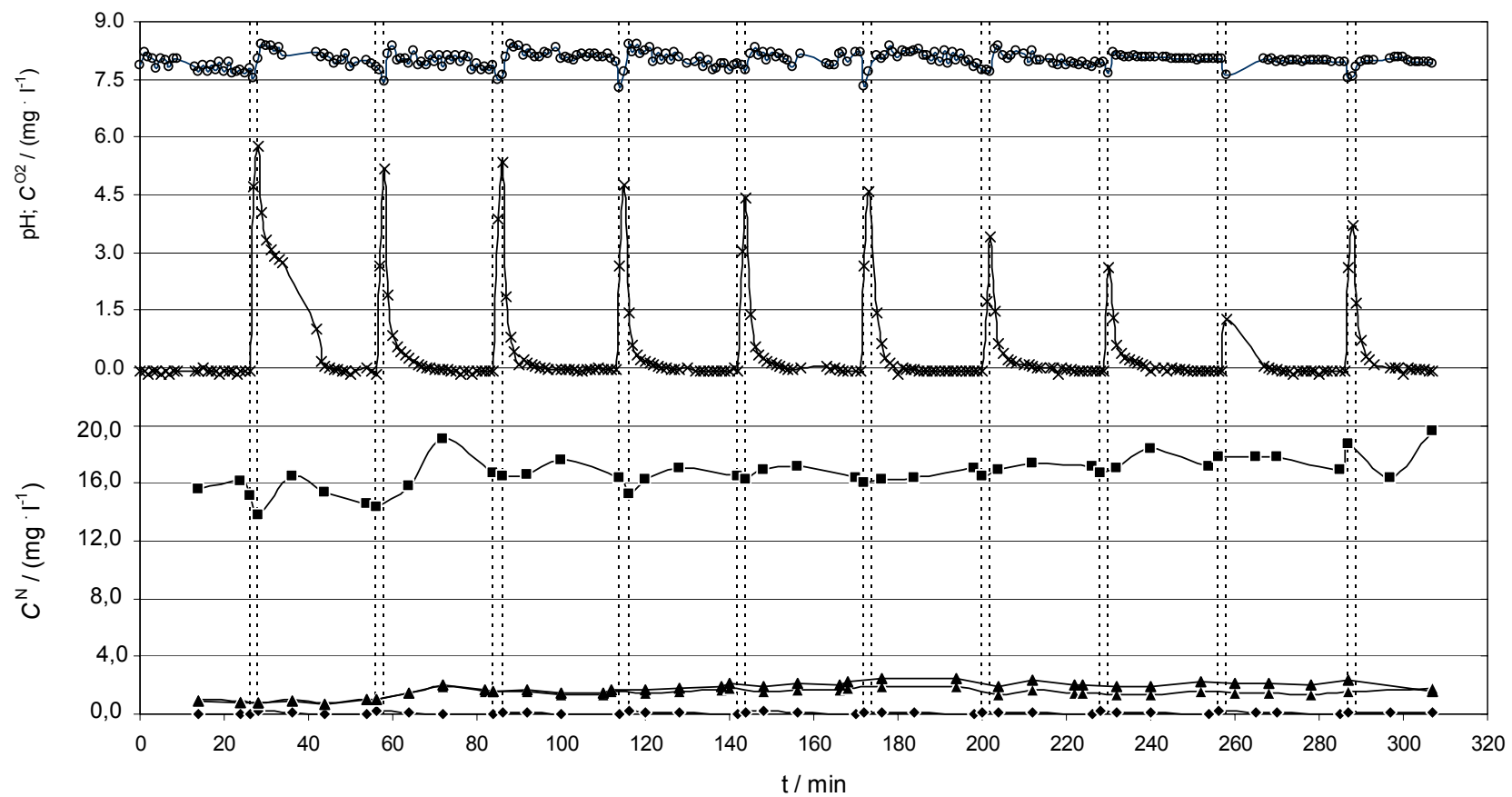


Figura B.1 – Perfis de concentração de oxigénio (\times), pH (\circ), amónio (\blacksquare), nitrito (\blacklozenge) e nitrato (\blacktriangle) no reactor em regime de alimentação contínua, com $\Sigma t_A=20$ min e $\Sigma t_M=260$ min.

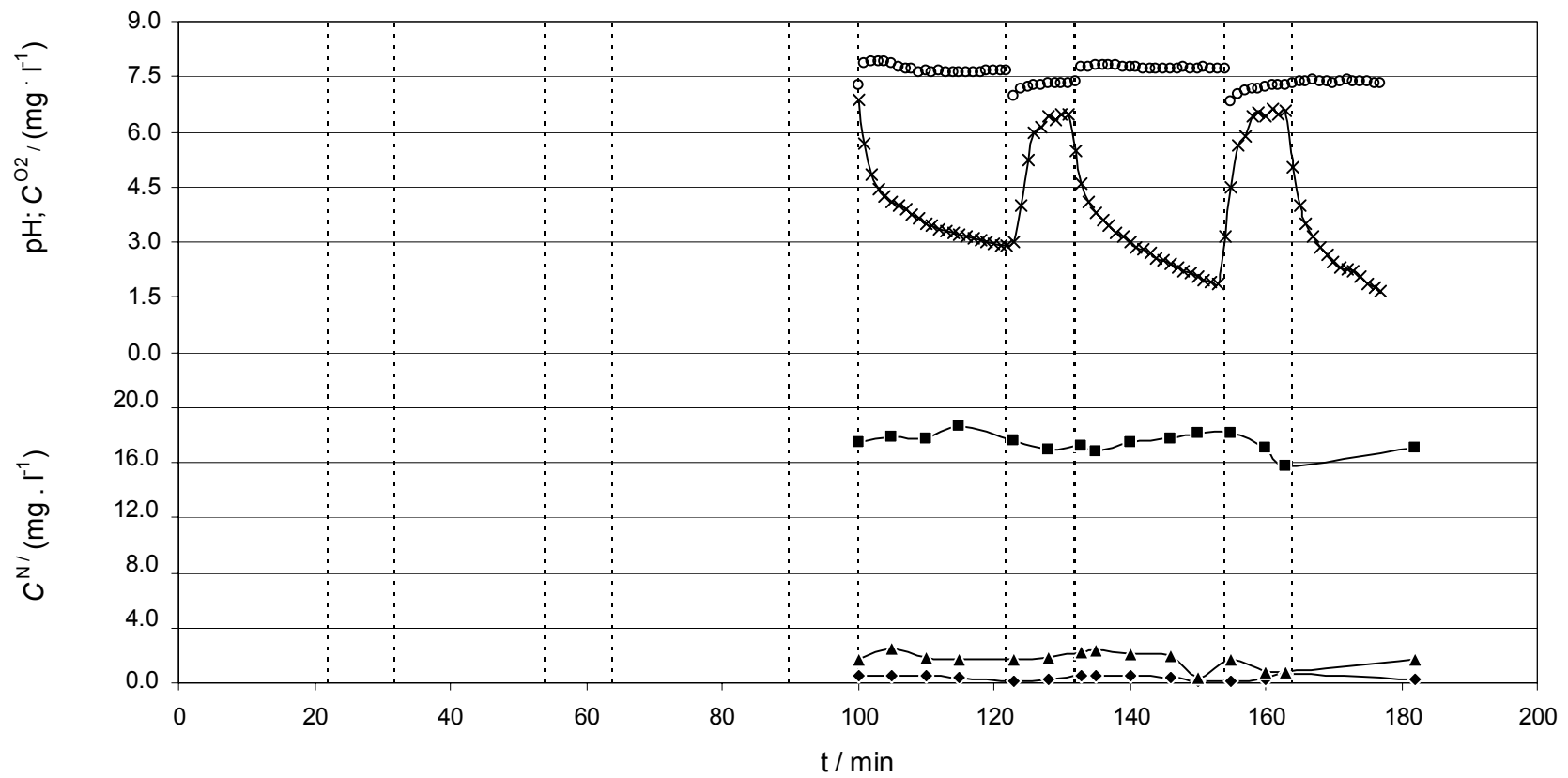


Figura B.2 – Perfis de concentração de oxigénio (\times), pH (\circ), amónio (\blacksquare), nitrito (\blacklozenge) e nitrato (\blacktriangle) no reactor em regime de alimentação contínua, com $\Sigma t_A=50$ min e $\Sigma t_M=210$ min.

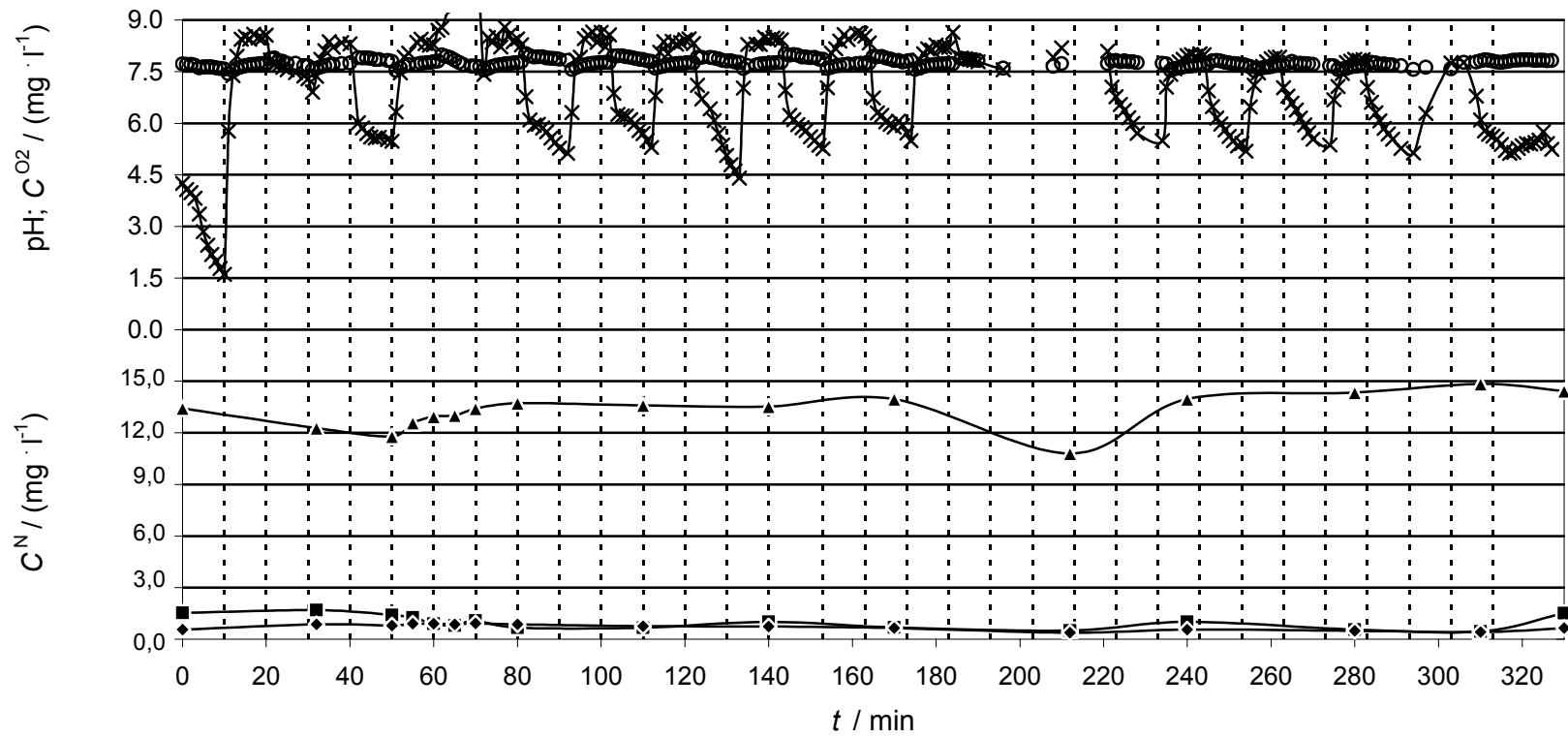


Figura B.3 – Perfis de concentração de oxigénio (—×—), pH (—○—), amónio (—■—), nitrito (—◆—) e nitrato (—▲—) no reactor em regime de alimentação contínua, com $\Sigma t_A=160$ min e $\Sigma t_M=150$ min.

