

## II-120 – TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO UTILIZANDO REATOR AERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO: CARACTERÍSTICAS DO BIOFILME E INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO EM MEIO SUPORTE NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

**Gleyce Teixeira Correia<sup>(1)</sup>**

Bacharel em Química Ambiental pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP. Mestre em Engenharia Civil: Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - FEIS/UNESP.

**Dib Gebara(\*)**

Engenheiro Civil, Mestre em Hidráulica e Saneamento, Professor Assistente Doutor do Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS/UNESP.

**Milton Dall’Aglio Sobrinho**

Engenheiro Civil, Doutor em Hidráulica e Saneamento, Professor Assistente Associado do Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS/UNESP.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Francisco P. Lopes, 2575, apto 46 – B1, Jd. Paraíso – São Carlos – SP – CEP: 13561-250 – Brasil – Tel: +55 (17) 9175-0865 - e-mail: [gle\\_qca@hotmail.com](mailto:gle_qca@hotmail.com)

### RESUMO

Devido aos sérios problemas ambientais e de saúde humana, proporcionados pelo despejo inadequado de esgoto doméstico cresce a importância por formas adequadas e viáveis de tratamento. Dentre as alternativas tem-se o reator aeróbio de leito fluidizado com circulação interna, que utiliza a ação de microrganismos aderidos a um meio suporte uniforme (areia), removendo tanto matéria orgânica quanto nitrogenada. O presente trabalho objetivou correlacionar remoção de matéria nitrogenada com características do biofilme aderido ao meio suporte, tais como espessura e características microbiológicas. Foi utilizado um reator com altura de 3 m, diâmetro externo de 250 mm e diâmetro interno de 150 mm e foram aplicadas diferentes concentrações de meio suporte ao longo do estudo (Fase 1: 100 g.L<sup>-1</sup> e Fase 2: 150 g.L<sup>-1</sup>). Foram realizadas análises de Nitrogênio Total, Nitrogênio Amoniacal, Nitrito, Nitrato, espessura do biofilme e análises microbiológicas (coloração diferencial de Gram, coloração de esporo, teste de catalase e caracterização genômica, utilizando o método PCR). O aumento da concentração de areia mostrou ser um fator relevante a ser considerado neste tipo de reator, aumentando mais de 10% de uma fase para outra e o biofilme mostrou boa recuperação após condições adversas, tais como queda de energia. A identificação dos microrganismos presentes no biofilme mostrou ser uma ferramenta importante no aprimoramento e conhecimento aprofundado dos sistemas de tratamento de águas residuárias, no presente trabalho foram encontradas, principalmente, bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* e *Proteobactéria*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biorreator Aeróbio, Leito Fluidizado, Tratamento de Esgoto, Remoção de Nitrogênio, Biofilme.

### INTRODUÇÃO

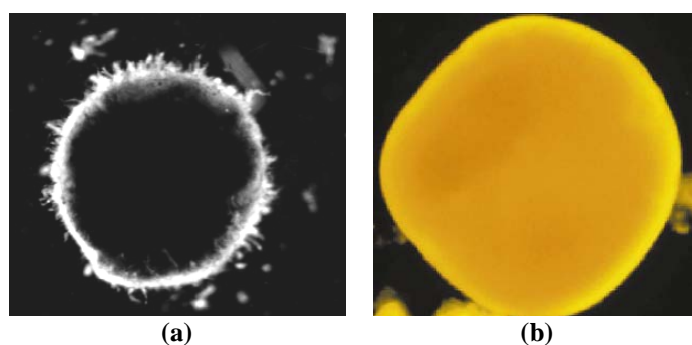
É crescente a preocupação com o despejo inadequado de esgoto doméstico, visto que, além de sérios problemas ambientais, causam também inúmeros danos à saúde humana, sendo, portanto, de extrema importância que todos os municípios busquem formas viáveis e adequadas de tratamento antes de sua destinação final.

As principais características poluentes dos esgotos domésticos são: matéria orgânica, nutrientes, além de microorganismos patogênicos e, em alguns casos, substâncias tóxicas. O método mais utilizado para a degradação deste tipo de água residuária é o biológico, que pode ser um sistema aeróbio, anaeróbio ou que combine ambos.

As principais vantagens da utilização de sistemas aeróbios de leito fluidizado são: retenção de grande quantidade de biomassa ativa, utilização de pouco espaço, podendo remover, simultaneamente, matéria carbonácea e nitrogenada. Nos reatores com circulação, esta é gerada por diferença na pressão hidrostática entre as seções de subida e descida após injeção de ar (Merchuk e Berzin, 1995).

Os reatores como o de leito fluidizado, que utilizam biofilme aderido a suportes ou de forma dispersa no meio, surgem da busca por melhoramentos nas estações de tratamento de esgotos, possibilitando que em um mesmo reator ocorra o tratamento secundário e terciário dos esgotos domésticos.

Os biofilmes são ecossistemas microbianos complexos formados principalmente por células e produtos extracelulares, cuja espessura e estrutura dependem do material suporte, das condições físico-químicas, e do regime hidráulico empregados. Forma-se aderidas a um suporte (natural ou artificial) (Figura 1a) ou em forma de flocos (Figura 1b) (Nicolella *et al.*, 2000).



**Figura 1. Biofilme (a) aderido a meio suporte; (b) em grânulo. Fonte: Nicolella *et al.* (2000)**

O biofilme possui estrutura heterogênea formada por diversas espécies de microrganismos, o que possibilita a remoção de matéria carbonácea e nitrogenada em um mesmo sistema. Gieseke *et al.* (2002) mostram em seu trabalho o potencial de reatores com biofilmes em remover simultaneamente matéria orgânica e nutrientes (N e P) e que isto ocorre devido à heterogeneidade e à coexistência de comunidades microbiológicas em um único sistema.

Segundo Melo e Vieira (1999), além das espécies envolvidas e da composição química do fluido, as características de cada estrutura também dependem das condições hidrodinâmicas sob as quais a camada biológica é formada.

Na formação do biofilme, os principais processos envolvidos são: transporte e fixação de células livres do meio líquido para superfície sólida; crescimento e divisão das células fixas devido ao consumo dos nutrientes do líquido circundante, além da produção e excreção dos polímeros extracelulares e, por fim, a libertação de material celular por perda de células individuais (erosão) ou perda de agregados maiores (XAVIER *et al.*, 2003). Em relação à espessura, o biofilme se forma, basicamente, em três estágios: fina, intermediária e elevada (Iwai e Kitao, 1994).

A adesão de microrganismos ao meio suporte, a estrutura do biofilme e a velocidade de colonização microbiana dependem das propriedades superficiais do material escolhido, dos microrganismos envolvidos na adesão, das propriedades microbiológicas dos microrganismos e das propriedades do meio aquoso (Mello, 2007).

O conhecimento da diversidade microbiológica presente em um biofilme é importante para se entender a relação entre os parâmetros ambientais e o funcionamento dos ecossistemas, e com isto estudar, cada vez mais profunda e especificamente, os métodos biológicos de tratamento de água e águas residuárias.

Tradicionalmente, em análises ambientais, as técnicas convencionais de cultivo e isolamento de microrganismos são a investigação e enumeração de bactérias patogênicas, como as técnicas NMP (Número Mais Provável) e UFC (Unidade Formadora de Colônia), utilizada para contagem de colônias em placas (NASCIMENTO, 2008).



O avanço na área de identificação microbiológica tem atenção voltada, principalmente, às técnicas moleculares, que se baseiam na aplicação de biomarcadores. O mais utilizado para inferir a identidade dos organismos é a molécula de RNA ribossomal (RNAr), que é parte integrante do ribossomo e responsável pela síntese de proteínas que está presente em todas as células e, por isso, é considerado um biomarcador ideal (NASCIMENTO, 2008). A região 16S compõe a subunidade menor dos ribossomos presentes em organismos procariontes (bactérias e arqueias).

Dentre as técnicas moleculares disponíveis (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*, DGGE - *denaturing gradient gel electrophoresis*, FISH - *fluorescent in situ hybridization*), a PCR (*polimerase chain reaction*) é a mais utilizada.

A PCR consiste na amplificação *in vitro* do DNA e pode ser usada para identificar microrganismos em diferentes tipos de amostras sem a necessidade de cultivá-los. Trata-se de uma técnica rápida e de baixo custo utilizada para amplificar ou copiar pequenos segmentos de DNA (PHILIPS, 2008).

O nutriente nitrogênio, em suas diversas formas, está relacionado com problemas ambientais em corpos hídricos como, por exemplo, a eutrofização, que além de prejudicar o meio ambiente pode causar riscos à saúde humana. Por este e outros motivos, a remoção de compostos nitrogenados vem ganhando cada vez mais espaço.

O processo mais utilizado para a remoção de nitrogênio é a remoção biológica por nitrificação/desnitrificação, onde ocorre primeiramente a nitrificação em ambientes estritamente aeróbios, com a oxidação da amônia a nitrato, em seguida tem-se a desnitrificação, em ambientes anóxicos, com o nitrato sendo convertido a nitrogênio molecular, utilizando o material orgânico disponível.

A desnitrificação pode ocorrer simultaneamente ao processo de nitrificação, por meio do chamado processo SND (*simultaneous nitrification/denitrification*) e para que ocorra de maneira satisfatória é importante que ocorra um crescimento equilibrado entre as bactérias autótrofas e heterótrofas sem problemas de competição entre elas (Carvalho JR., 2008).

O presente trabalho objetivou correlacionar remoção de matéria nitrogenada com características do biofilme aderido ao meio suporte, tais como espessura e características microbiológicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MEIO SUPORTE E SUBSTRATO**

Foi utilizada areia como meio suporte, cuja caracterização foi feita por ensaio de granulometria conjunta como descrita na NBR 7181 recomendada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (1984).

O substrato utilizado foi esgoto doméstico captado do poço de sucção da estação elevatória da cidade de Ilha Solteira, SP, submetido previamente a um peneiramento estático, para a retirada dos sólidos mais grosseiros.

### **REATOR**

Foi utilizado um reator aeróbio de leito fluidizado, esquematizado na Figura 2, cuja altura era de 3 m, o diâmetro externo 250 mm e o interno 150 mm. As vazões aplicadas foram 2800 L.h<sup>-1</sup> de ar e 45 L.h<sup>-1</sup> de esgoto, com TDH de 3 h. E variou-se a concentração de areia em duas fases (Fase 1: 100 g.L<sup>-1</sup>; Fase 2: 125 g.L<sup>-1</sup>)

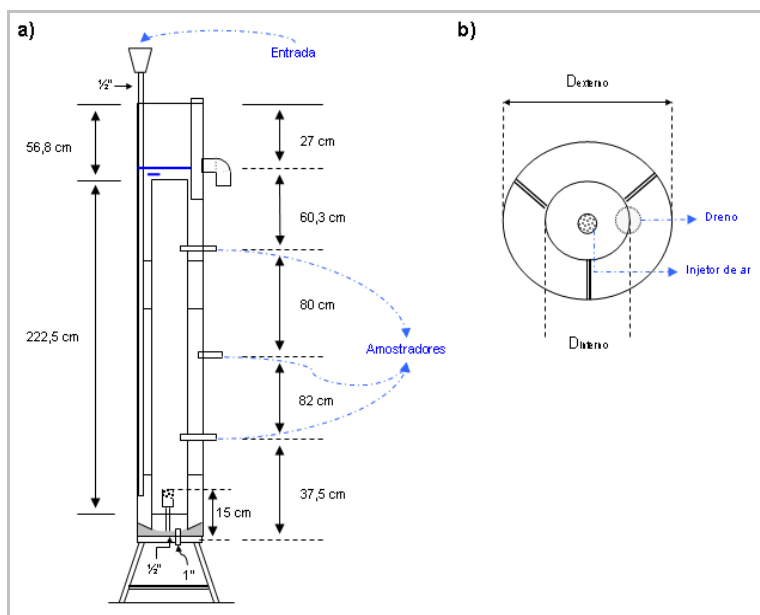


Figura 2. Reator utilizado (a) esquema geral e (b) visão superior do reator

## ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS

Foram realizadas análises de NT (Nitrogênio Total),  $N_{Amon}$  (Nitrogenio Amoniacal),  $NO_2$  (Nitrito) e  $NO_3$  (Nitrato), segundo APHA (1998) e espessura do biofilme, seguindo metodologia proposta por Gebara (2006).

Para as análises microbiológicas, amostras retiradas do reator eram homogeneizadas e diluídas em meio peptonado. Então, transferidos para placas de petri, contendo meio PCA. Após o crescimento das colônias (aproximadamente 48 horas), as mesmas eram diferenciadas, por características como coloração e formato, e em seguida isoladas tubos contendo PCA inclinado.

Nestas colônias isoladas foram realizados os procedimentos de coloração diferencial de Gram, coloração de esporo, teste de catalase e caracterização genômica, utilizando o método PCR.

## RESULTADOS

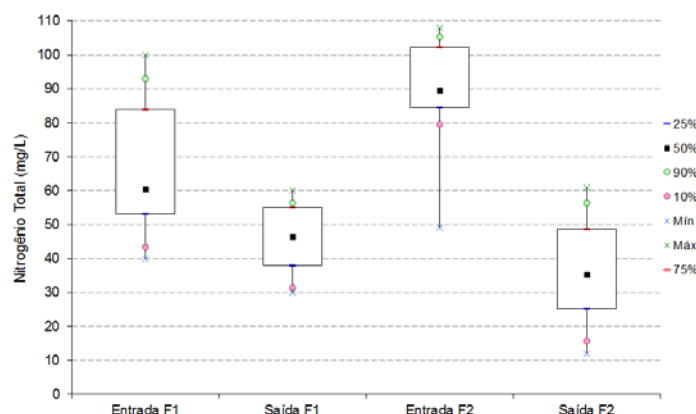
### CARACTERIZAÇÃO DO MEIO SUPORTE

A massa específica ( $\rho_s$ ) obtida para a areia utilizada foi de  $2,6 \text{ g.cm}^{-3}$ , com granulometria bastante uniforme (coeficiente de desuniformidade  $U = D_{60}/D_{10} = 1,8$ ), apresentando grãos menores que 0,8 mm e diâmetro efetivo ( $D_{10}$ ) de 0,19 mm.

### REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

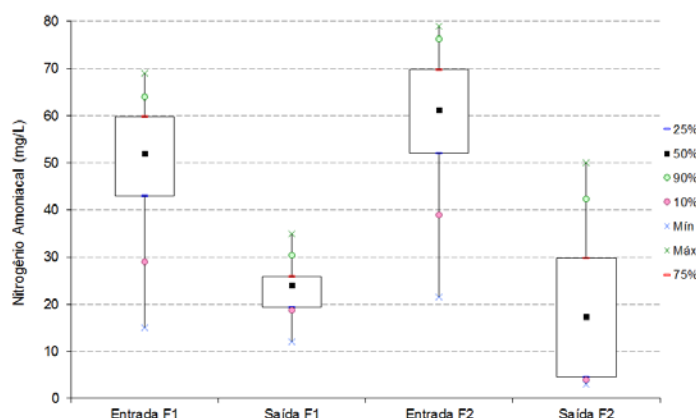
Na fase 1, as concentrações médias de nitrogênio total foram  $67 \text{ mg.L}^{-1}$  no esgoto afluente e  $46 \text{ mg.L}^{-1}$  no efluente. Na fase 2, as concentrações foram de foram 90 e  $37 \text{ mg.L}^{-1}$  no afluente e no efluente, respectivamente. A Figura 3 apresenta gráficos boxplot dos valores de NT obtidos durante as duas fases de operação do reator.

A remoção de nitrogênio total durante a fase 1 de operação foi, em média, 32%, subindo para 59% na fase 2. Mostrando que a adição de meio suporte pode ter influenciado positivamente na remoção de NT.



**Figura 3. Concentrações de nitrogênio total obtidas nas fases 1 e 2**

O aumento na eficiência com a adição de areia também foi observado na remoção de nitrogênio amoniacal, cuja eficiência média de remoção na fase 1 foi de 53%, aumentando para 65% na fase 2. Os valores de nitrogênio amoniacal obtidos no afluente e efluente ao longo das fases de operação são apresentados no gráfico da Figura 4.



**Figura 4. Concentrações de nitrogênio amoniacal obtidas nas fases 1 e 2**

No afluente as concentrações de nitrito e nitrato são inferiores a  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ . As concentrações de nitrito, após o tratamento, apresentaram valores médios de  $8,6 \text{ mg.L}^{-1}$  na fase 1 e  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  na fase 2. E as concentrações de nitrato valores de  $13,0 \text{ mg.L}^{-1}$  na fase 1 e  $5,7 \text{ mg.L}^{-1}$  na fase 2.

O processo de nitrificação é a conversão do nitrogênio amoniacal em nitrito e posteriormente a nitrato, possibilitando a ocorrência da desnitrificação, que é a conversão de nitrato a nitrogênio gasoso. As concentrações significativas de nitrito e nitrato observadas no reator indicam que ocorreu nitrificação, porém não ocorreu desnitrificação. Isto pode estar relacionado ao pH próximo de 8,0, que favorece a formação de nitrito.

Nota-se também que houve nitrificação mais intensa com o aumento de concentração de meio suporte, constatado com o aumento da concentração de nitrato.

O controle de pH é um dos fatores mais decisivos na eficácia do processo devido a possíveis flutuações do teor de nitrogênio introduzidas pelos efluentes, gerando variações de pH a ponto de causarem inibição, enquanto

que os demais fatores apresentam respostas mais lentas e mais controláveis. A oscilação nos valores de pH pode ter sido um fator importante na baixa eficiência na nitrificação observada neste experimento.

## ESPESSURA DO BIOFILME

Durante a partida dos reatores a espessura média do biofilme era de 0,07 mm, e foi aumentando ao longo da operação da fase. A espessura do biofilme nas fases 1 e 2 são apresentadas na Figura 5.

Na fase 1 a espessura média do biofilme foi 0,27 mm. No ponto 19/10 (Figura 5(a)) a espessura do biofilme diminuiu em relação ao observado anteriormente, o que pode ser devido a paradas no sistema de injeção de ar que pode ter prejudicado o desenvolvimento do biofilme.

Pode-se observar que após a condição adversa a espessura do biofilme aumenta novamente, ou seja, o biofilme volta a se desenvolver. Logo após a adição de areia, para o início da fase 2, a espessura média do biofilme foi de 0,24 mm, diminuindo para 0,15 mm, durante a operação da fase. O que pode ser devido ao aumento do atrito, visto que aumenta a quantidade de meio suporte dispersa no meio.

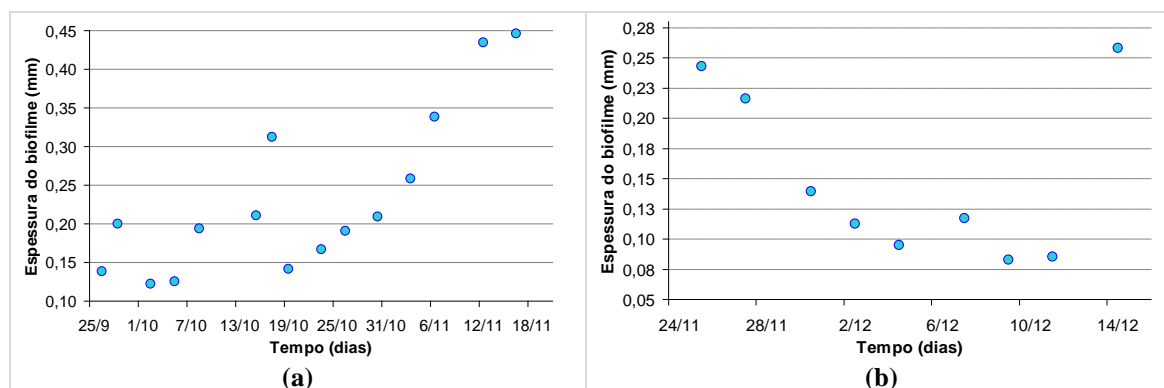


Figura 5. Espessura do biofilme na (a) fase 1 e (b) fase 2

## ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Foram encontradas, aproximadamente, trinta bactérias com características distintas, em relação à coloração de suas colônias e aos três testes realizados (gram, catalase e esporos).

Das bactérias observadas, cerca de 50% mostraram-se positivas para catalase (estafilococos) e 50% negativas (estreptococos). O mesmo ocorreu com o teste de Gram, e 83% das bactérias isoladas não apresentaram formação de esporos.

Das trinta diferentes bactérias obtidas, foram selecionadas vinte e três delas, as que apareceram com maior frequência, para fazer a caracterização genômica. Destas 91% foram identificadas como pertencentes ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Bacillales*, das quais, 38% foram identificadas como sendo da família *Bacillaceae*, e 48% pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Os representantes do filo *Firmicutes* estão descritos como bactérias gram-positivas de rápido desenvolvimento em presença de quantidades suficientes de nutrientes, porém, somente prevalecem em condições de disponibilidade de nutrientes em áreas com baixa competição, ou seja, normalmente são encontrados em ambientes instáveis (VAL-MORAES, 2008).

Como a maioria das bactérias isoladas neste experimento foi identificada como pertencente a este grupo, pode-se considerar que o sistema ainda não estava estabilizado, o que provavelmente ocorreu devido às paradas no fornecimento de ar, e consequente desestabilização do sistema.





As 9% amostras restantes foram identificadas como pertencentes ao filo *Proteobacteria*, classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*, família *Comamonadaceae* e gênero *Comamonas*.

A classe *Betaproteobacteria* compreende as bactérias fototróficas púrpuras não sulfurosas, várias quimiolitotróficas, algumas metilotróficas, quimiorganotróficas, fixadoras de nitrogênio e algumas patogênicas para plantas, humanos e animais. Alguns membros são de interesse biotecnológico devido a suas propriedades biodegradáveis (RAMOS, 2006).

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir que com aumento de meio suporte ocorreu acréscimo significativo na remoção de nitrogênio total, ou seja, o aumento da concentração de areia é fator relevante a ser considerado neste tipo de reator;

Pode-se considerar que ocorreu o processo de nitrificação, apesar de apresentar eficiência relativamente baixa, no entanto, não é possível afirmar que houve processo de desnitrificação.

O biofilme mostrou boa recuperação após condições adversas, tais como quedas de energia e adição de meio suporte. Pode-se observar que com um biofilme menos espesso obteve-se maior remoção de nitrogênio.

A identificação dos microrganismos presentes no biofilme mostrou-se como ferramenta importante no aprimoramento e conhecimento aprofundado dos sistemas de tratamento de águas residuárias.

Recomenda-se o desenvolvimento de trabalhos que considerem a realização de ensaios microbiológicos como foco principal, pois a identificação e estudo aprofundado das atividades microbiológicas envolvidas contribuirão muito para o processo de desenvolvimento de sistemas biológicos de tratamento de águas residuárias. É importante que, em trabalhos futuros, sejam utilizados sistemas de controle para minimizar os danos causados pelas quedas de energia e/ou interrupções no sistema de aeração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS- ABNT. NBR 7181/84: análise granulométrica: solo. Rio de Janeiro, 1984. 13p.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20.ed. Washington: APHA, 1998. 1368p.
3. CARVALHO JUNIOR, O. Nova configuração de biofiltro aerado submerso utilizado no pós-tratamento do efluente de reator UASB. 2008. 144f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - USP, São Carlos, 2008.
4. GEBARA, D. Desempenho de um reator aeróbio de leito fluidizado no tratamento de esgoto sanitário. 2006. 402 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2006.
5. GIESEKE, A. et al. Simultaneous P and N removal in a sequencing batch biofilm reactor: insights from reactor and microscale investigations. Water Research, New York, v.36, n.2, p.501-509, 2002.
6. IWAI, S.; KITAO, T. Wastewater treatment with microbial films. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1994. 183p.
7. MELLO, J. M. M. Biodegradação dos compostos btex em um reator com biofilme. 2007. 152 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
8. MELO, L. F.; VIEIRA, M. J. Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration. Bioprocess and Biosystems Engineering, New York, v.20, n.4, p.363-368, 1999.
9. MERCHUK, J. C.; BERZIN, I. Distribution of energy dissipation in airlift reactors. Chemical Engineering Science, New York, v.50, n.14, p.2225-2233, 1995.
10. NASCIMENTO, F. M. S. Aplicação da técnica PCR para detecção de bactérias potencialmente



- patogênicas em um sistema UASB-lagoas de polimento para tratamento de esgoto doméstico. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, 2008.
11. NICOLELLA, C.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v.80, n.1, p.1-33, 2000.
  12. PHILIPS, A. M. L. Utilização de reator de biodiscos para tratamento de efluentes com altas concentrações de nitrogênio. 2008. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2008.
  13. RAMOS, C. P. S. Análise dos padrões de utilização de códons sinônimos no genoma da bactéria *Chromobacterium violaceum*. 2006. 133f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2006.
  14. VAL-MORAES, S. P. Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA. 2008. 171f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, 2008.
  15. XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, n.76, n.1, p.2-13, 2003.