

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

*Estudo do Desenvolvimento do Biofilme e dos Grânulos
no Filtro Biológico Anaeróbio*

FERNANDO HERMES PASSIG

Dissertação Apresentada à
Escola de Engenharia de São
Carlos, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Hidráulica e
Saneamento

DEDALUS - Acervo - EESC



31100017308

ORIENTADOR : PROF. DR. CARLOS EDUARDO BLUNDI

SÃO CARLOS
Agosto, 1997



Class.	TESE-EESC
Cott.	14179
Tombo	T165197

Área: Hidráulica e Saneamento

31100017305

st 0927489

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC-USP

Passig, Fernando Hermes
P288e Estudo do desenvolvimento do biofilme e dos
grânulos formados no filtro biológico anaeróbio /
Fernando Hermes Passig. -- São Carlos, 1997.

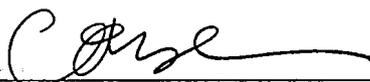
Dissertação (Mestrado). -- Escola de Engenharia
de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1997.
Área: Hidráulica e Saneamento
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Blundi

1. Filtro anaeróbio. 2. Hidrodinâmica do reator.
3. Biofilmes. 4. Grânulos. 5. Contagem bacteriana.
I. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: Engenheiro **FERNANDO HERMES PASSIG**

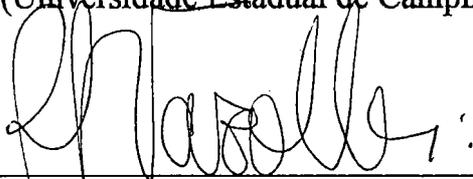
Dissertação defendida e aprovada em 06-8-1997
pela Comissão Julgadora:



Prof. Doutor **CARLOS EDUARDO BLUNDI (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



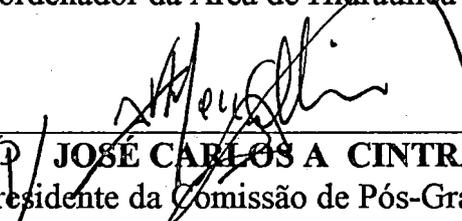
Prof. Doutor **EDSON APARECIDO ABDUL NOUR**
(Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP)



Prof. Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



Prof. Titular **FAZAL HUSSAIN CHAUDHRY**
Coordenador da Área de Hidráulica e Saneamento



Dr. **JOSÉ CARLOS A. CINTRA**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

*Para toda a minha Família,
especialmente aos meus pais*

Vilson e Solange

e a meu irmão

Rodrigo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Eduardo Blundi, pela orientação, pela amizade, pelo apoio, pela confiança no desenvolvimento desta pesquisa.

A Prof. Rosana F. Vazoller, pela co-orientação, pelo apoio, pela amizade, pelo incentivo e por sua dedicação e disponibilidade durante este trabalho.

Ao Prof. José Roberto Campos, pela amizade e pelo incentivo nos primeiros momentos deste trabalho;

Ao Prof. Eugênio Foresti, pela amizade, pelo apoio e pelo espaço cedido em seu laboratório para o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Prof. Jurandyr Povinelli, pelas valiosas contribuições quando do exame de qualificação;

Aos amigos Romeu Gadotti, Rosana Barbosa, Flavio Lapolli, Fernando Oliveira, Renan Lindner, Ana Freitas, Sergio Matsuzack, Regina Doria, Fabiano, Marco com os quais tive a alegria de conviver em São Carlos;

Ao grupo de Anaeróbios: Marcelo Zaiat, Marcia Daminiovic, Ivana de Nardi, Ariuska Cabral, Francisco Vella, Prof^ª. Bete Moraes, Diana, Viviana, Maria Lyda, Valdite, Flavia, Andreia, Laíze, Eraldo, Deise, pela amizade, pelo apoio, pelo auxílio e pelas valiosas contribuições.

Ao grupo de microbiologia: Bernandete Varesche, Isabel Sakamoto, Katia Prates, Juliana Araújo, Silvana, Sergio Larinzatti pelo carinho, incentivo, auxílio durante a pesquisa e constantes trocas de informações.

A Eloisa, Francisco, Roberto, Wagner, Luís, Edson, Paulo, Júlio, Cidinha, pelo auxílio no trabalho experimental e aos sempre prestativos Walcecir, Sergio, Marcia, Pavi, Sá;

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa estudos concedida;

A Fundação de Amparo à pesquisas do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DA BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	4
2.2 - AS BACTÉRIAS METANOGÊNICAS.....	6
2.3 - FILTRO ANAERÓBIO.....	11
2.3.1 - Histórico.....	11
2.3.2 - Conceituação.....	12
2.3.3 - Configuração do Filtro Anaeróbio.....	12
2.3.4 - Aplicações do Filtro no Tratamento de Efluentes.....	14
2.4 - BIOFILME.....	16
2.4.1 - Definição.....	16
2.4.2 - Desenvolvimento do Biofilme.....	16
2.4.3 - Processos que Governam a Formação do Biofilme.....	17
2.5 - GRÂNULOS E FLOCOS.....	28
2.5.1 - Fatores que Afetam o Processo da Granulação.....	29
2.5.2 - Estrutura do Grânulo.....	30
2.5.3 - Método de Avaliação do Crescimento de Biofilmes e do grânulos - Método do NMP.....	32
2.6 - HIDRODINÂMICA DO REATOR.....	35
2.6.1 - Escoamento Ideal.....	35
2.6.2 - Escoamento Não - ideal.....	36
2.6.3 - Técnica de Estimulo - Resposta.....	37
2.6.4 - Curvas de Distribuição do Tempo de Residência (DTR).....	38
3. - METODOLOGIA.....	44
3.1 - CONFIGURAÇÃO DO REATOR.....	44
3.2 - SUBSTRATO SINTÉTICO.....	47
3.3 - ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS.....	49
3.4 - ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.....	50
3.4.1 - Procedimentos para análise microbiológicas e materiais utilizados.....	50
3.4.2 - Monitoramento microbiológico do reator.....	62
3.4.3 - Crescimento do biofilme aderido ao material suporte.....	62
3.5 - TESTE HIDRODINÂMICO DO REATOR.....	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
4.1 - TESTE HIDRODINÂMICO DO REATOR.....	64
4.2 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO REATOR.....	68
4.3 - PERFIS DE CONCENTRAÇÕES.....	82
4.4 - PRODUÇÃO DE GÁS.....	86
4.5 - MONITORAMENTO MICROSCÓPICO DO REATOR.....	88
4.6 - ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.....	92
4.6.1 - Crescimento do biofilme aderido ao material suporte.....	92

4.6.2 - Exames microscópicos das morfologias predominantes no material suporte e grânulos utilizando a microscopia de varredura eletrônica.....	94
4.7 CONTAGEM BACTERIANA.....	99
4.7.1 Exames microscópicos das morfologias predominantes no material suporte e grânulos durante a contagem bacteriana.....	102
5. CONCLUSÕES.....	109
6. RECOMENDAÇÕES.....	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

1. LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Etapas do metabolismo anaeróbio, onde os microrganismos envolvidos são: 1-bactérias fermentativas, 2-bactérias acetogênicas produtora de H_2 , 3-bactérias acetogênicas ou homoacetogênicas consumidoras de H_2 , 4-bactérias metanogênicas redutoras de CO_2 , 5-bactérias metanogênicas acetoclásticas. Fonte: baseada em NOVAES (1986). 5
- FIGURA 2 - Esquema descritivo do crescimento do biofilme. Em que: Mb : massa do biofilme ; P: produtos de fermentação; S_F : substrato final, M_a : massa ativa; 1 = Fase Latente; 2= fase de crescimento acelerado do biofilme; 3=fase do crescimento linear do biofilme; 4=fase de diminuição do biofilme; 5=fase de estabilização do biofilme; e 6=fase do desprendimento do biofilme . (BELKHADIR et al., 1988). 19
- FIGURA 3 - Esquema proposto para estrutura do grânulo, com um arranjo populacional relacionado com o modelo de difusão do substrato e produtos, para grânulos alimentados com glicose. GUIOT et al. (1991). 31
- FIGURA 4 - Curva DTR normalizada. LEVENSPIEL (1974). 39
- FIGURA 5- Curva F para entrada tipo função degrau. LEVENSPIEL (1974). 40
- FIGURA 6- Curva C para entrada tipo função pulso. LEVENSPIEL, (1974). 40
- FIGURA 7- Anomalias que podem ocorrer no escoamento em reatores cujas características se aproximam do tubular. LEVENSPIEL, (1974). 43
- FIGURA 8. Esquema do Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e de Leito Fixo. 46
- FIGURA 9 - Foto do Sistema de distribuição de gases.1 - forno, 2 - bomba de vácuo, 3 - sistema de distribuição, 4 - mangueiras de

- silicone, 5 - filtro "Sterile Acrodisc", 6 - frascos, 7 - bico de Bunsen . 52
- FIGURA 10 - Esquema das Diluições. 53
- FIGURA 11 - Curva estímulo resposta obtida por injeção tipo pulso de Rodamina WT em filtro anaeróbio de fluxo ascendente, com TDH teórico = 24 horas. 64
- FIGURA 12 - Curva DTDH normalizada com modelos teóricos ajustados. Modelo de N-CSTR em série (—) e modelo de pequena dispersão (■). 65
- FIGURA 13 - Curva resposta modificada para desprezar a interferência causada pela interação Rodamina WT/PVC 67
- FIGURA 14 - Valores do pH afluente (pH-AFL) e efluente (pH-EFL) referentes a etapa I. 70
- FIGURA 15 - Valores do pH afluente (pH-AFL) e efluente (pH-EFL) referentes a etapa II. 70
- FIGURA 16 - Valores da alcalinidade total afluente (ALC-AFL) e efluente (ALC-EFL) referentes a etapa I. 71
- FIGURA 17 - Valores da alcalinidade total afluente (ALC-AFL) e efluente (ALC-EFL), referentes a etapa II. 71
- FIGURA 18 - Valores das concentrações de ácidos voláteis afluente (AV-AFL) e efluente(AV-EFL) no reator, referentes a etapa I. 72
- FIGURA 19 - Valores das concentrações de ácidos voláteis afluente (AV-AFL) e efluente(AV-EFL) no reator, referentes a etapa II. 72
- FIGURA 20 - Valores das concentrações de sólidos suspensos voláteis no afluente (SSVA), dentro do reator (SSVR) e no efluente (SSVE), referentes a etapa I. 75
- FIGURA 21 - Valores das concentrações de sólidos suspensos voláteis no afluente (SSVA), dentro do reator (SSVR) e no efluente (SSVE), referentes a etapa II. 75
- FIGURA 22 - Valores das concentrações de DQO afluente (DQO-AFL) e efluente(DQO-EFL) referentes a etapa I. 78
- FIGURA 23 - Valores das concentrações de DQO afluente (DQO-AFL) e efluente(DQO-EFL) no reator, referentes a etapa II. 78

- FIGURA 24 - Valores da eficiência da remoção de DQO referentes a etapa I. 79
- FIGURA 25 - Valores da eficiência da remoção de DQO referentes a etapa II. 79
- FIGURA 26 - Valores das análises de pH, DQO, alcalinidade total e ácidos voláteis representando os perfis de concentração na primeira etapa (ETAPA I). 84
- FIGURA 27 - Valores das análises de pH, DQO, alcalinidade total e ácidos voláteis representando os perfis de concentração na segunda etapa (ETAPA II). 85
- FIGURA 28 - Valores da concentração de metano nos primeiros 12 dias de operação do reator. 86
- FIGURA 29 - Valores da concentração de metano durante a operação do reator (etapa I e etapa II). 87
- FIGURA 30 - Fotomicrografias das amostras (A) grânulos, bacilos em pares, curtos, cocobacilos e aglomerado bacteriano no alto a direita; (B) grânulos, bacilos em pares; (C) grânulos, semelhantes a (A), com aglomerados bacterianos a esquerda; (D) grânulo, provável arranjo regular de uma fase de sarcinas metanogênicas. (Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25). Uma barra de $1\text{ cm} \cong 8\ \mu\text{m}$. 90
- FIGURA 31 - Fotomicrografias das amostras (A) biofilme aderido, bacilos fluorescente; (B) biofilme aderido, gênero *Methanosarcina* sp; (C) material em suspensão, bacilos livres, bacilos em pares, bacilos curvos; (D) material em suspensão, bacilos livres, bacilos em pares, bacilos curvos. (Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25). Uma barra de $1\text{ cm} \cong 8\ \mu\text{m}$. 91
- FIGURA 32 - Gráfico que representa o crescimento do biofilme aderido ao material suporte, PVC, em três alturas diferentes, baixo, médio e no alto, durante a operação do sistema. 92
- FIGURA 33 - Fotomicrografia de varredura eletrônica de análise do grânulo (A), (B), (C) e do biofilme aderido ao material suporte (D), (E) e (F). 97
- FIGURA 34 - Fotomicrografia de varredura eletrônica de análise do grânulo, (C), e do biofilme aderido ao material suporte, (A), (B), (D), (E) e (F). 98
- FIGURA 35 - Acompanhamento microscópico das análises de contagem bacteriana, referentes aos grânulos, (A), (B), (F) e o biofilme

aderido,(c), (D), (E). Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25, ou seja, uma barra de $1\text{cm} \cong 8\mu\text{m}$. 104

FIGURA 36 - Acompanhamento microscópico das análises de contagem bacteriana, referentes aos grânulos, (B), (C), (D), (F) e o biofilme aderido, (A), (E). Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25, ou seja, uma barra de $1\text{cm} \cong 8\mu\text{m}$ 106

FIGURA 37 - Acompanhamento microscópico das análises de contagem bacteriana, referentes aos grânulos, (B) e o biofilme aderido,(A),(C), (D), Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25, ou seja, uma barra de $1\text{cm} \cong 8\mu\text{m}$. 108

2. LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição do Substrato Sintético	47
TABELA 2 - Concentrações das soluções de sais minerais do substrato sintético.	48
TABELA 3 - Concentração de metais do substrato sintético.	48
TABELA 4 - Periodicidade de amostragens	49
TABELA 5 - Composição e Procedimento para a preparação do meio de cultura basal Zinder	55
TABELA 6 - Composição e procedimento para a preparação da solução Traço de Metais	56
TABELA 7- Composição e procedimento para a preparação das soluções de bicarbonato de sódio a 10 %	57
TABELA 8 - Composição e procedimento para a preparação da solução de Vitaminas	58
TABELA 9 - Composição e procedimento para a preparação da solução de Acetato de sódio	59
TABELA 10 - Composição e procedimento para a preparação da solução de Sulfeto de sódio 5%.	60
TABELA 11 - Composição e procedimento para a preparação da solução de Água de Diluição.	61
TABELA 12 - Valores médios, desvio padrão(δ), coeficiente de variação (CV) e valores máximos (MÁX) e mínimos (MIN), dos resultados da primeira etapa (ETAPA I)	81

TABELA 13 - Valores médios, desvio padrão(δ), coeficiente de variação (CV) e valores máximos (MÁX) e mínimos (MIN), dos resultados da segunda etapa (ETAPA II)	82
TABELA 14 - Resultados das análises nos dias de inoculações das contagens bacterianas	99
TABELA 15 - Resultado das contagens bacterianas, referentes as inoculações dos grânulos e do biofilme aderido ao material suporte, com leituras de 30 e 60 dias após as datas de inoculações .	101
TABELA 16- Valores de pH , alcalinidade total e de ácidos voláteis referentes as análises realizadas na etapa I	123
TABELA 17- Valores de pH , alcalinidade total e de ácidos voláteis referentes as análises realizadas na etapa II	124
TABELA 18 - Valores de DQO afluente, efluente e de remoção referentes a etapa I	125
TABELA 19- Valores de DQO afluente, efluente e de remoção referentes a etapa II	126
TABELA 20 - Valores referentes ao crescimento do biofilme em função da área do material suporte	127
TABELA 21- Valores referentes ao crescimento do biofilme em função da área do material suporte e por dia de operação	127
TABELA 22 - Série dos frascos de diluições que foram utilizados para encontrar, o valor do NMP	128

3. LISTA DE SÍMBOLOS

ALC - AFL	Alcalinidade total do afluente (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)
ALC - EFL	Alcalinidade total do efluente (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)
AV-AFL	Ácidos Voláteis Totais afluente (mg.L ⁻¹)
AV-EFL	Ácidos Voláteis Totais efluente (mg.L ⁻¹)
B	Área da concentração de células aderidas (M.L ⁻²)
COV	Carga orgânica volumétrica (kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹)
CSTR	Reator tubular de mistura contínua
DQO - AFL	Demanda química de oxigênio do afluente (mg.L ⁻¹)
DQO - EFL	Demanda química de oxigênio do efluente(mg.L ⁻¹)
DTR	Distribuição do tempo de residência
DTDH	Distribuição de tempo de detenção hidráulico
F	fração de traçador retido na superfície
F _t	Fração total de traçador retido na superfície
F _{zm}	Fração de Zona Morta
m _a	Massa ativa do biofilme
m _b	Massa do biofilme
μ	Taxa constante de crescimento específico local (T ⁻¹)
NMP	Número mais provável de bactérias viáveis
P	Produtos de fermentação
P _(anel)	Peso anel do suporte (g)
P _(Final)	Peso final do suporte (g)
P _(inicial)	Peso inicial do suporte (g)
pH - AFL	Potencial hidrogeniônico do afluente

pH - EFL	Potencial hidrogeniônico do efluente
r	regime
R_B^G	Taxa de crescimento local das células aderidas (M.T.L ⁻²)
sf	Substrato final
SSVA	Sólidos suspensos voláteis do afluente (mg.L ⁻¹)
SSVE	Sólidos suspensos voláteis do efluente (mg.L ⁻¹)
SSVR	Sólidos suspensos voláteis da massa líquida do reator (mg.L ⁻¹)
t	Tempo
TDH	tempo de detenção hidráulico (horas)
X	Posição

4. RESUMO

No presente trabalho, foi realizado um estudo sobre o desenvolvimento do biofilme e dos grânulos no interior de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente com material suporte em PVC, operado com baixa carga orgânica. Neste reator foram estudados o seu comportamento hidrodinâmico, utilizando-se as técnicas de estímulo e resposta, avaliando-se quantitativamente a biomassa bacteriana anaeróbia no biofilme e nos grânulos, utilizando-se as técnicas do NMP, identificando as morfologias bacterianas predominantes no biofilme e nos grânulos em suspensão, empregando-se exames sob microscopia de campo claro, contraste de fase, fluorescência e varredura. O reator foi operado e monitorado durante um período de 244 dias, sendo dividido em 2 etapas. A primeira (Etapa I) correspondeu da partida do reator até o 122º dia de operação, quando foi submetido a uma carga orgânica volumétrica (COV) média de $0,48 \text{ Kg DQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ e a um tempo de detenção hidráulico (TDH) médio de 23,12 horas, alcançando uma eficiência média em termos de DQO de $82 \pm 7 \%$. A segunda etapa (Etapa II) ocorreu do 122º até o 244º dia de operação, quando o reator foi acrescido de carga orgânica volumétrica atingindo-se $0,75 \text{ Kg DQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ e com um tempo de detenção hidráulico (TDH) médio de 23,12 horas. Nestas condições, o reator alcançou uma eficiência média em termos de DQO de $86 \pm 7 \%$. Nos exames microscópicos notou-se a presença de bactérias do gênero *Methanothrix* sp e *Methanosarcina* sp nos grânulos e no biofilme aderido. Na contagem bacteriana os grânulos e o biofilme aderido apresentaram basicamente a mesma quantidade de bactérias metanogênicas acetoclásticas.

Palavras-chaves: Filtro anaeróbio, hidrodinâmica de reator, biofilmes, grânulos, contagem bacteriana

5. ABSTRACT

This work reports on studies on the development of biofilm and granules in an upflow anaerobic filter operated at low organic load and containing PVC as support material. Initially, the reactor was subjected to stimulus-response studies in order to evaluate its hydrodynamic behavior. Afterwards, the fixed-film and granular biomass were quantified by utilization of MPN technique. Predominant anaerobic bacterial morphologies present in both biomass structures were identified using scanning electron and optical microscopy. The reactor was operated in two distinct phases during 244 days. The reactor was subjected to an organic loading rate of 0.48 Kg COD.m⁻³.day⁻¹ and to a hydraulic detention time of 23.12 hours during the first phase. This phase lasted 122 days and a mean COD removal efficiency of 82 ± 7% was attained. An organic loading rate of 0.75 Kg COD.m⁻³.day⁻¹ was applied to the reactor in second phase (from day 122 to day 244). In this phase, the COD removal efficiency attained a mean value of 86±7% at the same hydraulic detention time applied to the phase I, by microscopy exam, it was observed the presence of *Methanothrix* sp and *Methanosarcina* sp bacterium in the granules and in the attached biofilms. The same quantity of acetoclastic metanogenic bacterium was found in the granules and in the biofilms.

keywords: Anaerobic Filter, Hydrodynamic of reactor, biofilme, granules, bacterial quantified.

1. INTRODUÇÃO

A partir do momento em que o homem conscientizou-se que a natureza não suportava mais a poluição gerada por suas atividades, muitos pesquisadores dedicaram-se a investigar novas tecnologias que possibilitassem minimizar o problema da degradação ambiental e preservassem o meio ambiente através de soluções eficientes e de custo compatível.

Os processos de tratamento que asseguram a qualidade ambiental, têm sido objetos de muitas pesquisas durante os últimos anos, verificando-se uma verdadeira revolução nos conceitos concernentes ao tratamento de águas residuárias.

São inúmeros os tipos de tratamento de águas residuárias, mas os principais se fundamentam no tratamento biológico, no tratamento físico-químico e em operações físicas de separação, sendo que a aplicação dos processos biológicos quase sempre são as melhores alternativas

Dentre os processos biológicos pode-se destacar os processos aeróbios e os anaeróbios, sendo que em comparação com os processos biológicos aeróbios convencionais os processos anaeróbios apresentam algumas vantagens tais como: baixo consumo de energia, menor taxa de produção de lodo, alto grau de estabilização do lodo, requer menor quantidade de nutriente além de haver uma produção de biogás.

O filtro anaeróbio é um reator no qual a matéria orgânica é estabilizada através da ação de microrganismos que ficam retidos nos interstícios e apoiados no material suporte que constitui o leito, pelo qual ocorre a percolação dos efluentes líquidos (GUIMARÃES, 1990).

O filtro anaeróbio funciona essencialmente como reator de leito fixo, podendo ser de fluxo ascendente ou descendente, porém, o filtro anaeróbio ascendente, além de possuir biofilme aderido ao material suporte também possui considerável quantidade de agregados ou flocos com bactérias, e até grânulos que permanecem nos interstícios através dos quais ocorrem o escoamento do líquido (CAMPOS, 1990).

O filtro anaeróbio, apesar de ter sido evidenciado em 1969 após a publicação de Young & McCarty, o conhecimento atual sobre a composição de biofilmes e a cinética dos processos que ocorrem nesses complexos biológicos ainda encontram-se em estágios que demandam muitas pesquisas para poder explorar adequadamente toda a potencialidade colocada a disposição do homem (CAMPOS, 1994).

Neste trabalho, apresenta-se os resultados da operação de um filtro anaeróbio com material suporte de PVC, alimentado com substrato sintético simulando esgoto sanitário, sendo verificado o desenvolvimento do biofilme aderido ao material suporte e dos grânulos formados em seu interior, avaliando-se quantitativamente a biomassa anaeróbia e identificando as morfologias bacterianas predominantes.

OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi realizar um estudo comparativo sobre as atividades do biofilme aderido no meio suporte e dos grânulos de um reator anaeróbio de fluxo ascendente, na degradação da matéria orgânica.

Assim, os objetivos específicos foram:

- desenvolver uma concepção de reator anaeróbio (filtro anaeróbio) que permitisse a retirada de amostras do material suporte e em suspensão;
- estudar a hidrodinâmica do reator anaeróbio;
- avaliar quantitativamente a biomassa bacteriana anaeróbia no biofilme aderido ao material suporte e no lodo biológico em suspensão;
- identificar as morfologias bacterianas predominantes no biofilme aderido ao material suporte e no lodo biológico em suspensão

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DA BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

A biodigestão anaeróbia é um processo biológico natural que ocorre na ausência de oxigênio molecular, no qual populações bacterianas interagem estreitamente para promover a fermentação estável e auto-regulada da matéria orgânica, e da qual resulta, principalmente, os gases metano e dióxido de carbono (MOSEY, 1983).

No processo de digestão anaeróbia o catabolismo da matéria orgânica é realizado por microrganismos, que na sua maioria são bactérias anaeróbias pertencentes à varias espécies.

SPEECE (1983) definiu o processo anaeróbio como aquele no qual a matéria orgânica complexa é inicialmente hidrolisada, originando compostos de cadeias menores como açúcares, ácidos graxos e aminoácidos. Subseqüentemente, tem-se o estágio denominado de acidogênese, em que as moléculas resultantes da etapa anterior são degradadas a ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, butírico), dióxido de carbono e hidrogênio. A acetogênese é o terceiro estágio do processo, sendo intermediário entre a acidogênese e a metanogênese, na qual as bactérias acetogênicas transformam ácidos orgânicos em acetato e hidrogênio, e as bactérias homoacetogênicas transformam hidrogênio e dióxido de carbono em acetato. A última etapa é a metanogênica, em que o acetato é descarboxilado a metano, e o dióxido de carbono é reduzido pelo hidrogênio a metano. Na FIGURA 1, pode-se observar os quatros estágios descritos anteriormente.

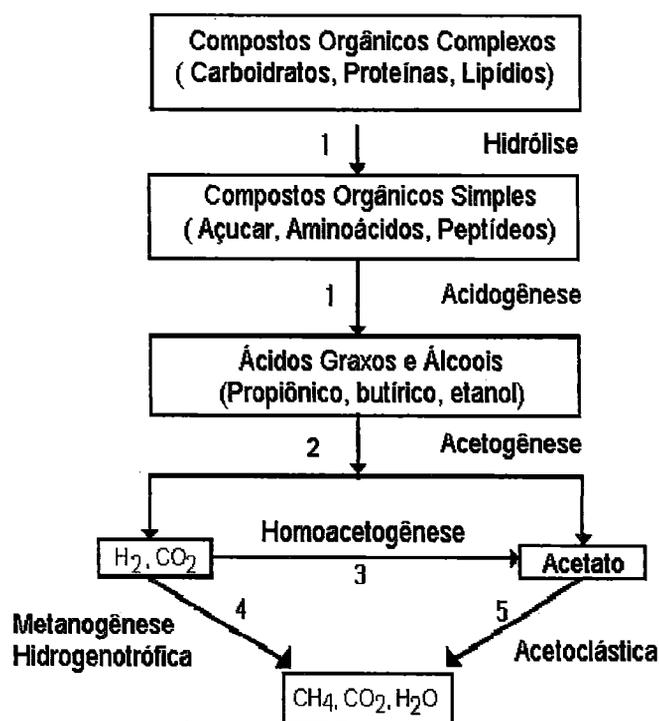


FIGURA 1- Etapas do metabolismo anaeróbico, onde os microrganismos envolvidos são: 1-bactérias fermentativas, 2-bactérias acetogênicas produtoras de H_2 , 3-bactérias acetogênicas ou homoacetogênicas consumidoras de H_2 , 4-bactérias metanogênicas redutoras de CO_2 , 5-bactérias metanogênicas acetoclásticas. Fonte: baseada em NOVAES (1986).

Nos estágios supracitados, estão envolvidas as bactérias hidrolíticas e fermentativas, bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio, bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio, bactérias homoacetogênicas, bactérias metanogênicas redutoras de dióxido de carbono e bactérias metanogênicas acetoclásticas (NOVAES, 1986).

Segundo NOVAES (1986), algumas características desses grupos bacterianos podem ser citadas, a saber:

- *Bactérias hidrolíticas fermentativas*, este grupo de bactérias é responsável pelos primeiros estágios da digestão anaeróbia: a hidrólise e a acidogênese. As bactérias hidrolíticas fermentativas produzem enzimas que são liberadas no meio para hidrolisar compostos orgânicos como celulose, proteínas, amido, transformando-os em compostos constituídos de moléculas menores, transportadas para o interior das células, que são fermentadas e convertidas a uma variedade de produtos como ácidos orgânicos (butírico, propiônico) e álcoois (etanol).

- *Bactérias Acetogênicas Produtoras de Hidrogênio*, convertem certos ácidos orgânicos a dióxido de carbono, hidrogênio e ácido acético, e os ácidos graxos saturados de cadeia longa e os aromáticos a ácido acético e dióxido de carbono.

- *Bactérias Homoacetogênicas*, ainda na fase da acetogênese (FIGURA 1) aparece um grupo de bactérias que possui o papel fundamental na produção de ácido acético a partir de hidrogênio e dióxido de carbono. Este grupo é denominado bactérias homoacetogênicas, o qual é caracterizado como quimiolitótrófo utilizador de hidrogênio e dióxido de carbono.

- *Bactérias Redutoras de Sulfato*, encontram-se freqüentemente associadas às metanogênicas em ambientes naturais produzindo ácido acético, hidrogênio e sulfetos, utilizados pelas metanobactérias.

- *Bactérias Metanogênicas*, são consideradas como a espécie de microrganismos mais importante a bacteriologia anaeróbia. São estritamente anaeróbias, e descarboxilam acetato a metano, dióxido de carbono e água.

2.2 - AS BACTÉRIAS METANOGÊNICAS

As bactérias metanogênicas pertencem ao reino Archaeobacteria por possuírem características celulares próprias, que as diferem das

eubactérias (reino Eubacteria) (DEL NERY, 1993). LARGE* apud VAZOLLER (1989), apresentou as diferenças básicas entre as metanobactérias e as eubactérias, destacando a constituição das paredes celulares, os lipídios de membrana e os tipos de enzimas e transportadores de elétrons.

Na parede celular das bactérias metanogênicas gram-positivas, por exemplo, apresenta-se um componente análogo a mureína das eubactérias, denominado pseudomureína. Esse componente, difere da mureína pela substituição do ácido murâmico pelo ácido L-talosaminurômico e pelas seqüências de aminoácidos (VAZOLLER,1989). Além dessas diferenças, existem outras referentes a componentes enzimáticos, como a presença da coenzima M, muito importante durante a metanogênese. Os transportadores de elétrons nas eubactérias são flavoproteínas, quinonas, citocromos e ferredoxina e nas metanogênicas são fatores enzimáticos particulares como o F_{420} e o F_{430} (BULL† apud DEL NERY, 1993).

Segundo DODDEMA & VOGELS‡ apud VAZOLLER (1989), a análise morfológica das metanobactérias tem sido bastante facilitada pelo emprego da microscopia de fluorescência em função da presença de cofatores enzimáticos, como o F_{420} , que confere às células metanogênicas a propriedade de tornar fluorescente sob determinado comprimento de onda, no caso da luz ultravioleta.

O papel da coenzima F_{420} está relacionado com o transporte de elétrons, e sua presença em culturas bacterianas é constatada através da utilização de radiação ultra violeta. Quando as culturas metanogênicas são

* LARGE, P.J. Methyloctroy and methanogens. Aspects of Microbiology. Eds. J.A.Cole, C.J. Knowles, D. Schlessinger, Washington, American Society of Microbiology, 1983. v8, 87p.

† BULL, A .M. et al. The distribution of bacterial activity in anaerobic fluidized bed reactors. Water Research, 18(1) 1017-1020, 1984.

‡ DODDEMA, H. J. & VOGELS, G. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol., 36:752-754, 1978.

submetidas a este tipo de exposição, a coenzima F_{420} na forma reduzida, apresenta fluorescência azul esverdeada. O F_{430} é caracterizado como um composto orgânico de coloração amarela não fluorescente, cuja estrutura contém quantidades consideráveis de níquel, que o distingue dos demais compostos biológicos (VIEIRA, 1989).

As metanobactérias são dependentes da atividade de outros organismos anaeróbios, principalmente em função de suas necessidades de fontes orgânicas bastante simples. A degradação da matéria orgânica complexa nos ecossistemas anaeróbios, como anteriormente referido se processa seqüencialmente, em direção a compostos simples, por meio do metabolismo de diversos grupos bacterianos BRYANT & WOLIN^{*} apud VAZOLLER (1989).

Segundo BRYANT et al.[†] e McINERNEY & BRYANT[‡] apud VAZOLLER (1989), o crescimento celular pode ocorrer em meio contendo amônia e sulfeto, ou ainda com outras fontes de nitrogênio e enxofre, respectivamente. Os compostos mais utilizados como fonte de carbono e energia para o crescimento de bactérias metanogênicas são o acetato, a mistura de hidrogênio e dióxido de carbono, o formiato, o metanol, e metilaminas.

Dentre os compostos supracitados, VAZOLLER (1989) afirmou que nenhuma espécie de bactéria isolada é capaz de utilizar todos os

^{*}BRYANT, M.P. & WOLIN, M.J. Methanogenic bacteria and their interactions. Seminar of Role of Bacteria in Producing Non-polluting Fuel-73rd In: Annual Meeting of the American Society of Microbiology, 73rd, Florida, 1973 p. 17

[†]BRYANT, M.P.; TZENG, S.F.; ROBINSON, I.M.; JOYNER Jr., A.E. Nutrient requirements of methanogenic bacteria. *Adv. Chem. Ser.*, 105.: 23-39, 1971.

[‡]McINERNEY, M.J. & BRYANT, M.P. Review of methane fermentation fundamentals. In: *Fuel gas production from biomass*. Ed. D.L. Wise, West Palm Beach, 1981 p. 19-47

substratos metanogênicos potenciais. OREMLAND* apud VAZOLLER, (1989), indicou que, as bactérias do gênero *Methanotherix* sp utilizam somente o acetato como substrato. BRYANT et al.⁵ apud VAZOLLER (1989), salientou que o acetato parece ser essencial para o anabolismo de algumas espécies bacterianas tais como a *Methanobrevibacter smithii*, e a *Methanobrevibacter ruminatium*.

A grande maioria das bactérias metanogênicas isoladas de sistema de tratamento de águas residuárias e de ambientes anaeróbios naturais, utiliza como substrato hidrogênio e dióxido de carbono para a produção de metano. Essas bactérias são denominadas metanogênicas hidrogenotróficas e cabe a elas manter o equilíbrio termodinâmico do hidrogênio no meio em digestão VAZOLLER (1989).

Existem dois gêneros de bactérias metanogênicas, que podem utilizar compostos de dois carbonos como o ácido acético : *Methanosarcina* sp e a *Methanotherix* sp (oficialmente denominada de *Methanosaeta* sp). A *Methanosarcina* sp , além do acetato, pode utilizar hidrogênio e dióxido de carbono, metanol e metilaminas. Já, a *Methanotherix* sp, bactérias mesófilas, utilizam somente o acetato. As metanobactérias que utilizam acetato são denominadas acetoclásticas (VAZOLLER, 1989).

A natureza das interações metanogênicas varia com os tipos de organismos envolvidos e com os compostos orgânicos disponíveis. Essas interações ou "parcerias" das bactérias metanogênicas com outros anaeróbios podem ser sintróficas obrigatórias. Somente quando os substratos para a formação do metano estão no ambiente anaeróbio, porém não gerados pela atividade das outras bactérias, é que as metanogênicas se desenvolvem independentemente (SAKAMOTO, 1996).

* OREMLAND, R.S. Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In: Biology of Anaerobic Microorganism. Ed. A.J.B. Zehnder, Wageningen, John Wiley & Sons, 1988 p. 641-706.

Segundo MAH & SMITH^{*} apud VAZOLLER (1989), é necessário para o cultivo das bactérias metanogênicas alguns elementos traços tais como: cobalto, ferro, molibdênio, magnésio e potássio. A faixa de temperatura em que as metanogênicas se desenvolvem é ampla. ZEIKUS & WINFREY[†] apud VAZOLLER (1989) observaram a produção de metano a temperatura de 4 a 55°C, com um rendimento ótimo entre 35 e 42°C. A maioria das metanogênicas é mesófila, sendo por volta de 37°C a temperatura ideal para o crescimento e produção de metano. A faixa de pH ideal para o crescimento e produção do metano está entre 6,8 e 7,2 tanto para cultivos puros como mistos (McINERNEY & BRYANT[‡] apud VAZOLLER, 1989).

O potencial de oxi-redução necessário ao desenvolvimento de bactérias metanogênicas se situa ao redor de -200mV em seus habitats naturais, e entre -330 e -400mV, em cultivos controlados, tanto puros como mistos (HUNGATE[‡], McINERNEY & BRYANT[‡], apud VAZOLLER, 1989). Portanto, toda e qualquer técnica a ser utilizada no isolamento e manipulação de bactérias metanogênicas em culturas axênicas deve privilegiar a eliminação do agente oxidante. Sem dúvida, o oxigênio é o agente oxidante mais comum na natureza, bastam 10 de suas moléculas por litro do sistema para se obter um potencial de oxi-redução de -330mV HUNGATE¹⁰ apud VAZOLLER (1989). Assim, as técnicas microbiológicas utilizadas para o cultivo das metanobactérias empregam gases como nitrogênio, hidrogênio, dióxido de carbono, hélio ou misturas desses gases em substituição a atmosfera normal (MAH & SMITH[‡] apud VAZOLLER (1989).

* MAH, R.A.; SMITH, M.R. The methanogenic bacteria. In: The Prokaryotes. Eds M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel. Heidelberg, Springer-Verlag, 1981. p.948-77.

† ZEIKUS, J.G. & WINFREY, M. Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. Applied and Environmental Microbiology, 31: 99-107, 1976.

‡ HUNGATE, R.E. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in microbiology. Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons, New York, New York: Academic, 1969. v.38, p117-132.

Esses gases são comprimidos em cilindros, e ainda contém pequenas quantidades de oxigênio, que devem ser removidas totalmente fazendo-se o gás atravessar uma coluna aquecida a 350°C (HUNGATE¹⁰; LJUNGDAHL & WIEGEL *apud VAZOLLER, 1989).

Além disso, no preparo de meio de cultivo e soluções reagentes, o oxigênio nele dissolvido é eliminado submetendo-os a fervura sob atmosfera gasosa e uso de agentes redutores (HUNGATE ¹⁰;DUBOURGUIER, apud VAZOLLER,1989).

Substâncias indicadoras de oxi-redução são utilizadas e, para as metanobactérias, a mais comum é a resazurina. A resazurina age inicialmente como indicador de pH, tornando-se azul em pH alcalino e vermelha em pH ácido. Uma vez reduzida, a resazurina origina um composto incolor, a resofurina, que desta forma serve como um indicador de oxi-redução, apresentando-se cor-de-rosa quando oxidada e incolor quando reduzida (HUNGATE † apud VAZOLLER 1989).

2.3 - FILTRO ANAERÓBIO

2.3.1 - *Histórico*

O desenvolvimento do filtro anaeróbio deve-se em princípio a publicação de YOUNG & McCARTY (1968), elaborada com base em dados de pesquisa realizados a partir de 1963, na qual são mostrados resultados

* LJUNGDAHL, L. & WIEGEL, J. Working with anaerobic bacteria. In: Manual of Industrial Microbiology & Biotechnology. Eds. A.L. Demain e N.A. Solomon, Washington, American Society Microbiology, 1986. p 84-96.

† HUNGATE, R.E. The microbiology of biodigestion. In: Simpósio Latino Americano para Produção de Biogás da Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo, 1982. p 91.

obtidos, sobre a operação desse tipo de reator, alimentado com despejo líquido sintético. Os resultados mostraram a eficiência na remoção de DBO superior a 80%, para um tempo de detenção hidráulico inferior a 24 horas.

Deve ser lembrado, contudo, que historicamente essa publicação foi precedida por trabalhos de COULTAR et al. (1957), WINNEMBERG (1961), e STANDER (1963), que despertaram menor interesse na época (CAMPOS, 1990).

2.3.2 - Conceituação

O filtro anaeróbio é um reator no qual a matéria orgânica é estabilizada através da ação de microrganismos que ficam retidos nos interstícios e apoiados no material suporte que constitui o leito, pelo qual ocorre a percolação dos efluentes líquidos (GUIMARÃES, 1990).

De acordo com CAMPOS (1990), o vocábulo "filtro" apesar de muito utilizado no meio técnico científico não representa a realidade, pois tanto o filtro anaeróbio como o aeróbio, não efetuam a filtração segundo seu significado específico, assim sendo uma denominação precisa seria: Reator Anaeróbio de Leito Fixo Submerso com Fluxo Ascendente ou descendente.

2.3.3 - Configuração do Filtro Anaeróbio

2.3.3.1 - Forma do Reator

A maior parte dos filtros anaeróbios de médio e grande porte é constituída de unidades retangulares ou quadradas; porém em muitos casos, também pode-se adotar com facilidade unidades circulares (CAMPOS, 1990).

2.3.3.2 - Altura do Reator

Sabe - se que as maiores taxas de remoção de substrato ocorrem nos níveis mais baixos do leito e no fundo falso (quando o fluxo é ascendente), nesta região existe grande concentração de sólidos biológicos. Os sólidos biológicos que se formam nas camadas mais profundas do leito são mantidos em suspensão, na forma de flocos ou grânulos e podem apresentar elevada capacidade de degradação dos mais diferentes substratos (CAMPOS,1990).

Por este motivo muitos pesquisadores, abandonaram o filtro anaeróbio e partiram para o reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB). Mas, o filtro anaeróbio tem a vantagem de ter grande capacidade natural de superar a introdução de cargas de choques ou de agentes tóxicos ou inibidores dentro de certos limites evidentemente (CAMPOS,1990).

Assim sendo, a altura do filtro pode variar de acordo com o seu recheio, se forem utilizados recheios comerciais, sua altura pode variar na faixa de 3 a 13 m, mas ao se optar por brita, a altura do leito pode ser de 0,8m a 2 m (CAMPOS,1990).

2.3.3.3 - Material Suporte

A camada suporte tem por finalidade principal reter sólidos biológicos no interior do filtro anaeróbio. Esses sólidos biológicos encontram-se aderidos a superfície do material suporte na forma de biofilme, ou presos nos espaços intersticiais dessa camada na forma de agregados, tais como flocos e grânulos. Desta forma, a camada de material suporte atua como

dispositivo para separar os sólidos dos gases, ajuda a promover a uniformização do escoamento no reator, melhora o contato entre os constituintes do despejo afluyente e os sólidos biológicos contidos no reator e permite o acúmulo de grande quantidade desses sólidos necessários para aumentar o tempo de retenção celular (YOUNG, 1990).

Como material suporte podem ser empregados diferentes materiais tais como módulos tubulares, anéis tipo "pall", anéis de "PVC", esferas perfuradas, elementos cerâmicos, pedras entre outros (CAMPOS, 1990).

De acordo com YOUNG (1990), em países como Estados Unidos, prevalece o uso de módulos e anéis, porém, em países em desenvolvimento o uso de pedras (britas N° 4) é muito mais econômico apesar do grande volume útil perdido, (cerca de 50 %) pela sua inclusão no reator (CAMPOS, 1990).

O material suporte tem como finalidade principal a diminuição do número de Reynolds garantindo um escoamento laminar e servindo de suporte bacteriano na formação do biofilme (YOUNG, 1990).

YOUNG (1990) concluiu que é muito mais importante para o projeto, o efeito do tamanho dos interstícios, da disposição e a forma do material suporte, do que o valor de sua superfície específica.

2.3.4 - Aplicações do Filtro no Tratamento de Efluentes

Os filtros anaeróbios tem sido objeto de intensas pesquisas em grande números de países, industrializados ou não. A maior parte dos estudos existentes foi realizada nos Estados Unidos e Canadá. No Brasil, embora em quantidade bastante inferior, alguns estudos foram realizados

em escala piloto com poucas experiências em escala real (CARVALHO, 1994).

A maior parte dos trabalhos publicados versando sobre filtros anaeróbios é voltada ao tratamento de despejos industriais, em que as concentrações de matéria orgânica são bem superiores às do esgoto sanitário, com a predominância na forma solúvel (KAMIYAMA,1993).

Geralmente, o desempenho dos filtros anaeróbios no tratamento de esgotos sanitário não é muito satisfatório devido à formação de sulfetos e amônia durante o processo, elevando, desta forma, a DQO do efluente. Além disso, como a produção de gás é pequena, devido a baixa concentração da matéria orgânica presente neste tipo de despejo, o tratamento só é viável caso o aquecimento necessário seja mínimo, ou o processo possa ocorrer eficientemente a temperatura ambiente. Por outro lado, existe ainda um outro agravante que é a quantidade de sólidos em suspensão geralmente encontrada no esgoto sanitário, que pode levar a obstrução da camada de material suporte (HENZE & HARREMÖES, 1983).

Com relação à utilização do filtro anaeróbio para o tratamento de esgoto sanitários sem digestão preliminar, pode-se constatar que poucos estudos foram relatados até a presente data (CAMPOS,1990). Entre esses, KOBAYASHI et alii* apud CAMPOS (1990), operaram, em escala de laboratório, um filtro anaeróbio com enchimento de plástico de alta área superficial específica para o tratamento de esgotos domésticos com DBO média de 288 mg.L^{-1} , tempo de detenção de 24 horas, temperatura de 20, 25 e 35 °C, taxa de aplicação média de $0,32 \text{ Kg DBO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. O efluente do filtro, apresentou valores de eficiência de 79 e 73% em relação a DBO e DQO respectivamente.

* KOBAYASHI, H. A.; STENSTRON, M. K.;MAH, R. A. Treatment of low strength domestic wastewater using the anaerobic filter. Water Research, 17, (8) 903-909, 1983

INAMORI et al^{*} apud CARVALHO,1994 através de experimentos com filtros anaeróbios de fluxo ascendente, verificaram que o esgoto sanitário sintético (DBO de 200 mg.L⁻¹), pode ser tratado eficientemente neste reator pois sua remoção de DBO foi superior a 70 %, para um tempo de detenção superior a 15 horas.

DALTRO (1988), estudando efeito da altura no desempenho dos filtros anaeróbios no tratamento de esgoto sanitário "in natura" com uma DQO média de 534 mg.L⁻¹, verificou que a temperatura ambiente média de 25 °C e tempo de detenção hidráulico e 8 a 24 horas, ocorreu uma remoção média de 59% para o filtro alto, e 52% para o filtro mais baixo.

2.4 - BIOFILME

2.4.1 - Definição

O biofilme pode ser definido como um agrupamento de microrganismos e seus produtos metabólicos (em sua maior parte, polissacarídeos extracelulares) associados uma superfície sólida (viva ou inanimada) (BRYERS, 1988).

2.4.2 - Desenvolvimento do Biofilme

O desenvolvimento inicial de um biofilme ocorre quando uma superfície "limpa" é exposta em um ambiente aquoso, tornando-se acondicionada pelos constituintes químicos (nutrientes) presentes. Inevitavelmente, os microrganismos associam-se à essa superfície, aderem, e então, fixam-se firmemente. Uma vez que esses colonizadores primários encontram-se firmemente presos à superfície, o metabolismo e o

^{*} INAMORI,Y.; SUDO,R.; GODA,T. Domestic sewage treatment using na anaerobic biofilter with na aerobic biofilter . In: MATSUMOTO,J. & MATSUO,T. Treatment, disposal and management of human waste. Oxford: Pergamon Press, 1996 p 209-216.

crescimento da comunidade tornam-se dependentes das condições locais. Deste modo, uma matriz gelatinosa se forma sobre a superfície, aprisionando nutrientes e, no caso de culturas mistas, atraindo outros microrganismos para a comunidade do biofilme (BRYERS, 1988).

A medida que a espessura do biofilme aumenta, micro-comunidades desenvolvem-se em camadas e sub-camadas. Eventualmente, a espessura do biofilme atinge um estado de equilíbrio, no qual os processos formadores do biofilme são equilibrados pelos processos que reduzem ou removem o biofilme (BRYERS, 1988).

2.4.3 - Processos que Governam a Formação do Biofilme

Na literatura disponível entre vários autores que tratam sobre o tema, existem dois autores, que descrevem sobre os processos que governam a formação do biofilme, que são o BRYERS (1988) e o BELKHADIR et al. (1988), portanto nos parágrafos subseqüente far-se-á uma junção destes dois artigos, tentando correlacionando-os.

Segundo BRYERS (1988), a instalação e a formação inicial do biofilme resultam de interações entre processos como: deposição, metabolismo e remoção. BELKHADIR et al. (1988) acompanharam o crescimento de biofilmes anaeróbios levando em consideração diferentes metodologias propostas pela literatura para avaliar a espessura do biofilme, concluiu que os resultados experimentais demonstraram que o crescimento de um biofilme anaeróbio segue seis estágios, de acordo com a FIGURA 2.

2.4.3.1 - Fase Latente - 1

Esta fase é caracterizada por 2 etapas, a primeira ocorre devido a uma breve adsorção de moléculas orgânicas sobre o suporte previamente

"limpo" (pré condição de superfície, ou uma etapa passiva de fixação), que favorece a implantação de uma segunda etapa, caracterizada pela fixação de bactérias isoladas, etapa ativa ou reversível, (aderência). Nota-se também que, o crescimento não dá lugar à formação do biofilme uniforme (BELKHADIR et al., 1988).

Segundo BRYERS (1988), dentre os processos de deposição pode-se ressaltar a pré - condição de superfície e a aderência e nos processos metabólicos a formação de polímeros extracelulares. Estes processos podem ocorrer na fase latente, e portanto serão descritos a seguir:

- Pré - condição de superfície

A pré - condição de superfície depende, principalmente do tipo de suporte que está sendo utilizado, portanto, de suas características químicas (BRYERS, 1988).

A adsorção de quantidades mensuráveis de moléculas orgânicas (na maioria, proteína) na superfície do material suporte ocorre dentro de minutos de exposição (talvez, segundos) e pode ser causada unicamente pelo efeito de difusão molecular. A quantidade total de moléculas orgânicas adsorvidas é insignificante em relação ao biofilme maduro, embora esta camada inicial seja suficiente para o pré condicionamento da superfície, influenciando, desta forma, em outros eventos (CARVALHO, 1994).

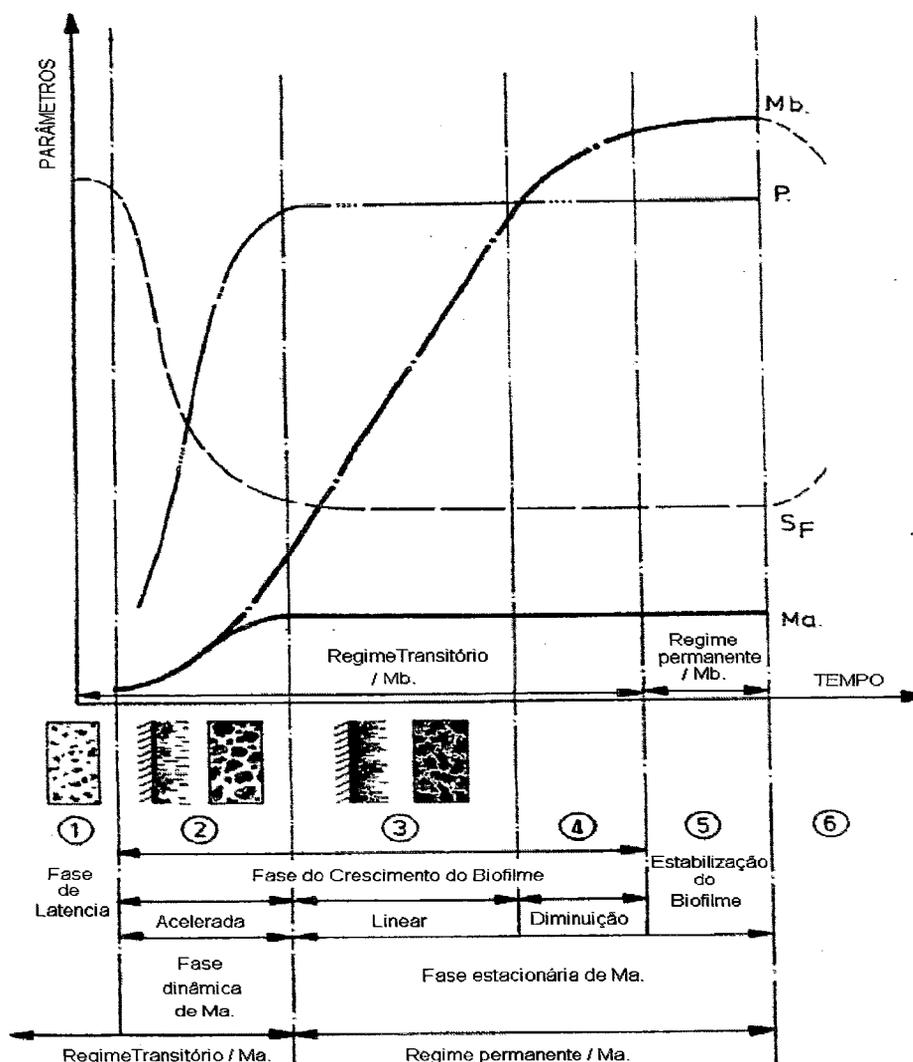


FIGURA 2 - Esquema descritivo do crescimento do biofilme. Em que: Mb : massa do biofilme ; P: produtos de fermentação; S_F : substrato final, Ma: massa ativa; 1 = Fase Latente; 2= fase de crescimento acelerado do biofilme; 3=fase do crescimento linear do biofilme; 4=fase de diminuição do biofilme; 5=fase de estabilização do biofilme; e 6=fase do desprendimento do biofilme . (BELKHADIR et al., 1988).

VERRIER et al. (1988) verificaram a aderência inicial de quatro culturas puras de bactérias metanogênicas em superfícies poliméricas (propileno, PVC e poliamida), sob condições anaeróbias. Os resultados mostraram que a espécie *Methanosarcina mazei* não aderiu em nenhum dos suportes estudados. Enquanto que, a espécie *Methanotherix soehngeni* aderiu preferencialmente a polímeros hidrofóbicos, a espécie

Methanospirillum hungatei preferiu superfícies hidrofílicas e a espécie *Methanobrevibacter arboriphilicus* aderiu sobre todas as superfícies. A acumulação de biomassa foi rápida no propileno em relação ao PVC, e foi bem devagar na poliamida, mostrando portanto, a vantagem de superfícies hidrofóbicas na aderência. A hidrofobicidade do material foi testada verificando-se o ângulo de contato com a água. Quanto maior o ângulo de contato, maior a hidrofobicidade.

SANCHEZ et al. (1994), estudando a colonização microbiana em diferentes materiais suportes como sepiolita, terra diatomácea, PVC, poliuretano e bentonita, verificaram, pelo aumento da produção de metano e através das microscopia de varredura e de fluorescência, e da estimativa do número mais provável de células viáveis, que a colonização microbiana em diferentes materiais suportes é rápida, e ocorre nas primeiras 24 horas de incubação do lodo. A microscopia de varredura eletrônica revelou a presença predominante de filamentos na forma de um gênero metanogênico semelhante a *Methanothrix* sp, localizados na superfície e no centro da estrutura do biofilme.

- Aderência

As bactérias podem aderir à superfície do suporte de forma reversível ou irreversível. O fenômeno de aderência reversível pode ser atribuído ao fato de que as células podem ser facilmente removidas da superfície do suporte devido ao arraste provocado pelo movimento de líquido ou sua capacidade de mobilidade. A aderência irreversível está muitas vezes associada à produção de polímeros extracelulares. Porém, não está claro se esses polímeros são produzidos antes ou depois das células aderirem reversivelmente à superfície do material suporte (BRYERS, 1988).

De acordo com COPP & KENNEDY* apud VERRIER et al. (1988), nos reatores com biofilme e escoamento descendente, a rugosidade do material suporte interfere positivamente na formação do biofilme. Entretanto, nos reatores de escoamento ascendente, a área superficial específica e a porosidade não são tão importantes quanto o tipo e forma do material suporte (YOUNG & DAHAB, 1983). A influência da composição do substrato também é evidente, já que a fonte de carbono determina o equilíbrio microbiológico e a composição química importante para que ocorra a adesão das células da aderência. Por exemplo, os íons de cálcio e magnésio são conhecidos como beneficiadores da taxa de adesão celular (VERRIER et al., 1988).

- Produção de polímeros extracelulares

Os biofilmes encontrados por BRYERS, (1988) não foram constituídos de agrupamentos em camadas sucessivas, mas consistiram de um conjunto de células entrelaçadas dentro de uma matriz gelatinosa constituída por polímeros extracelulares. Esses polímeros foram ser produzidos pelos primeiros colonizadores da superfície do material suporte, a fim de reforçar a ligação entre as células e a superfície.

LA MOTTA† et al. apud BRYERS (1988), com intuito de aumentar a aderência das bactérias nitrificantes ao material suporte (no caso, plástico), e desta forma reduzir o período de partida do reator, fizeram pré-tratamento da superfície do suporte com vários polímeros comerciais e polímeros extracelulares proveniente de bactérias. Os resultados indicaram que os polímeros produzidos naturalmente foram mais eficientes que os sintéticos.

* COPP, G.H. & KENNEDY K.J. Support materials for downflow stationary fixed film (DSFF) methanogenic reactors. J. Ferment. Technol., **61**, 333-336 1983.

† LA MOTTA, J.E. et al., Effect of polyelectroles on biofilm growth. J. Environmental Engineering Division, **108** (EE6), 1326-1341, 1982

EHRLINGER et al. apud CAMPOS (1992), estudando a formação de biofilmes em reatores anaeróbios operados com diferente despejos líquidos sintéticos, observaram maior produção de polissacarídeos celulares quando se empregou a glicose como substrato, do que quando se utilizou proteínas. Esse fato foi atribuído à predominância de bactérias acidogênicas responsáveis pela produção de grande quantidade de polissacarídeos.

2.4.3.2 - Fase de Crescimento Acelerado do Biofilme - 2

Esta fase corresponde a uma evolução muito rápida da formação do biofilme, sobretudo, as pequenas colônias espalhadas na superfície podem se multiplicar rapidamente e cobrir toda a superfície do material suporte. Pode-se caracterizar esta etapa por alguns aspectos a saber: - queda extremamente rápida da concentração do substrato; - grande produção de produtos de fermentação (etanol, ácido acético); - acúmulo de biomassa fixa, que ao final desta fase forma uma camada uniforme com espessura da ordem de 50 a 80 μm (BELKADIR et al., 1988).

Segundo BELKADIR et al. (1988), esta fase, do ponto de vista prático, é fundamental uma vez que traduz a essência dos processos biológicos, (o crescimento da biomassa ativa, a diminuição da concentração do substrato e a elaboração dos produtos finais).

Nesta fase podemos correlacionar o esquema apresentado na FIGURA 2, com os seguintes processos metabólicos: - o consumo de substrato, crescimento celular e replicação; - crescimento endógeno, morte e lise celular, os quais serão apresentados a seguir.

- Consumo de substrato, crescimento celular e replicação

O crescimento e a replicação das células presas num biofilme podem ser descritos usando uma função autocatalítica da concentração celular, semelhante àquela usada para situações de células suspensas isto é:

$$R_B^G(t) = \mu B(t) \quad (1)$$

em que:

R_B^G : Taxa de crescimento local das células aderidas ($M \cdot L^{-2} \cdot T^{-1}$)

μ : Taxa constante de crescimento específico local (T^{-1})

B : Área da concentração de células aderidas ($M \cdot L^{-2}$).

A cinética de crescimento do biofilme difere daquela dos sistemas de células em suspensão. Essas diferenças ocorrem porque as células se ligam a uma superfície e produzem exopolímeros, apresentando estequiometria celular diferente das células suspensas. Além disso, no biofilme, a taxa de crescimento específico (μ) é uma função da concentração do substrato, o qual é ditado não somente pela taxa de reação biológica, como o aumento também, pela resistência de transferência de massa (devido ao aumento da espessura do biofilme). No caso de biofilmes com várias espécies, mesmo a concentração das células ligadas deve ser em função da posição e do tempo, isto é $B(x, t)$ (BRYERS, 1988).

Os estudos sobre a cinética dos processos que ocorrem em biofilmes está relacionado com o fluxo de substrato para o interior dos mesmos e com o fluxo de subprodutos do metabolismo no sentido inverso. O transporte de substrato no interior do biofilme e na interface biofilme - líquido é governado pela difusão do mesmo nestes meios (HENZE & HARREMÕES, 1983).

Geralmente, os modelos matemáticos que se propõem atualmente para estudos de biofilmes, fundamentam-se nas leis de difusão de Fick e na cinética baseada em reações de ordem zero a primeira ordem e nas equações do tipo Monod. Infelizmente, a maior parte desses estudos

fundamenta-se na consideração em que a espessura do biofilme é constante, embora o substrato seja continuamente consumido, e por simplicidade matemática, que o aumento do biofilme devido ao crescimento é desprezível ou equilibrado pelos processos que diminuem o biofilme (BRYERS,1988).

- Crescimento endógeno

Os conceitos de morte e lise celular, ou são ignorados na maioria dos modelos matemáticos, ou são considerados como um processo global, denominado crescimento endógeno, que por sua vez para as culturas em suspensão pode implicar na perda de massa celular (ou a mudança do estado de oxidação do material celular) associada a dois fatores: - ausência prolongada de um substrato exógeno ; - requerimento constante de energia pela célula, a fim de manter uma determinada atividade metabólica (BRYERS,1988).

A cinética de crescimento de um biofilme nas condições de regime dinâmico estável, significa que todo o processo equilibra-se sobre a produção de massa de biofilme, sendo, portanto, constante (RITTMANN & MCCARTY,1980; BRYERS,1988). Infelizmente, esta aproximação engloba no conceito de crescimento endógeno processos como remoção do biofilme devido as forças de cisalhamento, produção de polímeros extracelulares, lise, soltura e predação no topo do decaimento, superestimando-se o decaimento constante no desenvolvimento do biofilme. Na verdade, a maior responsável pela manutenção de uma espessura constante seria a hidrodinâmica do reator, e não o crescimento endógeno (BRYERS,1988).

2.4.3.3 - Fase de Crescimento Linear do Biofilme - 3

Essa fase corresponde a uma acumulação à taxa constante do biofilme sobre o suporte, e se caracteriza por : - uma concentração do substrato na saída do fermentador constante e mínima, e a concentração de

produtos de fermentação (etanol, ácido acético) constante e máxima. Sob o ponto de vista do conceito, a evolução linear do biofilme no suporte é uma diminuição do processo em relação a fase anterior, sendo que as causas da diminuição estão ligadas a saturação do suporte, que muitas vezes é dependente uma das outras, tais como : - dificuldade de transferência e da difusão do substrato no interior do biofilme; - efeitos de inibição pela densidade celular; - acúmulo de produtos tóxicos no interior do biofilme (BELKADIR, et al.1988).

2.4.3.4 - Fase de Diminuição do Biofilme - 4

A fase de diminuição se constitui numa transição entre a acumulação a taxa constante de biofilme e sua estabilização a valores máximos, em massa e espessura. Representa uma diminuição ligada à restrições hidrodinâmicas (cisalhamento), que impede o aumento da espessura do biofilme. O sistema tende a uma produção constante de biofilme (massa e espessura constantes) (BELKADIR et al.,1988). Os autores verificaram ainda que nas próximas fases ocorreram perdas de biofilme para o sistema.

BRYERS (1988), afirma que o biofilme pode ser removido de uma superfície por uma das seguintes formas: predação, abrasão, cisalhamento e desprendimento.

- Predação

É comum ocorrer a ação de predadores (predação), tais como protozoários no biofilme, mas esse processo não tem sido considerado em modelos matemáticos, além disso, não existem estudos experimentais que envolvam essas comunidades.

- Efeito de Abrasão

Ocorre quando a biomassa capturada nos interstícios do material suporte (p. ex. esferas de polietileno) sofre agitação, de modo que as



partículas colidam e a abrasão resultante continuamente remove o excesso de biomassa. Esta ação é evidenciada em reatores de leito fluidificado.

- Efeito das Forças de Cisalhamento

Vários trabalhos mostram que o material do biofilme é removido continuamente à medida que o mesmo se desenvolve. TRULEAR* apud BRYERS (1988) mostrou que uma quantidade significativa de biomassa suspensa é removida continuamente do biofilme, e as taxas de remoção do biofilme são proporcionais à quantidade de biofilme presente até uma certa espessura. Entretanto, alguns estudos têm indicado que a hidrodinâmica do reator tem grande influência na taxa de remoção, uma vez que a espessura do biofilme ultrapassa a região de escoamento laminar e as forças de cisalhamento aumentam praticamente na mesma proporção, conseqüentemente, a taxa de remoção do biofilme torna-se maior (BRYERS & CHARACKLIS† apud BRYERS, 1988).

- Desprendimento

O desprendimento é um evento em que grandes quantidades ou seções inteiras do biofilme se soltam da superfície do material suporte. Ao contrário da ação das forças de cisalhamento, o desprendimento ocorre periodicamente. Não existem explicações claras para este fenômeno, provavelmente, devido à grande quantidade de causas específicas relacionadas ao sistema (BRYERS, 1988).

O desprendimento pode estar relacionado com a ocorrência de atividade anaeróbia na região interna do biofilme aeróbio muito espesso.

* TRULEAR, M.G. Cellular reproduction and extracellular polymer formation in the development of biofilms. PhD dissertation. Montana State University, Bozeman, 1983.

† BRYERS, J.D. AND CHARACKLIS, W.G., Process governig primary biofilm formation. Biotechnol. Bioeng., 24, 2451, 1982.

Associado às limitações de transferência de oxigênio em tais casos, camadas profundas do biofilme se tornam anaeróbias produzindo ácidos voláteis, baixando o pH e talvez produzindo gases insolúveis, os quais enfraquecem a estrutura do biofilme. Entretanto, esta premissa não explica o desprendimento de biofilmes estritamente anaeróbios (BRYERS, 1988).

HARREMOËS* et al. apud BRYERS (1988) associaram o desprendimento de biofilmes com a formação de bolhas de nitrogênio. As bolhas provocavam o desprendimento localizado do biofilme. Esse comportamento poderia também ocorrer em sistemas anaeróbios produtores de metano e gás carbônico.

ARVIN & KRISTENSEM apud BRYERS (1988) verificaram que a precipitação de grandes quantidades de fosfato de cálcio, resultante do gradiente de pH dentro do biofilme, pode contribuir para a ocorrência do fenômeno do desprendimento.

2.4.3.5 - Fase de Estabilização do Biofilme - 5

A fase de estabilização se caracteriza por valores constantes e máximos de massa e espessura do biofilme, o que corresponde ao estabelecimento de um regime permanente da produção do biofilme. Neste nível, se estabelece um equilíbrio (breve e instável) entre a perda de biomassa associada a limitações físicas e ao crescimento de novas células na periferia do biofilme (BELKADIR et al., 1988).

2.4.3.6 - Fase de Desprendimento do Biofilme - 6

Essa fase foi marcada pela perda total do biofilme, associada à lise celular nas camadas profundas e a destruição das células responsáveis pela fixação (BELKADIR et al., 1988).

* HARREMOES, P. Biofim Kinetics. Water Pollution Microbiology, 2, 82, 1978

2.5 - GRÂNULOS E FLOCOS

É importante considerar que o fenômeno da granulação foi descoberto acidentalmente durante experimento realizado em um reator piloto, com capacidade para 6 m³, o qual foi semeado em 1974 com lodo digerido (de ZEEUW,1987). Após essa observação, descobriu-se que o reator era capaz de trabalhar com altas taxas de carregamento volumétrico, isto é, 30 KgDQO.m⁻³.d⁻¹, enquanto mantinha um desempenho estável.

A formação de grânulos anaeróbios em reatores UASB é importante para a operação do reator com altas taxas de remoção de DQO. Acredita-se que o fenômeno de sua formação é baseado substancialmente na agregação microbiana natural no sistema (WU et al.,1996).

Os grânulos e os flocos são agregados macroscópicos de bactérias, de certa forma desprovidos de um material suporte. No entanto, os grânulos apresentam estruturas bem definidas e em geral boas características de sedimentação, enquanto que os flocos não apresentam estrutura definida e permanecem, na maioria das vezes, em suspensão (DOLFING, 1987; HULSHOFF POL,1989).

A principal diferença entre grânulos e flocos está na facilidade com que estes últimos fragmentam-se quando submetidos à agitação de baixa intensidade, enquanto que os primeiros permanecem intactos, mesmo em casos de esforços hidráulicos com intensidade moderada (HULSHOFF POL,1989).

Em um estudo comparativo entre o filtro anaeróbio e o reator UASB na formação de grânulos, JHUNG & CHOI (1995) concluíram que a granulação ocorreu nos dois reatores, sendo que seu desenvolvimento foi mais influenciado pelo substrato do que pela forma do reator.

A maior parte dos estudos sobre o fenômeno da granulação refere-se a reatores UASB que, embora, possuam diferenças com relação aos filtros anaeróbios tiveram sua concepção baseadas nesses últimos. Desta forma, estes estudos podem servir como base para o entendimento desse comportamento nos filtros anaeróbios com fluxo ascendente (CAMPOS,1992). Os tópicos que seguem baseiam-se principalmente na literatura sobre reatores UASB.

Segundo HULSHOFF POL et al. (1983), o desenvolvimento de grânulos nos reatores UASB deve-se a seleção contínua das partículas de sólidos biológicos, causada pela velocidade ascendente do líquido e dos gases. No caso, os sólidos biológicos dispersos mais frágeis seriam "lavados" do reator, enquanto que, os compostos mais pesados e mais ativos tenderiam a se agregar, permanecendo, desta forma no reator.

2.5.1 - Fatores que Afetam o Processo da Granulação

Segundo HULSHOFF POL et al. (1983), os fatores que afetam o processo da granulação nos sistemas de tratamento anaeróbio dividem-se em três grupos, a saber: - fatores ambientais; - tipo de inóculo; - procedimentos tomados durante a partida do reator.

Dentre os fatores ambientais pode-se ressaltar: - disponibilidade dos nutrientes, essencial para que se obtenha as condições ótimas de crescimento; - temperatura, visto que a atividade específica do lodo metanogênico é máxima entre 35 e 40°C (para reatores mesófilicos); - pH, deve estar entre a faixa ótima de crescimento das bactérias metanogênicas (6,5 a 7,8); - o tipo de substrato.

Sobre o tipo de substrato pode-se ressaltar: - composição; - biodegradabilidade da matéria orgânica; - presença de matéria orgânica e inorgânica não biodegradável finamente dispersa; - composição iônica e a

presença de compostos inibitórios.

Dentre os procedimentos tomados durante a partida do reator pode-se destacar : - incremento da taxa de carregamento orgânico; - lavagem de sólidos biológicos suspensos; - quantidade de inóculo utilizada.

2.5.2 - Estrutura do Grânulo

DUBOURGUIER et al. (1985) fizeram análises estruturais de grânulos retirados do reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo. Por meio de técnicas de microscopia eletrônica, de varredura e de transmissão verificaram a existência de uma "trama" de bactérias do gênero *Methanothrix* sp aprisionando varias bactérias em forma de bacilos, aglomerados de *Methanosarcina* sp e fragmentos celulares.

DUBOURGUIER et al. (1987) afirmaram que os grânulos se formam pela agregação de microflocos principalmente por pontes formadas pelos filamentos das bactérias metanogênicas do gênero *Methanothrix* sp e pelo gênero *Methanosarcina* sp. Além disso, notaram que as bactérias ativas não estavam distribuídas de forma aleatória no interior do grânulos, mas em microcolônias completamente bem definidas, sendo que foi encontrado células com atividade bacteriana em varias posições até no centro do grânulo.

GUIOT et al. (1991), com base em observações realizadas sob microscopia eletrônica, e determinações da atividade metanogênica específica de lodos granulados íntegros e gradativamente dissecados, conseguiram aprofundar o conhecimento da estrutura dos "grupos" de microrganismos.

Na FIGURA 3 pode-se visualizar de forma simplificada a distribuição das populações bacterianas, conforme constatado por GUIOT et al. (1991) a

partir do modelo de McCARTY & SMITH (1986) desenvolvido para biofilmes alimentados com etanol e ácido propiônico.

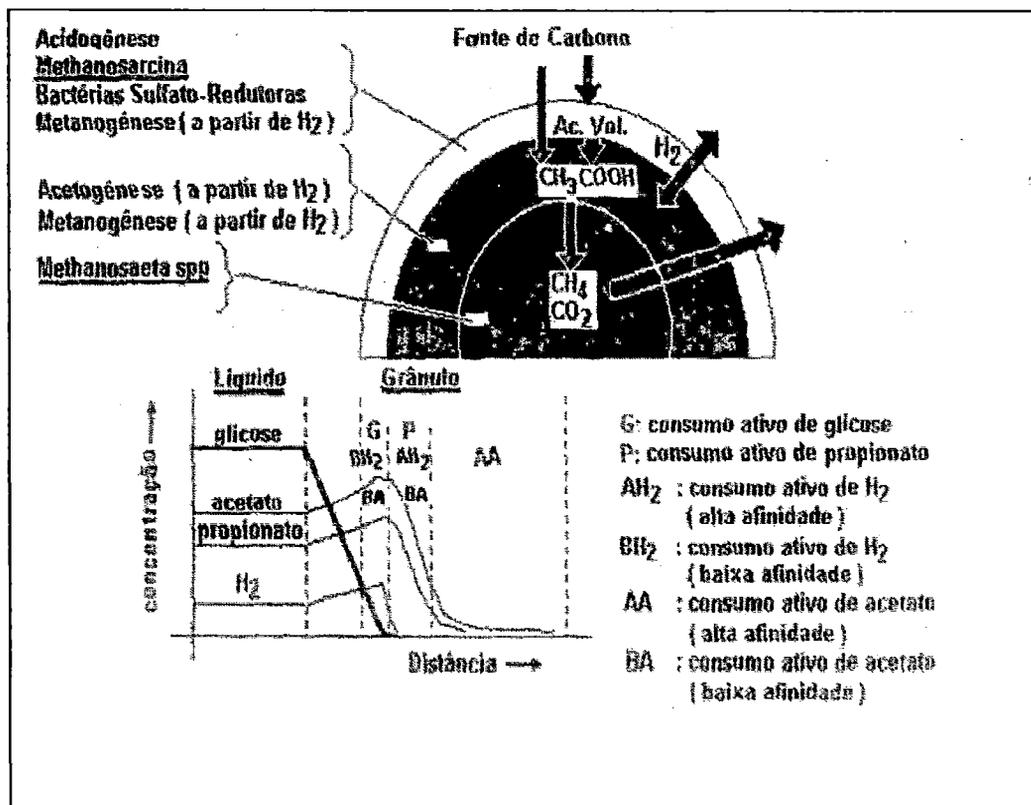


FIGURA 3 - Esquema proposto para estrutura do grânulo, com um arranjo populacional relacionado com o modelo de difusão do substrato e produtos, para grânulos alimentados com glicose. GUIOT et al. (1991).

Foi verificado que, em função dos resultados de GUIOT et al. (1991), propôs-se para os grânulo uma estrutura em três camadas:

- A primeira camada (mais externa), com espessura de aproximadamente 20µm, encontrou-se uma população mais heterogênea predominantemente constituída por bactérias acidogênicas hidrogenotróficas, redutoras do íon sulfato, metanogênicas utilizadoras de hidrogênio e o gênero metanogênico *Methanosarcina* sp.

- A segunda camada, foi constituída por bactérias acetogênicas e metanogênicas hidrogenotróficas.

•A terceira camada, situada no núcleo do grânulos seria constituída por espécies de *Methanothrix* (ou *Methanosaeta*) e microrganismo acidotróficos (consumidores de ácidos voláteis de cadeia curta). Uma vez que eles crescem com os metabólitos produzidos pelas fermentadores primários na camada superficial do grânulo e são eventualmente afetados pela limitação difusional do substrato num estágio posterior.

Segundo os autores GUIOT et al., (1991) o substrato que alimentou o reator se moveu do meio líquido para a superfície do grânulo por transporte de massa, e, então se difundiu dentro do grânulo, em que foi transformado em propionato, acetato e hidrogênio. Em resposta aos gradientes de hidrogênio, os ácidos propiônico acético foram transportados de volta para o meio líquido, e se difundiram em menor concentração para o centro do grânulo. Este fato selecionou zonas específicas em que, observou-se bactérias acidogênicas no meio líquido e na camada mais externa, bactérias consumidoras de hidrogênio na superfície e na camada intermediária, bactérias acetoclásticas de baixa afinidade, pelo substrato na periferia, e, de alta afinidade, na camada mais profunda, bactérias oxidantes de ácidos graxos voláteis (acetogênicas produtoras obrigatória de hidrogênio) na camada intermediária.

2.5.3 - Método de Avaliação do Crescimento de Biofilmes e do grânulos - Método do NMP

O método do número mais provável (NMP) pode ser utilizado para estimar a população total ou um grupo específico de microrganismos em uma amostra. O método emprega meios de cultura líquidos seletivos e um conjunto de diluições da amostra.

Segundo ATLAS & BARTHA (1981), o método do NMP é muitas vezes referido como o método das diluições. Neste método, geralmente, são utilizadas 3 réplicas, mas, pode se utilizar 5 e 10 réplicas. A leitura de cada

tubo é considerada positiva ou negativa, sem nenhuma tentativa de quantificar o número de microrganismos nas diluições positivas, as combinações de respostas positivas e negativas são comparadas a uma tabela padrão de NMP, em que se obtém o número mais provável de bactérias viáveis por volume ou peso. A vantagem do método é que não se destroem as possíveis interações microbianas em pequenos focos, é mais rápido e permite diferentes combinações para culturas específicas de diferentes origens.

A contagem de colônias de bactérias anaeróbias estritas utilizando o método do NMP pode ser realizado com a metodologia descrita por MILLER & WOLIN* apud GIAJ-LEVRA (1991).

BATTERSBY et al. (1985) aplicaram a metodologia do NMP para enumeração de bactérias redutoras do íon sulfato. Segundo POSTGATE apud BATTERSBY et al. (1985), as bactérias redutoras de sulfato são organismos anaeróbios estritos e requerem um potencial redox de ± 100 mV para o crescimento inicial. BATTERSBY et al. (1985) realizaram o teste do "roll-tube" concomitante ao teste do NMP para análise dos dados em conjunto. Concluíram que a enumeração bacteriana das bactérias redutoras do íon sulfato tanto aplicando o método do "roll-tube", quanto o método do NMP apresentaram o mesmo resultado, acrescido de um desvio padrão de Log NMP 0,25.

GROTEHUIS et al. (1991), estudando a composição bacteriológica e ultraestrutura do lodo granular metanogênico mesófilo de um reator UASB em escala real tratando efluente de indústria açucareira, notaram por meio da microscopia ótica e eletrônica e do método do NMP, que as espécies *Methanobrevibacter arboriphilicus* e *Methanothrix soehngenii* foram as mais

* MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology*, v.27, p.985-987.

abundantes hidrogenotróficas e acetoclásticas, respectivamente, no crescimento em lodos contendo propionato como fonte orgânica.

OBISPO & DEHORITY (1992) adaptaram o método do NMP para enumeração de fungos anaeróbios no rúmen, adicionando ao meio de cultivo os antibióticos penicilina e estreptomicina, a fim de medir a inibição do crescimento bacteriano. Para posterior análise, e comparação dos valores de contagem obtidos foi realizada também análise quantitativa pela técnica do "roll-tube". Os autores concluíram que o NMP foi um procedimento mais fácil e simples.

SANCHEZ et al. (1994) utilizaram o método do NMP em conjunto com as técnicas de microscopia de fluorescência para comparar diferentes colonizações microbianas (presença de bactérias hidrolíticas fermentativas, bactéria redutora de sulfato e bactéria metanogênicas acetotróficas e hidrogenotróficas) em diferentes materiais suportes. Concluíram que o aumento da produção de metano foi rápido nos biodigestores anaeróbios e ocorreu nas primeiras 24 horas após a incubação do lodo.

O presente trabalho empregou o método do Número Mais Provável (NMP) na quantificação das bactérias metanogênicas acetotróficas. Segundo DUBOURGUIER apud VAZOLLER (1995), o NMP é uma metodologia bastante simples para avaliar o número de bactérias anaeróbias, em que os frascos contendo meio de cultura líquido sob anaerobiose são facilmente inoculados utilizando pipetas ou seringas estéreis.

A técnica do NMP para as contagens de metanobactérias emprega os procedimentos para manipulação de anaeróbios estritos. As respostas positivas são aquelas em que através da análise cromatográfica, verifica-se a produção de metano, após um período de 30 dias de incubação. As

análises cromatográficas são acompanhadas por exames microscópicos das amostras de cada diluição sob microscopia de fluorescência (VAZOLLER, 1995).

O argumento estatístico utilizado para elaborar as tabelas de NMP é baseado no conjunto de resultados positivos e negativos, portanto, a amostra precisa ser diluída de forma adequada para que os resultados das contagens possam ser comparados àqueles das tabelas (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1985).

2.6 - HIDRODINÂMICA DO REATOR

As reações bioquímicas que ocorrem durante a digestão anaeróbia são processos complexos, com múltiplos parâmetros determinantes. Para se ter um sistema de tratamento eficiente, não apenas os próprios parâmetros precisam ser conhecidos, mas também deve ser considerada a relação entre os parâmetros e o projeto hidráulico dos filtros e reatores (PIRES, 1990).

Estudos visando a caracterização hidrodinâmica deve ser realizados para a obtenção de modelos matemáticos que descrevem adequadamente o regime de escoamento em reatores. Tais estudos permitem também a detecção de zonas mortas, caminhos preferenciais, recirculação interna e outras anomalias de escoamento, sendo realizado por meio do teste estímulo-resposta que consiste em obter informações sobre a distribuição do tempo de residência (DTR) no fluido do sistema.

2.6.1 - Escoamento Ideal

Segundo LEVENSPIEL (1974), existem dois tipos básicos de reatores bioquímicos, (1) os do tipo descontínuos ou de batelada, nos quais, os

reagentes são despejados num tanque e misturados, ali permanecendo durante um certo período, no qual ocorre as reações, sendo que a mistura resultante é então descartada; (2) e os reatores contínuos, onde os reagentes entram e saem continuamente. Os reatores contínuos são mais amplamente difundidos pôr serem viáveis economicamente, para a produção em larga escala.

Há dois tipos básicos de reatores contínuos ideais: - reator com fluxo pistonado (Plug Flow); - tanque agitado com mistura completa (CSTR). O reator tubular se caracteriza por apresentar um escoamento ordenado dos elementos fluidos, conseqüentemente neste tipo de reator, não haverá difusão ao longo do percurso e sem diferença de velocidade entre dois elementos quaisquer do fluido. Já, o reator tanque CSTR, é ideal quando há mistura completa, satisfazendo a uma função de tempo de residência de forma exponencial, assim sendo, a concentração de qualquer composto na saída é igual a sua concentração no interior do tanque (LEVENSPIEL, 1974).

2.6.2 - Escoamento Não - ideal

No caso de reatores reais o escoamento nunca segue os padrões de idealidade descritos anteriormente, porém, grande parte deles se aproxima dela. Os desvios do comportamento ideal podem ser causados pela formação de canais preferenciais, pelo reciclo de fluido no interior dos reatores ou pela presença de zonas mortas (SMITH, 1970 ; LEVENSPIEL, 1974).

De acordo com PIRES (1990), podemos definir esses desvios do comportamento ideal como:

Zona morta - é a região no interior do reator na qual a velocidade do fluido é tão baixa que, quando comparada com a velocidade em outros

pontos, o escoamento pode ser considerado "em repouso". Nestas regiões ocorre principalmente mistura molecular. As zonas mortas são responsáveis pelas "caudas" que aparecem nos experimentos com traçadores.

Canais preferenciais - podem aparecer em algumas regiões dos reatores onde uma porção do fluido escoam com velocidade maior do que o resto, tendo, portanto, menor tempo de detenção do que o avaliado teoricamente. A distribuição não uniforme do escoamento de entrada e a distribuição não homogênea do material suporte dos filtros são os principais problemas que podem resultar na formação de canais preferenciais.

Recirculação - é a existência de linhas de corrente que formam círculos, de tal forma que o fluido é mantido em circulação dentro do reator. O efeito da recirculação é similar ao efeito de zonas mortas, exceto que dentro das zonas de recirculação pode ocorrer boa mistura dos reagentes.

2.6.3 - Técnica de Estímulo - Resposta

Teoricamente, é possível quantificar os desvios do escoamento ideal pela medida da velocidade de elemento de fluido para obter um perfil de distribuição de velocidades. Na prática, torna-se muito difícil usar esta aproximação. O conhecimento da distribuição do tempo de residência (DTR) de elementos fluidos é utilizado para caracterizar o grau de não idealidade do escoamento.

De acordo com LEVENSPIEL (1974), a técnica usualmente utilizada para a obtenção das curvas experimentais de distribuição de tempo de residência (DTR) é a técnica de estímulo-resposta, que consiste, basicamente, em provocar uma perturbação na entrada do sistema, através da injeção de uma substância que não interfira no escoamento, e medir a resposta do sistema a este estímulo, ao longo do tempo. A injeção do

traçador pode ser feita de diversas formas; porém, as mais utilizadas são as entradas tipo função pulso e função degrau.

No caso da entrada em função pulso, DENBICH & TURNER* apud CABRAL (1996) definiram que uma quantidade conhecida de traçador é injetada na corrente afluenta durante um período de tempo bastante pequeno em comparação com o tempo de detenção médio. Esta técnica tem sido a mais usada pois, além de ser de fácil injeção, por utilizar volumes pequenos de traçador, é mais viável do ponto de vista econômico.

A injeção do traçador, a partir de uma entrada em degrau consiste, basicamente, em aplicar um determinado volume de traçador ao efluente durante um certo período de tempo superior ao tempo de detenção hidráulico do reator (DENBICH & TURNER apud CABRAL ,1996).

2.6.4 - Curvas de Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

Quando ocorre o escoamento de um fluido através de um reator a uma vazão constante, as partículas que compõe o escoamento têm diferentes tempos de residência caracterizado por uma função tempo de residência, definida por LEVENSPIEL (1972), como sendo a fração de entrada ou saída de escoamento que tem um tempo de detenção num intervalo entre t e $t + dt$. A importância prática deste fato, segundo BUFFHAM & MASON† apud CABRAL,(1996), é que o desempenho e eficiência do processo são afetados pela dispersão nas curvas de distribuição de tempo de residência (DTR).

* DENBICH, K. G.;TURNER,J.C.R. (1984). Chemical Reactor Theory. 3 Ed , ed Cambridge University Press. Cap 5, p 81-110

† BUFFHAM. B. A.: MASON, G. (1993).Hold-up and dispersion: tracer residence times, moments and inventory measurements. Chemical Engineering Science.48,(23): 3879-3887.

LEVENSPIEL (1974) definiu que a distribuição dos tempos de residência dos elementos de fluido para a corrente que deixa o recipiente é denominada Distribuição de Idade de Saída (E), ou distribuição de tempo de residência para o efluente, representada de tal forma que a área sob a curva seja igual a um, ou seja:

$$\int_0^{\infty} E dt = 1 \quad (2)$$

De acordo com a FIGURA 4, que mostra uma curva DTR normalizada (área unitária), a fração de efluente com tempo de residência t e $t + dt$ é igual a $E dt$, enquanto que a fração com tempo inferior a t_1 é

$$\int_0^{t_1} E dt \quad (3)$$

Portanto, a fração de líquido com tempo maior que t_1 (área tracejada) é:

$$\int_{t_1}^{\infty} E dt = 1 - \int_0^{t_1} E dt \quad (4)$$

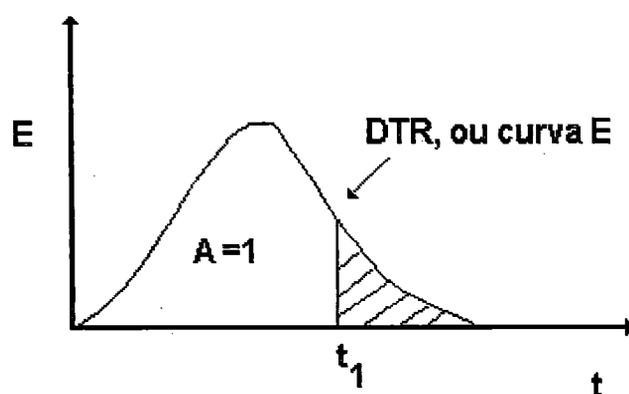


FIGURA 4 - Curva DTR normalizada. LEVENSPIEL (1974).

Quando a injeção de traçador é feita de acordo com uma função tipo degrau, o registro da concentração no efluente é denominada, de acordo com LEVENSPIEL (1974), de curva F mostrada na FIGURA 5.

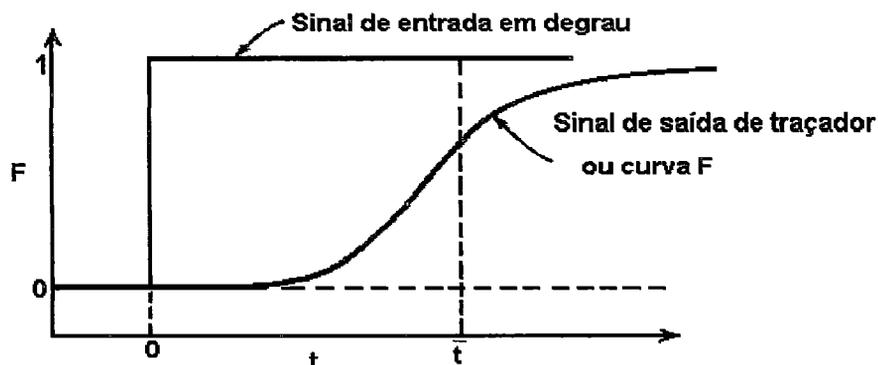


FIGURA 5- Curva F para entrada tipo função degrau. LEVENSPIEL (1974).

Ao se determinar a função de distribuição de tempo de residência a partir de um estímulo tipo pulso, obtém-se a curva C esquematizada na FIGURA 6 a seguir.

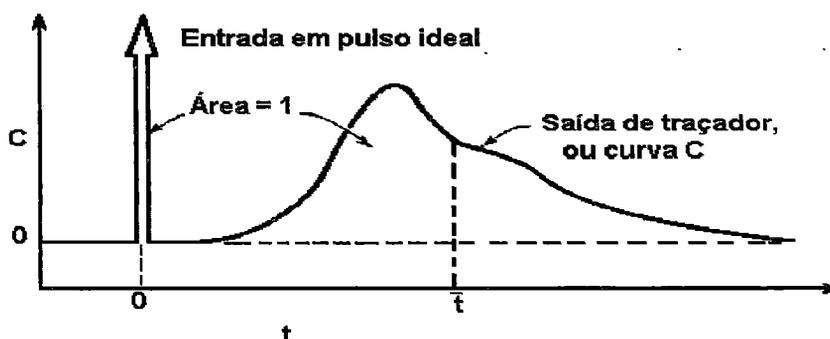


FIGURA 6- Curva C para entrada tipo função pulso. LEVENSPIEL, (1974).

Para o ajuste de modelos teóricos e análise das curvas respostas de DTR obtidas, utilizam-se em geral, as curvas normalizadas. No caso da curva C, mostrada na FIGURA 6, a normalização, de acordo com metodologia descrita por LEVENSPIEL (1974), é feita dividindo-se a concentração (C) pela área (A) sob a curva experimental de concentração versus tempo, como segue:

$$\int_0^{\infty} C_{(t)} dt = \int_0^{\infty} \frac{C}{A} dt = 1 \quad (5)$$

Em que:

$$A = \int_0^{\infty} C dt \quad (6)$$

Pode-se obter relações entre as curvas E, F e C para o caso de recipiente fechado, ou seja, aquele no qual a entrada e saída do fluido ocorre apenas por escoamento tubular (perfil de velocidade plano) não ocorrendo variações de velocidades, difusões ou turbilhões no fluxo de fluido. De acordo com LEVENSPIEL (1974), os reatores reais, em geral, satisfazem de forma razoável a esta suposição. Desta forma, tem-se as seguintes equações que relacionam E, F e C:

Quando se tem regime permanente de escoamento, o que implica que a DTR para o fluido que entra é a mesma para o que sai, uma vez que não ocorre acúmulo de material no recipiente, tem-se:

$$C = E \quad (7)$$

Quando se injeta um sinal de traçador em forma de degrau na entrada de um recipiente num tempo $t = 0$, para qualquer tempo $t > 0$ apenas o traçador efluente tem um tempo de detenção menor que t . Tem-se, então, que a fração de traçador na corrente efluente é igual a fração de efluente com tempo de detenção menor que t , representado pela seguinte equação demonstrada por LEVENSPIEL (1974).

$$F = \int_0^t E dt \quad (7.a)$$

ou ainda:

$$E = \frac{dF}{dt} \quad (7.b)$$

Estas relações mostram que a técnica experimental de estímulo-resposta, com entradas em degrau ou pulso, permitem a obtenção da curva de distribuição do tempo de residência (DTR) em reatores. A análise quantitativa destas curvas, informa sobre anomalias existentes nos reatores. Na FIGURA 7 tem-se os principais problemas que podem ocorrer em reatores cujo escoamento se aproxima do tubular.

A curva (a) da FIGURA 7 indica a resposta esperada se o sistema não apresentar nenhum problema de projeto. Já, na curva (b), pode-se observar um adiantamento no aparecimento do traçador, o que pode indicar canalização do fluido e regiões de estagnação. No caso de recirculação interna de fluido, FIGURA 7 (c), o fluxo de fluido pode estar movendo-se lentamente, ocorrendo mais freqüentemente em recipientes curtos e largos. O aparecimento atrasado do traçador, como mostra a FIGURA 7 (d), pode indicar que há um erro na medida da vazão, no volume real de escoamento do fluido (quando não se leva em conta a porosidade do material de recheio) ou que o traçador foi adsorvido e retido no reator. Na FIGURA 7 (e) o fluido aparece sendo canalizado por dois caminhos paralelos.

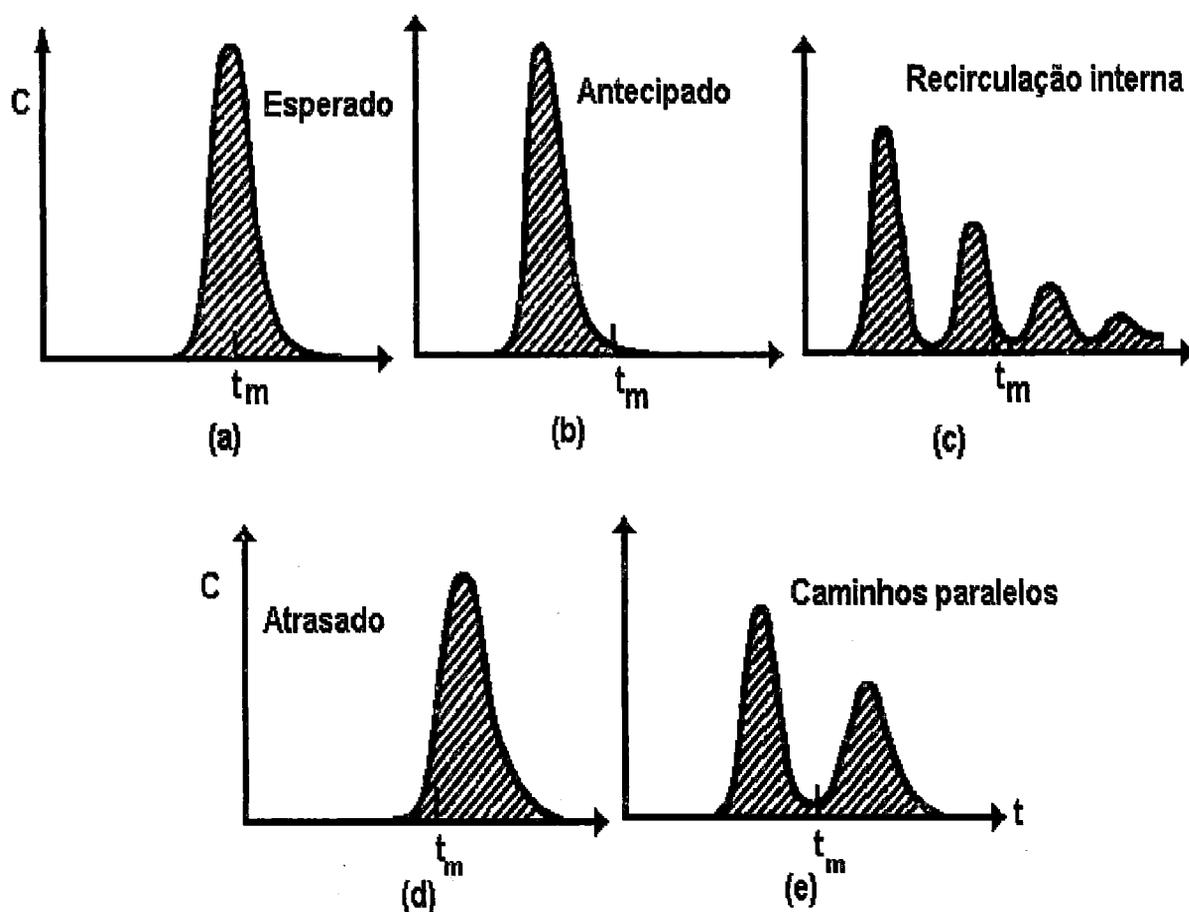


FIGURA 7- Anomalias que podem ocorrer no escoamento em reatores cujas características se aproximam do tubular. LEVENSPIEL, (1974).

REIMER et al.* apud CABRAL (1996) citaram que outro comportamento importante que pode ser observado nas curvas de DTR é a presença de prolongamentos em forma de caudas, fato este, segundo os autores, causado em grande parte pela difusão do traçador no recheio, que fica retido nos poros durante um período de tempo e sendo depois liberado, após a passagem do pico de concentração, na corrente de fluido. Os autores ressaltam, ainda, que este efeito é largamente observado quando se trabalha com reatores tipo leito fixo.

* REIMER, M.HOLM KRISTENSEN, G.; HARREMOES, P. (1980). Residence time distribution in submerged biofilters. *Water Research*, v.14, p.949-958.

3. - METODOLOGIA

3.1 - CONFIGURAÇÃO DO REATOR

No presente trabalho foi utilizado um reator vertical de filme fixo, cuja configuração foi baseada na descrição de KENNEDY & DROSTE (1986), mas com algumas modificações, devido a dificuldade de coletar o biofilme aderido ao material suporte, os grânulos e os flocos em diferentes alturas.

KENNEDY & DROSTE (1986) projetaram um reator de fluxo ascendente em forma de um tanque vertical de base quadrada com 19 cm de lado e 98 cm de altura (dimensões internas), com paredes de acrílico, contendo um volume líquido de 22,4 litros. O material suporte utilizado foi composto de cilindros ocos de fibras de poliéster, com base de 2,8 cm de diâmetro e com altura de 61 cm, e posicionado a 25 cm da base.

Durante a etapa experimental da presente dissertação foi utilizado um reator do tipo filtro anaeróbio de fluxo ascendente, constituído por um tubo de PVC, com diâmetro de 200 mm e altura de 1,20m, perfazendo um volume de 26,4 L. Utilizou-se como material suporte 18 módulos verticais, constituídos cada um com 5 niples de PVC de 20mm conectados entre si por tubos de PVC de 25mm de diâmetro e 10cm de altura, sendo estes perfurados perpendicularmente no sentido do escoamento. Cada módulo apresentava uma altura aproximadamente de 62 cm distribuídos uniformemente no interior do reator, sustentado por uma placa circular, conforme FIGURA 8. Esses módulos assim dispostos constituíram os elementos básicos de estratégia para a retirada do biofilme aderido aos niples, com o reator em funcionamento.

Nesta pesquisa utilizou-se o fluxo ascendente, pois, segundo van Den BERG & LENTZ (1979), o reator com fluxo descendente opera exclusivamente como reator de biofilmes, enquanto que, com o fluxo ascendente, grande parte da estabilização se deve aos sólidos biológicos em suspensão.

A retirada da amostra de grânulos era realizada retirando-se as amostras pelas saídas de coletas (lateralmente).

Para a retirada da amostra de biofilme aderido, era interrompido o fluxo de substrato no reator por alguns minutos, abria-se a parte superior do reator, e retirava-se um módulo de PVC. O módulo era então desmontado e retirado cuidadosamente as cinco niples contendo amostras de biofilme, nos seus lugares eram colocado cinco novos niples, o conjunto montado era recolocado em seu lugar, em seguida, o reator era fechado e sua operação era retomada.

Foi mantido um selo hídrico de aproximadamente 5 cm acima do material suporte com intuito de proteger o biofilme formado e garantir o processos anaeróbio em todo material suporte.

O gás produzido no reator era encaminhado para um frasco tipo Mariotte contendo uma solução de NaOH 6M e por deslocamento líquido era medido o volume do gás metano produzido, além disso a composição do gás era analisada por cromatografia gasosa.

Este reator foi instalado em uma cabine climatizada mantendo a temperatura constante de 30°C, no Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

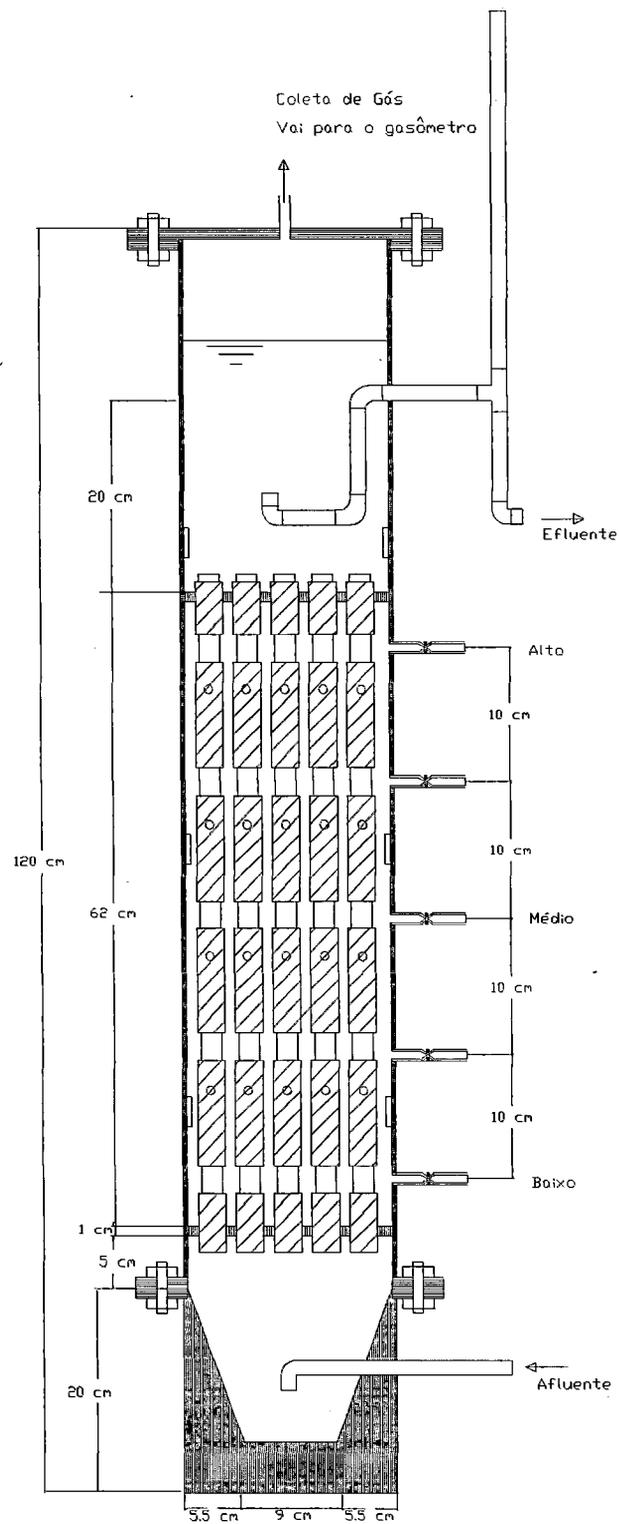


FIGURA 8. Esquema do Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente e de Leito Fixo.

3.2 - SUBSTRATO SINTÉTICO

O reator foi alimentado com um substrato sintético com composição similar ao esgoto sanitário, com o objetivo de se obter um meio de características estáveis durante o maior parte do tempo dessa pesquisa. O substrato sintético foi preparado de acordo com a composição e procedimentos descritos por TORRES (1992). A TABELA 1 apresenta a composição do substrato sintético.

TABELA 1 - Composição do Substrato Sintético

Fração Orgânica	Percentagem de DQO	Compostos Orgânicos
Proteínas	50%	Extrato de Carne
Carboidratos	40%	Sacarose 20%
		Amido Comercial 60%
		Celulose 20%
Lipídios	10%	Óleo de Soja

Fonte: TOUZEL & ALBGNAC; VAZOLLER apud TORRES, (1992).

Na realização do substrato sintético, primeiramente foi preparado uma solução "Mãe" de cada um dos componentes descritos na TABELA 1. Desta solução "Mãe" foram feitas medidas de DQO, afim de se saber qual a concentração da solução em mg/L, após, foi realizada uma seqüência de operações matemáticas com intuito de se determinar o volume da solução "Mãe" a ser utilizado, levando-se em consideração o volume final do substrato, as percentagens inerentes a seus respectivos componentes descritos na TABELA 1 e a DQO final necessária do substrato preparado.

A composição do substrato, além dos constituintes orgânicos incluiu também soluções de sais minerais e soluções de metais. Estas soluções eram preparadas segundo recomendações da literatura (TOUZEL & ALBGNAC; VAZOLLER apud TORRES, 1992). As TABELA 2 e TABELA 3

apresentam, respectivamente, as concentrações de sais minerais e de metais.

TABELA 2 - Concentrações das soluções de sais minerais do substrato sintético.

Sais Minerais	Concentração (g.L ⁻¹)
NaCl	72
MgCl ₂ . 6H ₂ O	12
CaCl ₂ . 2H ₂ O	9,6
CaCO ₃	36
NaHCO ₃	30

Fonte : ~~TOUZEL & ALBGNAC~~ VAZOLLER apud TORRES, (1992).

TABELA 3 - Concentração de metais do substrato sintético.

Metais	Concentração (g.L ⁻¹)
ÁC. NITRILOTRIACÉTICO (NTA)	12,800
FeCl ₃ . 6H ₂ O	1,350
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,100
CaCl ₂ . 6H ₂ O	0,024
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,100
ZnCl ₂ anidro	0,100
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	0,010
Molibdato de Sódio . H ₂ O	0,024
NaCl	1,000
Na ₂ SeO ₃ . 5H ₂ O	0,024
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,120

Fonte : TOUZEL & ALBGNAC ~~VAZOLLER~~ apud TORRES, (1992).

Para correção do pH e da alcalinidade do esgoto sintético foi utilizado o bicarbonato de sódio (NaHCO_3). O substrato concentrado era preparado semanalmente e armazenado sob refrigeração. Ao ser utilizado diariamente para alimentação do reator, o substrato era diluído em um volume final de 45 L.

Durante o desenvolvimento do experimento, foram utilizadas duas concentrações diferentes de substrato. Na primeira etapa, Etapa I, o substrato continha uma concentração, em termos de DQO, de 500 mg.L^{-1} , o que representava uma carga orgânica de $0,5 \text{ Kg de DQO. M}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A segunda etapa, Etapa II, o substrato foi acrescido proporcionalmente, de acordo com os dados da TABELA 1, até se conseguir uma concentração, em termos de DQO, de 800 mg.L^{-1} , o que representava uma carga orgânica de $0,8 \text{ Kg de DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

3.3 - ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

As análises de Potencial Hidrogeniônico (pH), Alcalinidade Total (ALC), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), foram realizadas tomando como base o Standart Methods of Water and Wastewater (1985). As determinações dos ácidos voláteis foram feitas de acordo com DI LALLO & ALBERTON (1961).

TABELA 4 - Periodicidade de amostragens

Análise	Frequência
pH	3 X semana
ALC ($\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$)	3 X semana
AV (mg.L^{-1})	3 X semana
DQO (mg.L^{-1})	Variável
SSV (mg.L^{-1})	1 X semana

3.4 - ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

3.4.1 - *Procedimentos para análise microbiológicas e materiais utilizados*

Para se realizar as contagens de bactérias metanogênicas acetotróficas é necessário que estas sejam realizadas sob condições de anaerobiose estrita, como já mencionado anteriormente. Assim, os procedimentos experimentais, foram baseados na literatura disponível sobre a manipulação de anaeróbios estritos, utilizando gases tais como nitrogênio, dióxido de carbono e hidrogênio. Esses gases também foram utilizados na atmosfera interna dos frascos contendo meios de cultivos e soluções (HUNGATE; BRYANT; MILLER & WOLIN; BALCH et al.; DUBOURGUIER apud VAZOLLER, 1995).

Foram utilizados frascos de antibiótico de 30 mL e seu fechamento foi feito com batoque de borracha de butila e lacre de alumínio. A manipulação de soluções e de inóculos foi realizada com auxílio de seringas de insulina estéreis, como indicado em HUNGATE; BRYANT; MILLER & WOLIN; BALCH et al.; DUBOURGUIER apud VAZOLLER, (1995) .

3.4.1.1 - Inóculo

Para se tentar avaliar o crescimento das bactérias metanogênicas acetotróficas foram realizados um total de 6 inoculações, sendo estudados dois tipos de inóculos, a saber: - biofilme aderido ao meio suporte; - grânulos e flocos em suspensão.

3.4.1.1.1 - O biofilme aderido ao meio suporte.

A amostra bruta do biofilme foi retirado a partir de um "anel" do material suporte (PVC), sempre de uma mesma altura (o segundo anel de baixo para cima) e um módulo que não tinha sido retirado ainda. Esta



amostra era colocada em um frasco contendo 10 mL de solução de diluição reduzida, trocando-se a atmosfera do frasco para N_2/CO_2 , durante 3 minutos. Em seguida, o frasco era lacrado e agitado durante 20 min para proporcionar o desprendimento do material aderido ao biofilme. Não foram utilizadas pérolas de vidro, para facilitar a homogeneização, pois no frasco era colocado o anel contendo o biofilme e julgou-se desnecessário sua utilização sendo que o anel se encarregava da homogeneização.

3.4.1.1.2 - Os grânulos e flocos em suspensão

Foram retirados 10 ml de lodo, sempre de uma mesma altura, os quais foram adicionados em um frasco xarope contendo 10 g de pérolas de vidro. Posteriormente, a atmosfera do frasco foi trocada para N_2/CO_2 durante 3 min. Por fim, o frasco então lacrado, era agitado durante 20 min.

3.4.1.2 - Procedimento para as inoculações

Os procedimentos utilizados para as inoculações foram de acordo com a metodologia adotada pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, descritos a seguir.

Antes das inoculações era realizada a troca de atmosfera nos frascos contendo meio Zinder*, para isso se fez necessário a utilização do sistema de distribuição simultânea de gases.

O sistema de distribuição simultânea de gases utilizado consiste de : um forno, com finalidade de remover o oxigênio que esteja presente na linha de gás; uma bomba de vácuo, utilizada no momento de troca de atmosfera dos frascos; quatro saídas simultâneas ligadas a linha e com controle de fluxo de gás por meio de registros de agulha; quatro mangueiras de silicone

* A composição e os procedimentos para a preparação das soluções estoques e do meio Zinder estão descritos no item 4.4.1.3

conectadas as quatro saídas de gás, quatro filtros "Sterile Acrodisc" instalados na outra extremidade da mangueira de silicone; agulhas hipodérmicas ligadas a extremidade dos filtros "Sterile Acrodisc" Como pode ser observado na FIGURA 9.

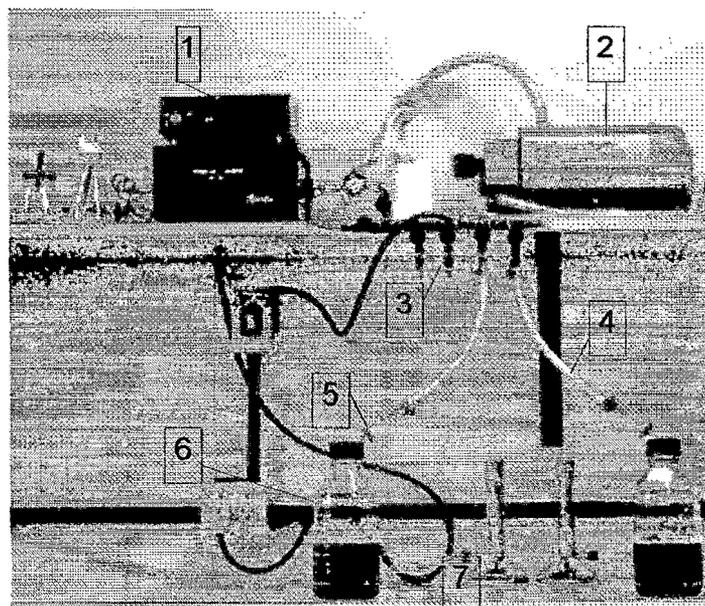


FIGURA 9 - Foto do Sistema de distribuição de gases. 1 - forno, 2 - bomba de vácuo, 3 - sistema de distribuição, 4 - mangueiras de silicone, 5 - filtro "Sterile Acrodisc", 6 - frascos, 7 - bico de Bunsen .

Para realizar a troca de atmosfera, os frascos eram conectados ao sistema de distribuição de gases sob condições de assepsia por meio de agulhas hipodérmicas estéril, primeiramente era introduzido a mistura gasosa N_2/CO_2 (70:30%) nos frascos por um período de 30 segundos e por meio de um jogo de registros retirava-se os gases por meio de uma bomba de vácuo, este procedimento era realizado 3 vezes e com uma duração de 30 segundos cada manobra, em seguida era promovido a despressurização dos frascos com uma agulha hipodérmica estéril.

Depois deste procedimento, os frascos contendo meio Zinder (8,55 mL) eram acrescidos das soluções estoques com auxílio de seringa de insulina estéril e "lavada com gás N_2 ", para não haver contaminação do oxigênio das atmosferas do frascos. As soluções acrescidas eram:

bicarbonato de sódio (0,1mL), vitaminas (0,1mL), acetato de sódio (0,2mL) e redutora (0,05mL) nesta ordem, perfazendo um volume total de 9 mL. É importante ressaltar que a fonte orgânica, no caso, o acetato de sódio ficou com uma concentração inicial no meio de 20 mM. Os frascos de água de diluição que continham um volume inicial de 8,8 mL eram acrescidos com de 0,2 mL de solução redutora, na hora de sua utilização, perfazendo um volume total de 9 mL.

As inoculações foram realizadas seguindo a ordem apresentada na FIGURA 10, sendo que eram utilizadas seringas estéreis para cada diluição, com calibre de 25 x 7,0 mm para que não ocorresse a seleção dos microrganismos pela espessura da agulha. Após as inoculações os frascos já devidamente etiquetados, foram mantidos em incubadoras marca FANEN, modelo 347CD, a temperatura controlada em torno de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

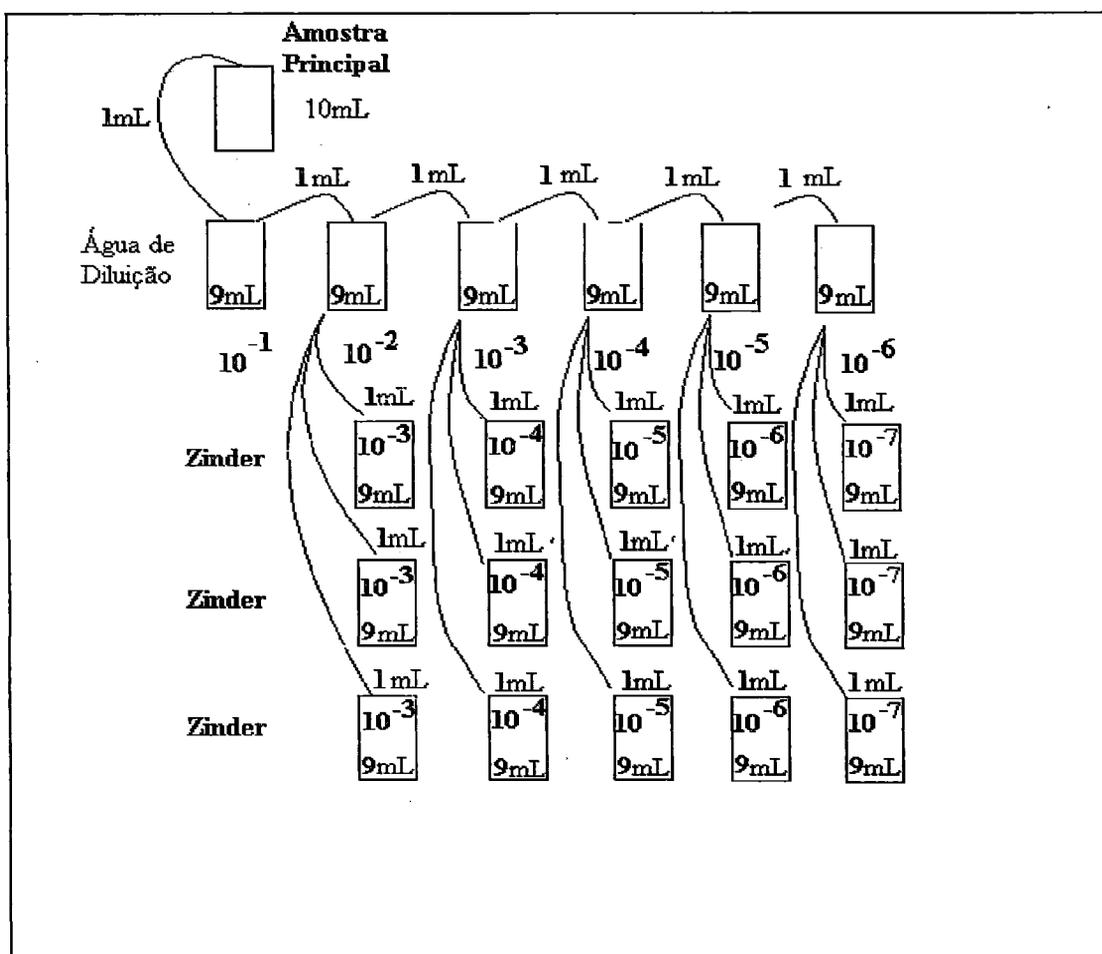


FIGURA 10 - Esquema das Diluições.

3.4.1.2.1 - Leitura de Metano

As leituras do gás metano foram realizadas através de cromatografia gasosa, com 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação. Para análise dos gases produzidos pela atividade bacteriana foi utilizado:

- Cromatógrafo Gow Mac com detector de Condutividade Térmica (série150)
- Integrador Processador CG - 300
- Colunas Poropack T , comprimento de 2,00 m e diâmetro interno de 1/4"
- Colunas Poropack Q , comprimento de 2,00 m e diâmetro interno de 1/4"
- Gás de arraste : Nitrogênio super seco (White Martins)
- Seringa: "gas-tight" (Hamilton) com trava de pressão na extremidade.
- Vazão do gás de arraste: 30 ml/min
- Temperatura: detector: 75°C , colunas: 75°C , injetor:75°C
- Corrente: 150mA
- Volume de injeção: 0,5 ml

3.4.1.2.2 - Acompanhamento Microscópico do teste do NMP

Após o término do teste de NMP, 60 dias após a inoculação e depois de ter sido realizado a leitura do gás, foi feito um acompanhamento microscópico, para se tentar identificar a morfologia dos microrganismos presentes nas diluições. Para isso foram coletados 2 mL do lodo formado e colocado em uma microcentrífuga para ocorrer a concentração desse lodo. A amostra era espalhada na lâmina e examinada ao microscópio. Isto foi feito com cada diluição, e em todas as contagens.

As amostras foram examinadas por microscopia ótica comum, de contraste de fase e fluorescência realizadas no microscópio Olympus BH - 2, pertencente ao Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

3.4.1.3 - Composição e procedimento para a preparação soluções estoques.

3.4.1.3.1 - Meio de Cultura basal Zinder

TABELA 5 - Composição e Procedimento para a preparação do meio de cultura basal Zinder

Meio de cultura Basal Zinder	
Reagentes	Quantidades
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05g
solução de resazurina 0,1%	1,0 mL
solução traço de metais	10,0 mL
Água destilada ou padrão Milli-Q	1.000 mL

Fonte: ZINDER et al. (1984).

→ Vidraria

Béquer de 25 mL
 Bastão de Vidro
 Erlenmeyer 2.000 mL
 Proveta 1.000 mL
 Pipetas 1 e 10 mL
 Frasco de Antibiótico 30 mL

→ Procedimento para a preparação

Ferver água destilada no Erlenmeyer de 2.000mL
 Medir 1.000 mL de água pré-aquecida na proveta, quando a temperatura for igual a $\pm 40^{\circ}\text{C}$;
 Despejar a metade do volume no Erlenmeyer;
 Adicionar os reagentes e as soluções na ordem apresentada e homogeneizar;
 Despejar o restante da água e homogeneizar novamente;
 Introduzir fluxo de nitrogênio (100%) no meio por 30 min, por borbulhamento;
 Distribuir o meio nos frascos de antibiótico sob fluxo de gás;
 Esterilizar por autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 min;
 Após autoclavagem, armazenar na ausência de luz e a temperatura ambiente

3.4.1.3.2 - Solução Traço de Metais

TABELA 6 - Composição e procedimento para a preparação da solução Traço de Metais

Solução Traço de Metais	
Reagentes	Quantidades
NTA	4,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,556g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,086g
CaCL ₂ .6H ₂ O	0,17g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21g
H ₃ BO ₃	0,19g
NiCl ₂	0,02g
Na ₂ MoO ₄	0,01g
água destilada	1.000 mL
Fonte: ZINDER & KOCK (1984).	

→ Vidraria

Béquer de 25 mL 50 mL
 Bastão de Vidro
 Erlenmeyer 2.000 mL
 Proveta 1.000 mL
 Pipetas 1 e 10 mL
 Frasco de Antibiótico 30 mL

→ Procedimento para a preparação

Medir 1000 mL de água destilada
 Adicionar o NTA em 200 mL de água destilada;
 Acertar o pH desta solução para 6,5 com KOH 10N;
 Verter esta solução em 600 mL de água destilada;
 Dissolver os outros sais na ordem apresentada;
 Adicionar o resto da água destilada para completar 1.000 mL
 Homogeneizar a solução;
 Introduzir fluxo de nitrogênio (100%) na solução por 20 min, por borbulhamento
 Distribuir no frascos sob fluxo do mesmo gás;
 Esterilizar por autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 min;
 Armazenar sob refrigeração e ausência de luz.

3.4.1.3.3 - Solução de Bicarbonato de Sódio a 10%

TABELA 7- Composição e procedimento para a preparação das soluções de bicarbonato de sódio a 10 %

Solução de Bicarbonato de Sódio 10%	
Reagentes	Quantidades
Bicarbonato de sódio	10 g
Água destilada ou padrão Milli-Q	100 mL

Fonte: VAZOLLER (1995).

→ Vidraria

Bastão de Vidro
Erlenmeyer 200 mL
Proveta 100 mL
Pipetas 1 e 10 mL
Frasco de Antibiótico 30 mL

→ Procedimento para a preparação

Ferver a água destilada;
Borbulhar nitrogênio na água até a temperatura baixar a $\pm 45^{\circ}\text{C}$;
Dissolver o bicarbonato de sódio na água quente;
Acertar o volume para 100 mL;
Esterilizar por filtração utilizando o sistema Millipore e membrana de $0,22\mu\text{m}$;
Distribuir 10 mL de solução nos frascos sob fluxo de nitrogênio (100%) em condições de assepsia;
Fechar e lacrar os frascos de antibiótico sob mesmo fluxo;
Envolver os frascos com papel de alumínio;
Armazenar na ausência de luz a temperatura ambiente.

3.4.1.3.4 - Solução de Vitaminas

TABELA 8 - Composição e procedimento para a preparação da solução de Vitaminas

Solução de Vitaminas	
Reagentes	Quantidades
biotina	0,002g
ác. fólico	0,002g
tiamina.HCl	0,005g
riboflavina	0,005g
ác. nicotínico	0,005g
pantotenato de cálcio	0,005g
piridoxina.HCl	0,010g
vitamina B ₁₂	0,0001g
ác. lipóico	0,005g
Água destilada	1.000 mL

Fonte: VAZOLLER (1995).

→ Vidraria

Bastão de Vidro
 Erlenmeyer 200 mL
 Proveta 100 mL
 Pipetas 1 e 10 mL
 Frasco de Antibiótico 30 mL

→ Procedimento para a preparação

Ferver a água destilada;
 Borbulhar nitrogênio na água até a temperatura baixar a $\pm 30^{\circ}\text{C}$;
 Dissolver os componentes em ordem;
 Acertar o volume para 1.000 mL;
 Esterilizar por filtração utilizando o sistema Millipore e membrana de $0,22\mu\text{m}$;
 Distribuir 10 mL de solução nos frascos previamente esterilizados sob fluxo de nitrogênio (100%) em condições de assepsia;
 Fechar e lacrar os frascos de antibiótico sob mesmo fluxo;
 Armazenar sob refrigeração.

3.4.1.3.5 - Solução de Acetato de sódio

TABELA 9 - Composição e procedimento para a preparação da solução de Acetato de sódio

Solução de Acetato de Sódio	
Reagentes	Quantidades
Acetato de Sódio	27,216g
Água destilada	100 mL

Fonte: VAZOLLER (1995).

→ Vidrarias

Béquer de 25 mL
Bastão de Vidro
Erlenmeyer 2.000 mL
Proveta 1.000 mL
Pipetas 1 e 10 mL
Frasco de Antibiótico 30 mL

→ Procedimento para a preparação

Medir 100 mL de água na proveta;
Dissolver o acetato de sódio com auxílio do bastão de vidro, no béquer;
Despejar a solução no Erlenmeyer;
Introduzir na solução fluxo de nitrogênio (100%) por 10 min, por borbulhamento
Distribuir nos frascos de antibióticos sob fluxo do mesmo gás;
Esterilizar por autoclavação á 120 °C e 1 atm por 20 min.
Armazenar na ausência de luz a temperatura ambiente.

3.4.1.3.6 - Solução Redutora de Sulfeto de sódio 5%

TABELA 10 - Composição e procedimento para a preparação da solução de Sulfeto de sódio 5%.

Solução de Sulfeto de sódio 5%	
Reagentes	Quantidades
Na ₂ S.9H ₂ O	5 g
Água destilada	100 mL

Fonte: VAZOLLER,(1995).

→ Vidrarias

Béquer de 50 mL
Bastão de Vidro
Erlenmeyer 200 mL
Proveta 100 mL
Pipetas 1 e 10 mL
Frasco de Antibiótico 30 mL

→ Procedimento para a preparação

Ferver a água destilada;
Borbulhar nitrogênio na água até a temperatura abaixar a $\pm 40^{\circ}\text{C}$;
Dissolver o sulfeto de sódio e acertar o volume para 100 mL;
Introduzir fluxo de nitrogênio (100%) por 10 min, por borbulhamento;
Esterilizar sob condições de assepsia por filtração, utilizando sistema Millipore e membrana de 0,22 μm ;
Distribuir 10 mL de solução nos frascos sob fluxo de nitrogênio (100%) ;
Fechar e lacrar os frascos
Envolver os frascos com papel alumínio;
Armazenar na ausência de luz a temperatura ambiente.

3.4.1.3.7 - Solução de Água de Diluição

TABELA 11 - Composição e procedimento para a preparação da solução de Água de Diluição.

Solução de Água de Diluição	
Reagentes	Quantidades
KHCO ₃	3,98 g
Tris (Hidroximetil aminometano)	6,6 g
Reazurina	2 mL
Água destilada	1.000mL

Fonte: GIAJ-LEVRA (1991).

→ Vidrarias

Béquer de 50 mL
 Bastão de Vidro
 Erlenmeyer 2.000 mL
 Proveta 1.000 mL
 Pipetas 1 e 10 mL
 Frasco de Antibiótico 30 mL

→ Procedimento para a preparação

Ferver a água destilada;
 Borbulhar N₂/CO₂ (70:30) na água até a temperatura abaixar a ±40°C;
 Adicionar a solução de resazurina, KHCO₃, Tris na água;
 Acertar o pH para 7,0 com KOH ou HCl;
 Introduzir fluxo de N₂/CO₂ (70:30) na solução por 30 min
 Distribuir alíquota de 8,8 mL nos frascos sob fluxo de gás;
 Esterilizar por autoclavação á 120°C, 1 atm por 20 min;
 Armazenar na ausência de luz e temperatura ambiente.

3.4.2 - Monitoramento microbiológico do reator

O monitoramento microbiológico do reator foi realizado utilizando a microscopia comum, de contraste de fase, e as técnicas de epifluorescência, com intuito de se verificar as morfologias predominantes nas amostras de grânulos, biofilmes e material em suspensão. Nesses exames as amostras eram coletadas diretamente do reator colocadas diretamente nas lamínas e foi visualizado várias vezes, sendo utilizado os equipamentos descritos no item 4.4.1.2.2.

O reator foi acompanhado também em duas ocasiões na etapa I e na etapa II pela microscopia de varredura eletrônica, em que pode ser observado as amostras de grânulos, biofilmes e material em suspensão. Para esses exames, as amostras foram preparadas de acordo com os procedimentos e recomendações de ARAÚJO, (1996).

Os exames dessas amostras foram realizadas utilizando o microscópio ZEISS DSM - 960 em 10 à 20 Kev e fotografadas com um vídeo processador de cópias Mitsubishi, com chapa fotográfica CK100-S, pertencente ao Instituto de Física de São Carlos - USP.

3.4.3 - Crescimento do biofilme aderido ao material suporte

Para realização deste ensaio foi utilizado o seguinte procedimento: Primeiro foram preparados 3 béqueres com 50 ml de água destilada cada, etiquetando-os e pesando-os em balança analítica ($P_{inicial}$). Em seguida, coletaram-se 3 anéis em 3 alturas diferentes (baixo, médio, alto), colocando-os nos respectivos béqueres, e pesando-os novamente (P_{Final}). Cada anel (P_{aneis}) já havia sido pesado anteriormente a partida do reator, portanto, o crescimento do biofilme aderido ao material suporte foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Crescimento do biofilme} = (P_{Final}) - \{ (P_{inicial}) + (P_{aneis}) \} \quad (8)$$

3.5 - TESTE HIDRODINÂMICO DO REATOR

Este teste antecedeu o início da partida no reator. Para o desenvolvimento do mesmo o reator foi alimentado com água de torneira, utilizando-se uma bomba dosadora eletromagnética, mantendo-se um tempo de detenção hidráulico de 24 h e temperatura constante de 30°C.

A caracterização hidrodinâmica do reator foi realizada injetando-se, em forma de pulso, o traçador, no caso a Rodamina WT, na entrada do reator. As amostras do efluente foram coletadas em intervalos de tempo constantes de 30 min e suas medidas de concentrações foram feitas através de análise fluorométrica, utilizando-se um fluorímetro de marca TUNER modelo 111.

As curvas experimentais obtidas foram normalizadas de acordo com metodologia descrita por LEVENSPIEL (1974), e foram ajustados modelos teóricos de N-CSTR em série e pequena dispersão segundo as equações (9) e (10), respectivamente:

$$E_{\theta} = \frac{N(N\theta)^{N-1}}{(N-1)!} \cdot \exp(-N\theta) \quad (9)$$

$$E_{\theta} = \frac{1}{2\sqrt{\pi(D/UL)}} \exp\left[-\frac{(1-\theta)^2}{4(D/UL)}\right] \quad (10)$$

Nestas expressões E_{θ} é a distribuição adimensional de idade de saída, N é o número de reatores tipo mistura completa em série, (D/UL) é o número de dispersão para o modelo de dispersão de pequena intensidade e θ é o tempo adimensional (t/TDH).

Para avaliar o efeito da retenção do traçador no reator devido as interações traçador/superfície do material (PVC) foi aplicada a metodologia proposta por CABRAL (1995). Esta metodologia consiste na modificação da curva DTR, eliminando a interferência de tal efeito na curva resposta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, apresentar-se-á e discutir-se-á inicialmente os resultados do teste hidrodinâmico do reator, pois o mesmo foi o primeiro a ser realizado. Em seguida, as análises referentes ao acompanhamento da operação do reator, e por fim, os resultados relacionados com os aspectos microbiológicos.

4.1 - TESTE HIDRODINÂMICO DO REATOR

Os resultados de concentração de Rodamina WT em função do tempo, obtidos em ensaios estímulo resposta são apresentados na FIGURA 11.

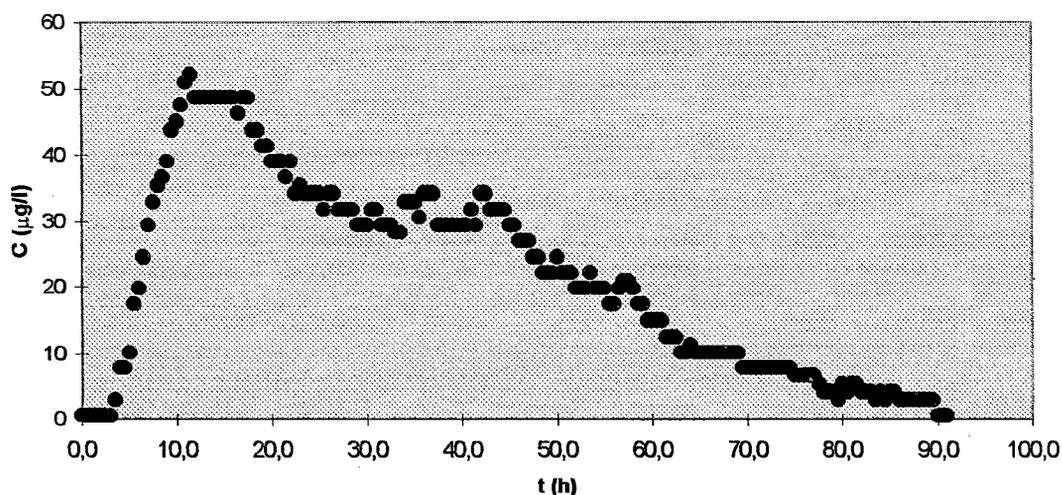


FIGURA 11 - Curva estímulo resposta obtida por injeção tipo pulso de Rodamina WT em filtro anaeróbio de fluxo ascendente, com TDH teórico = 24 horas.

Pode ser observada uma "cauda" acentuada na curva resposta experimental. Esta "cauda" pode representar uma difusão do traçador em zonas mortas dentro do reator ou uma retenção devido a interações Rodamina WT / PVC. Além do pico principal alcançado aproximadamente em 12 horas de experimento pode-se observar um segundo pico após 35 horas de experimento. A ocorrência de dois picos na curva resposta pode representar a existência de recirculação interna no reator (LEVENSPIEL, 1974). De fato, os furos perpendiculares ao escoamento existentes no material suporte podem gerar tal recirculação.

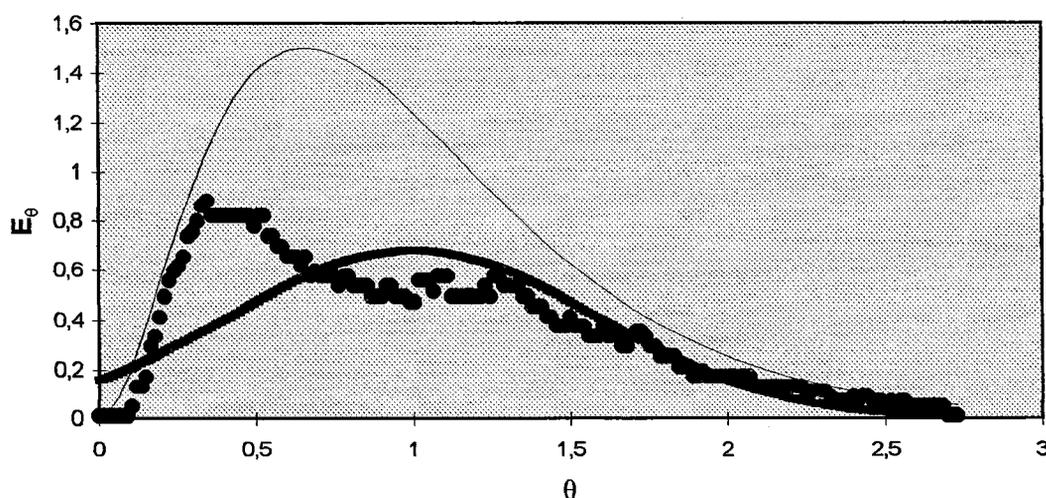


FIGURA 12 - Curva DTDH normalizada com modelos teóricos ajustados. Modelo de N-CSTR em série (—) e modelo de pequena dispersão (---).

Modelos teóricos de N-CSTR em série e de pequena dispersão foram ajustados aos dados experimentais. Obteve-se um valor de 3 para N e 0,17 para o coeficiente de dispersão (D/UL). Os valores dos parâmetros obtidos permitem representar o reator como aproximadamente 3 reatores de mistura completa em série. Este valor de N e o elevado valor do coeficiente de dispersão (0,17) indicam uma grande dispersão longitudinal e elevado grau de mistura. A FIGURA 12 apresenta a curva da distribuição de tempo de detenção hidráulico (DTDH) normalizada e os modelos teóricos ajustados.

Os ajustes dos modelos teóricos à curva experimental mostraram-se inadequados. Talvez modelos com apenas um parâmetro como os aqui considerados, não sejam adequados para representação do regime de escoamento neste reator.

O tempo de detenção hidráulico real obtido através da curva resposta foi de 33 horas. Portanto, um atraso na resposta de 9 horas foi observado uma vez que o TDH esperado era de 24 horas. O atraso na resposta pôde indicar a existência de zonas mortas hidrodinâmicas no interior do reator. O traçador teria difundido nestas zonas e liberado aos poucos provocando atraso na resposta, e gerando uma enorme "cauda" como observado. Entretanto, o atraso observado e a enorme "cauda" podem ter ocorrido devido a interação traçador/recheio. Para eliminar esta possível interferência, modificou-se a curva DTDH experimentalmente obtida utilizando-se metodologia proposta por CABRAL (1995).

Inicialmente, ajustou-se uma expressão tipo decaimento exponencial à "cauda" da curva resposta normalizada, como segue:

$$E_{\theta} = 1,04 \cdot \exp\left(\frac{-(\theta - 0,17)}{0,96}\right) \quad (11)$$

Segundo o método aplicado, a área sob a "cauda" na curva normalizada representa a fração de traçador que ficou retida em zonas mortas hidrodinâmicas ou na superfície do material suporte devido à interação Rodamina Wt / PVC (F_t). A fração de traçador retido na superfície do PVC (F) foi estimada como sendo 10% através do cálculo da área disponível para interação e considerando-se uma espessura de material aderido de aproximadamente 1 mm. Portanto, a fração de zonas mortas no reator (F_{ZM}) pôde ser estimada como:

$$F_{ZM} = F_t - F \quad (12)$$

Posteriormente, uma nova “cauda” foi construída modificando-se a expressão (11) a fim de se obter uma área sob a “cauda”, correspondente ao valor estimado pela expressão (12). Finalmente, incorporando a nova “cauda” à curva normalizada, pôde-se obter uma nova curva de concentração em função do tempo como apresentado na FIGURA 13.

Utilizando-se este método, chegou-se a um valor de F_{ZM} de aproximadamente 0,78 indicando que 78% do volume do reator poderia estar ocupado por regiões com tendência a provocar estagnação de líquido. Os cantos na forma de degraus existentes no material de recheio podem explicar esta grande ocorrência de zonas mortas. Entretanto, quando o reator estiver operando para tratamento de águas residuárias, espera-se que essas regiões estejam tomadas por biofilmes bacterianos. Portanto, estas zonas se converteriam em zonas biológicas ativas e o problema com zonas mortas hidrodinâmicas seria minimizado.

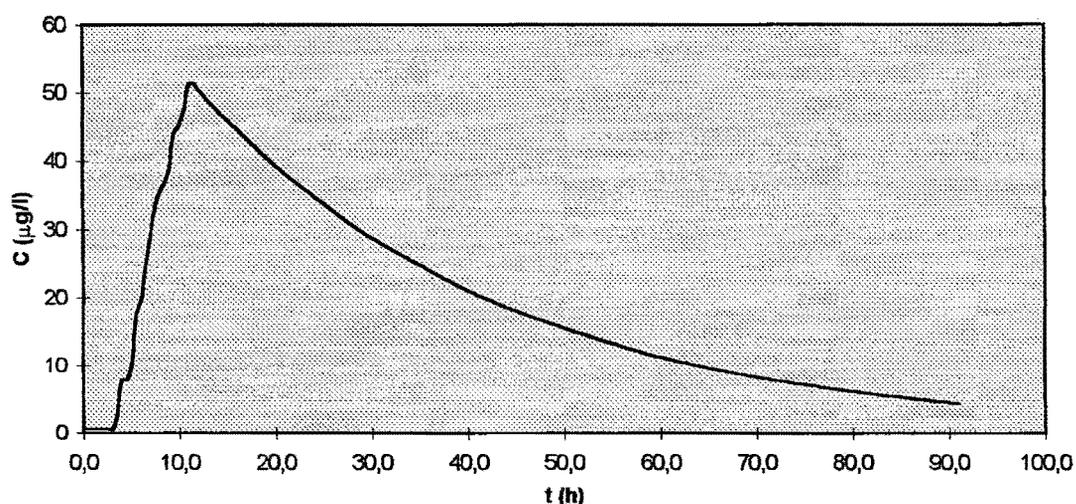


FIGURA 13 - Curva resposta modificada para desprezar a interferência causada pela interação Rodamina WT/PVC

A análise da curva modificada permitiu verificar que o TDH real, os parâmetros N do modelo de N -CSTR em série e o parâmetro (D/UL) do modelo de pequena dispersão não foram modificados significativamente

quando comparados com os obtidos pela análise da curva original. Portanto, pode-se concluir que a interação traçador/suporte não causou interferência significativa na curva resposta experimental.

CHIANG & DAGUE (1992), operando um filtro anaeróbio de fluxo ascendente de 85 L com material suporte em plástico não especificado, concluíram que o comportamento hidráulico dos filtros anaeróbio é do tipo mistura completa.

YOUNG & YOUNG (1988), verificando o comportamento hidráulico de um filtro anaeróbio com fluxo ascendente e material suporte feito de blocos modulares de PVC em escala real, concluíram que seu comportamento hidráulico está mais próximo do tipo mistura completa que do tipo pistonado.

4.2 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO REATOR

No ato da partida, o reator foi inoculado com um volume de 2,6 L de lodo, proveniente de um reator UASB que tratava os efluentes da Cervejaria Antarctica LTDA. de Ribeirão Preto, SP o que corresponde a 10% de sua capacidade. O inóculo se encontrava há cerca de cinquenta dias sem alimentação e era mantido em um recipiente escuro, fechado, a temperatura ambiente e na sombra.

Mas mesmo nesta forma inadequada de acondicionamento, o lodo apresentava-se granuloso e suas condições microbiológicas (análises realizadas com auxílio da microscopia ótica) indicavam a presença de morfologias bacterianas típicas de lodos granulados (DOLFING,1987; de ZEIJW 1987; GUIOT 1991), como por exemplo, *Methanotrix* sp. Essas morfologias foram anteriormente indicadas no trabalho de PENNA (1994), para o mesmo lodo.

A primeira etapa, (Etapa I), correspondeu do início de operação do reator até o 122º dia de operação, quando o reator foi operado com um tempo de detenção hidráulico (TDH) médio de 23,12 horas e submetido a uma carga orgânica volumétrica (COV) média de 0,48 Kg DQO.m⁻³.d⁻¹, alcançando uma eficiência média em termos de DQO de 82 ± 7 % . Na segunda etapa, (Etapa II), que ocorreu do 122º até o 244º dia de operação, quando o reator foi operado com um tempo de detenção hidráulico (TDH) médio de 23,12 horas e acrescido de carga orgânica volumétrica atingindo 0,75 Kg DQO.m⁻³.d⁻¹ e com isso o reator alcançou uma eficiência média em termos de DQO de 86 ± 7 % .

Durante o período compreendido entre o 11º e o 31º dia de operação a alimentação do reator foi mantida com um tempo de detenção hidráulico de 32 h e uma carga orgânica volumétrica teórica de 0,3 Kg DQO.m⁻³.d⁻¹ , porém não foram realizadas as análises referentes ao monitoramento do reator.

Os resultados obtidos durante a operação do reator anaeróbio de fluxo ascendente com biomassa fixa concernentes a estabilidade do processo estão apresentados nas FIGURAS 14 à 19, e referem-se aos valores dos seguintes parâmetros: pH, Alcalinidade Total (ALC), Ácidos Voláteis (AV). Nas FIGURAS 20 à 27, mostram a evolução dos parâmetros de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Produção, volume e concentração de Gás.

100

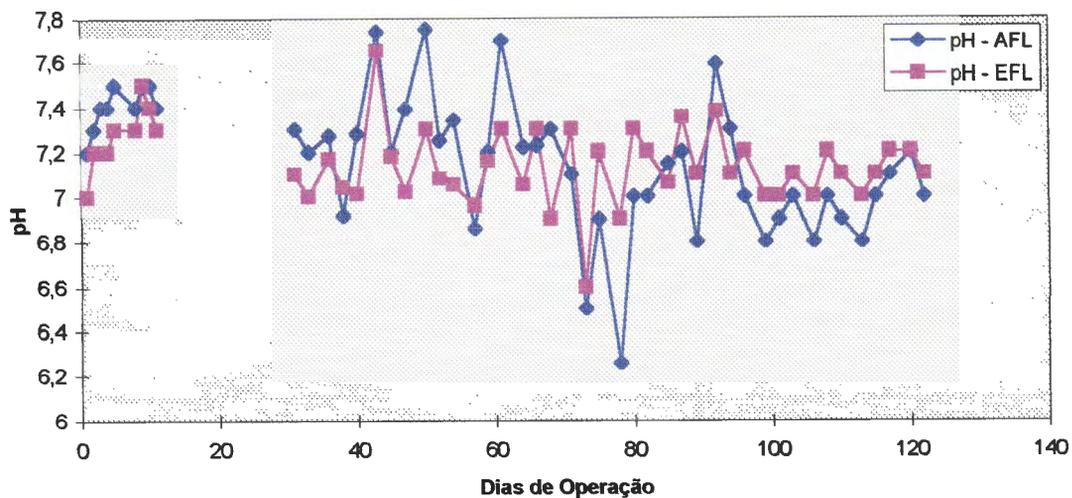


FIGURA 14 - Valores do pH afluente (pH-AFL) e efluente (pH-EFL) referentes a etapa I.

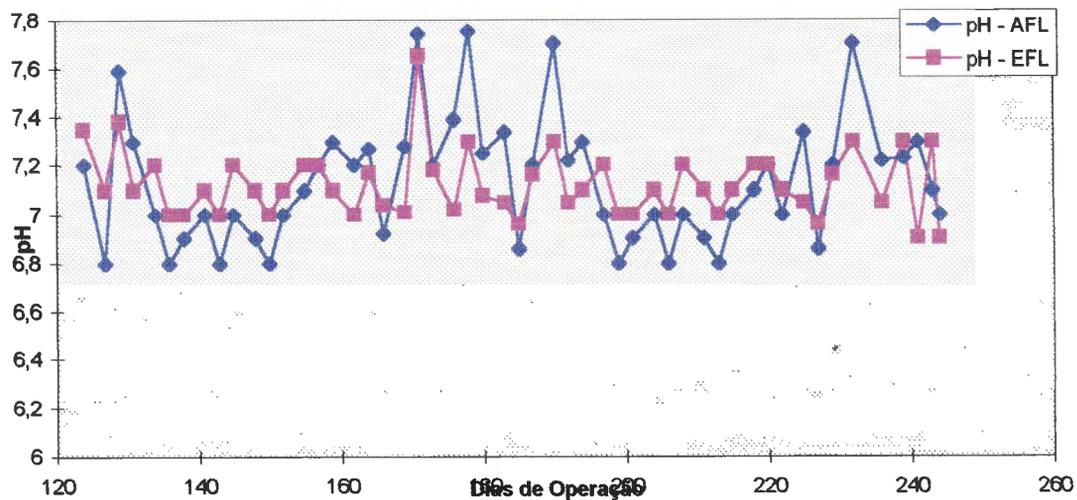


FIGURA 15 - Valores do pH afluente (pH-AFL) e efluente (pH-EFL) referentes a etapa II.

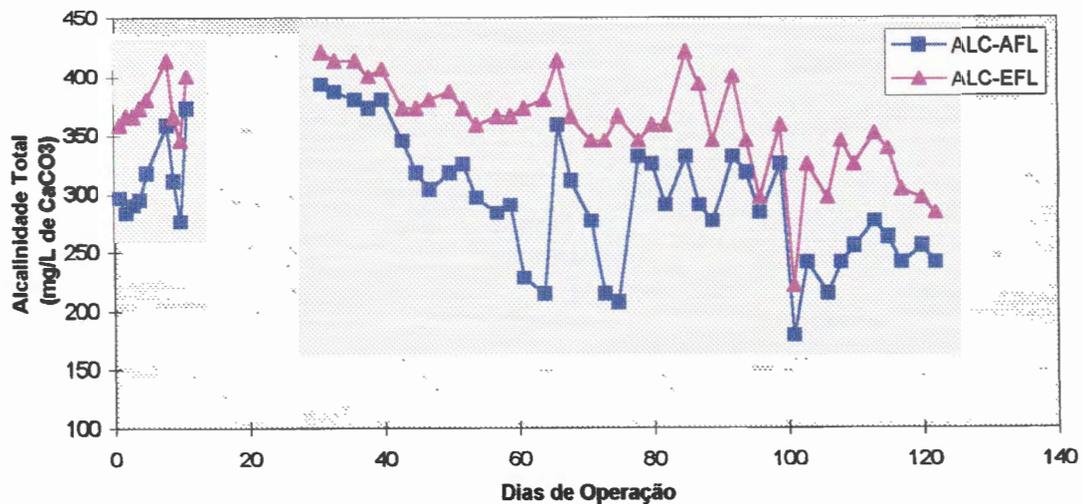


FIGURA 16 - Valores da alcalinidade total afluente (ALC-AFL) e efluente (ALC-EFL) referentes a etapa I.

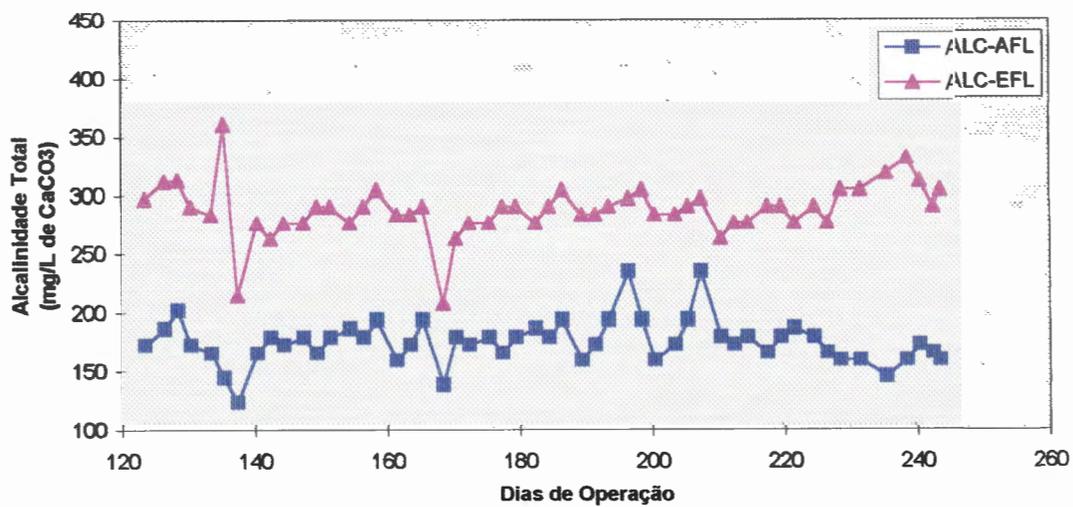


FIGURA 17 - Valores da alcalinidade total afluente (ALC-AFL) e efluente (ALC-EFL), referentes a etapa II.

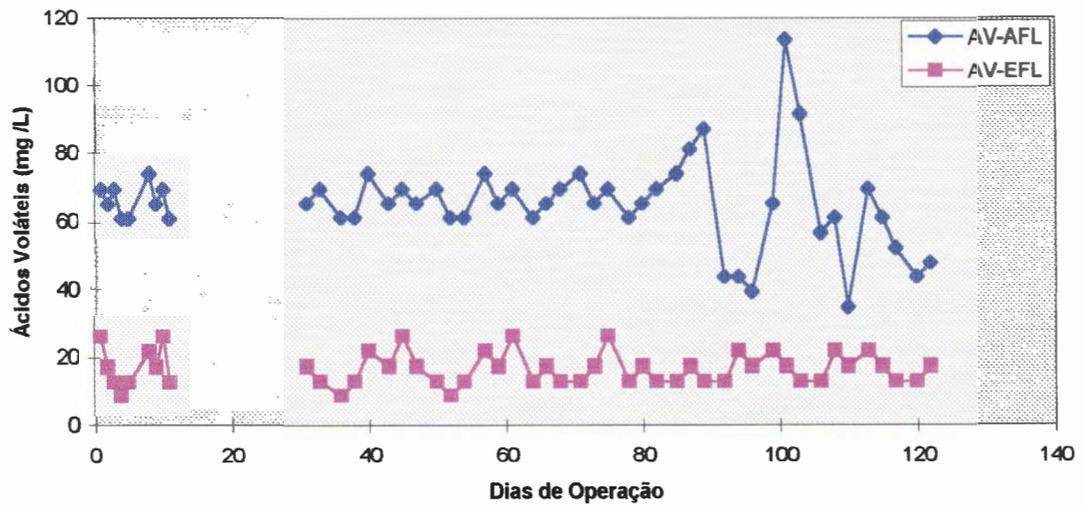


FIGURA 18 - Valores das concentrações de ácidos voláteis afluente (AV-AFL) e efluente(AV-EFL) no reator, referentes a etapa I.

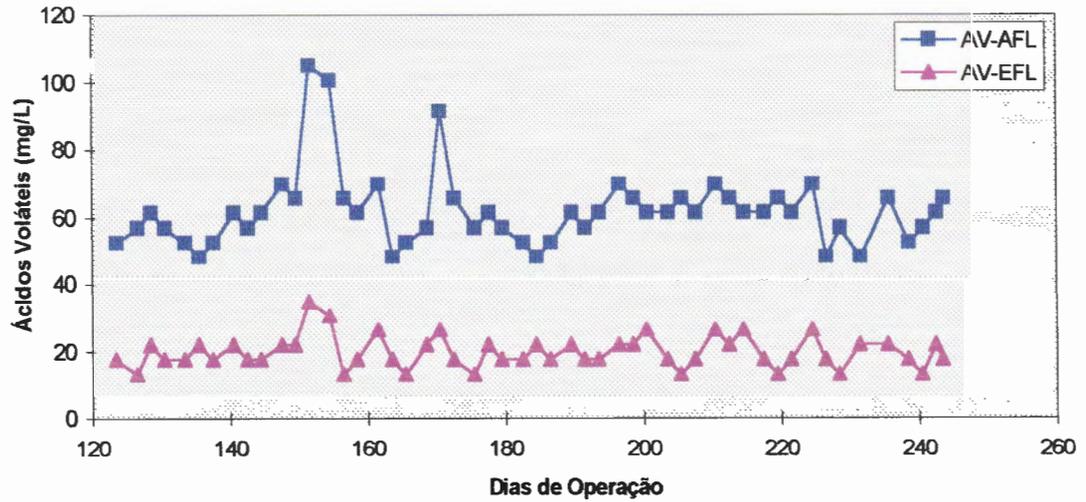


FIGURA 19 - Valores das concentrações de ácidos voláteis afluente (AV-AFL) e efluente(AV-EFL) no reator, referentes a etapa II.

A instabilidade do processo de digestão anaeróbia ocorre quando há predominância da fermentação ácida sobre a fermentação metanogênica, refletindo-se em variações de parâmetros como pH, ácidos voláteis e alcalinidade.

Como pode-se observar nas FIGURAS 14 e 15, e também nas TABELAS 12 e 13 o pH afluente na etapa I variou de 6,2 à 7,8 com coeficiente de variação de 1,5% , e na etapa II variou de 6,5 à 7,8 com coeficiente de variação de 1,3%. No efluente o pH da etapa I variou de 6,6 à 7,8 com coeficientes de variação de 2% e na etapa II variou de 6,6 à 7,7 e com coeficientes de variação de 2,4%. Portanto pode-se entender que o reator não foi submetido a variação significativa de pH a ponto de comprometer seu desempenho .

COLLERAN et al. apud HENZE & HARREMÕES (1983), verificaram que os filtros anaeróbios com fluxo ascendente foram capazes de tratar eficientemente efluentes de indústrias de laticínios com pH variando entre 5,8 e 10,2 . Segundo os autores, o pH do efluente dos filtros foi estável durante todo o experimento, apresentando valores entre 7,2 e 7,3.

CLARK & SPEECE apud CARVALHO (1995), verificaram o efeito do pH no desempenho de filtros anaeróbios de fluxo ascendente em escala de laboratório alimentados com substrato a base de acetato, e concluíram que a fermentação do acetato nos filtros não foi inibida em valores de pH entre 6 e 8.

Nas FIGURAS 16 e 17 , como também nas TABELAS 12 e 13, nota-se que a alcalinidade total do afluente na etapa I foi em média de 295 ± 53 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, e na etapa II 176 ± 20 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. No efluente na etapa I, obteve-se uma média de 361 ± 52 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, e na etapa II 289 ± 20 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Pode-se notar que, em toda operação do reator a

alcalinidade efluente foi maior que a afluente, isto ocorreu pois durante o processo de digestão anaeróbia ocorre a geração de alcalinidade, devido basicamente a dois processos distintos, remoção dos ácidos graxos e a amonificação.

O monitoramento da alcalinidade nos reatores anaeróbios é muito mais eficaz que o monitoramento do pH, pois enquanto a escala do pH é logarítmica, a escala da alcalinidade é linear . A concentração do íon bicarbonato ou a alcalinidade a bicarbonato é aproximadamente equivalente a alcalinidade total para a maioria dos despejos em que a concentração de ácidos voláteis é baixa (FORESTI,1994).

Nas FIGURAS 18 e 19 , como também nas TABELAS 12 e 13, nota-se que a concentração média dos ácidos voláteis na etapa I, obteve-se uma média de 66 ± 15 mg HAc. L⁻¹ e na etapa II de 61 ± 10 mg HAc. L⁻¹ . No efluente na etapa I obteve-se uma média de 17 ± 5 mg HAc.L⁻¹ e na etapa II 20 ± 5 mg HAc . L⁻¹.

SOUZA (1996) operando um reator UASB, seguido de um sistema aeróbio de reator operados em de batelada aeróbio, e utilizando o mesmo substrato sintético do presente trabalho, teve como afluente concentrações semelhantes em termos de pH e Alcalinidade, e uma concentração de ácidos voláteis maiores, devido aos procedimentos de preparação do substrato.

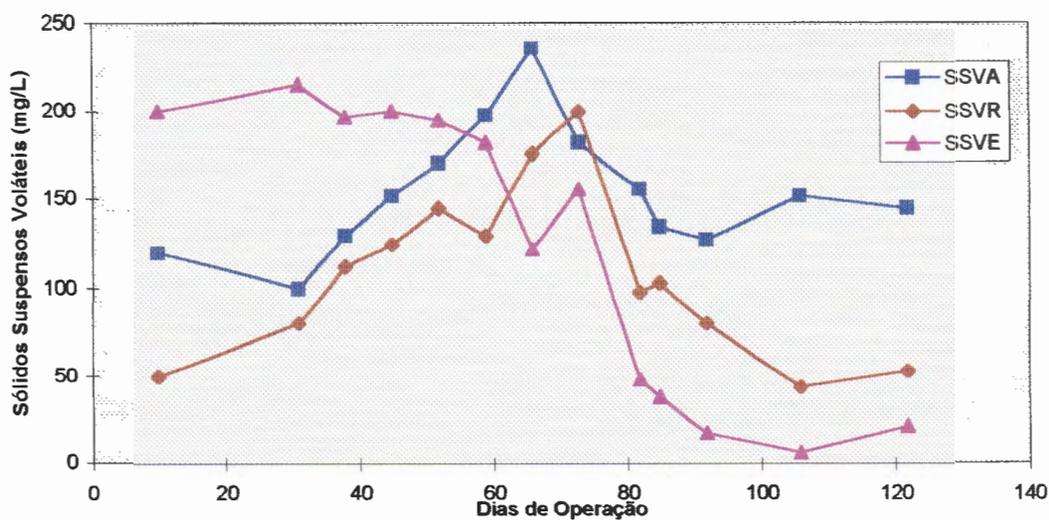


FIGURA 20 - Valores das concentrações de sólidos suspensos voláteis no afluente (SSVA), dentro do reator (SSVR) e no efluente (SSVE), referentes a etapa I.

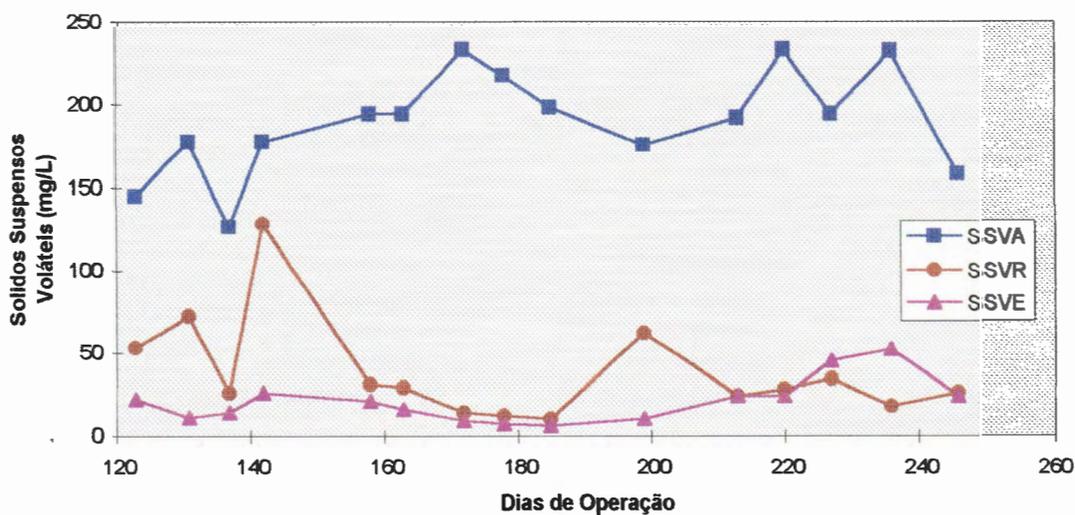


FIGURA 21 - Valores das concentrações de sólidos suspensos voláteis no afluente (SSVA), dentro do reator (SSVR) e no efluente (SSVE), referentes a etapa II.

Na primeira etapa, Etapa I, FIGURA 24, a concentração dos sólidos suspensos voláteis no afluente do reator foi de $154 \pm 34 \text{ mg.L}^{-1}$ com coeficiente de variação de 5%, no efluente a concentração foi de $123 \pm 80 \text{ mg.L}^{-1}$ com coeficiente de variação de 1,5%. Na Etapa II, FIGURA 25 houve um acréscimo da concentração de DQO o que acarretou em um aumento da concentração média de sólidos voláteis no afluente passando para $190 \pm 31 \text{ mg.L}^{-1}$, e no efluente a concentração foi de $21 \pm 13 \text{ mg.L}^{-1}$.

Cabe aqui salientar, que a concentração de sólidos suspensos voláteis no interior do reator refere-se a parte líquida retirada de uma altura que dista a $\pm 0,30\text{m}$ da base do reator.

Nas FIGURAS 20 e 21, nota-se que durante a operação do reator ocorreu uma variação na concentração dos SSV no afluente mais evidenciada na etapa I que na etapa II, mesmo utilizando um substrato sintético preparado em laboratório, e pode ser devido a problemas de amostragem. Mas, SOUZA (1996) operando um reator UASB seguido de um reator seqüencial de batelada aeróbio, utilizando o mesmo substrato sintético teve no afluente de seu sistema uma concentração média de sólidos suspensos voláteis de $162 \pm 32 \text{ mg.L}^{-1}$. Ao correlacionar-se com os resultados supracitados pode-se notar que os valores não foram discrepantes.

Pode-se notar que a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente diminuiu drasticamente da primeira etapa para a segunda etapa, mais precisamente no 82º dia de operação do reator, Etapa I, quando parece que o reator estabilizou - se em termos de concentração de sólidos suspensos voláteis, isto pode denotar a possível aderência dos microrganismos ao material suporte, no caso o PVC. Esta aderência ocorreu de forma lenta, o que pode ter ocasionado a demora na estabilização do reator, devido principalmente ao tipo de material suporte utilizado. Após a

estabilização, o reator operou com uma eficiência de remoção em termos de concentração de sólidos suspensos voláteis de $87 \pm 8\%$.

É importante salientar que a instabilidade da concentração de sólidos suspensos voláteis no reator não influenciou na operação do sistema como um todo, pois neste período não houve redução da eficiência de remoção de matéria orgânica expressa em concentração de DQO como mostra a FIGURA 22 e23 .



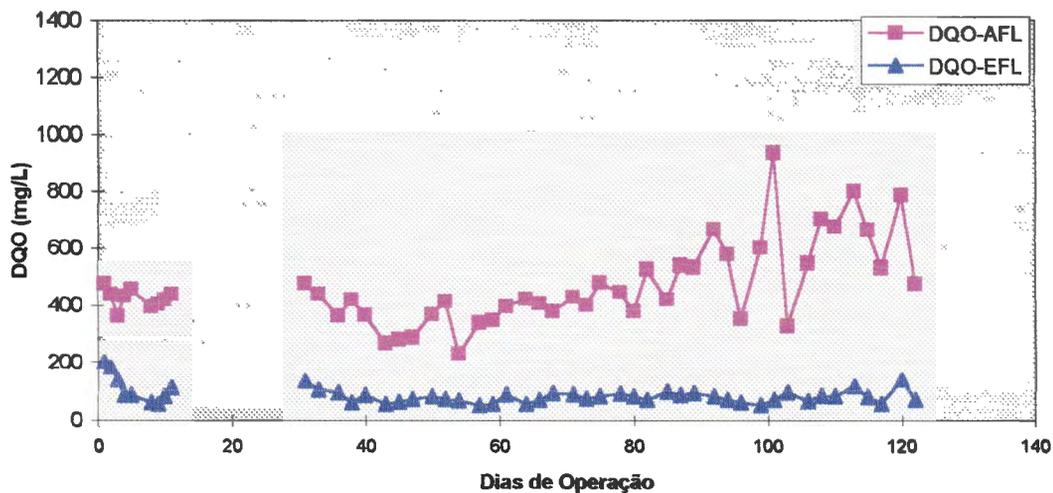


FIGURA 22 - Valores das concentrações de DQO aflente (DQO-AFL) e efluente(DQO-EFL) referentes a etapa I.

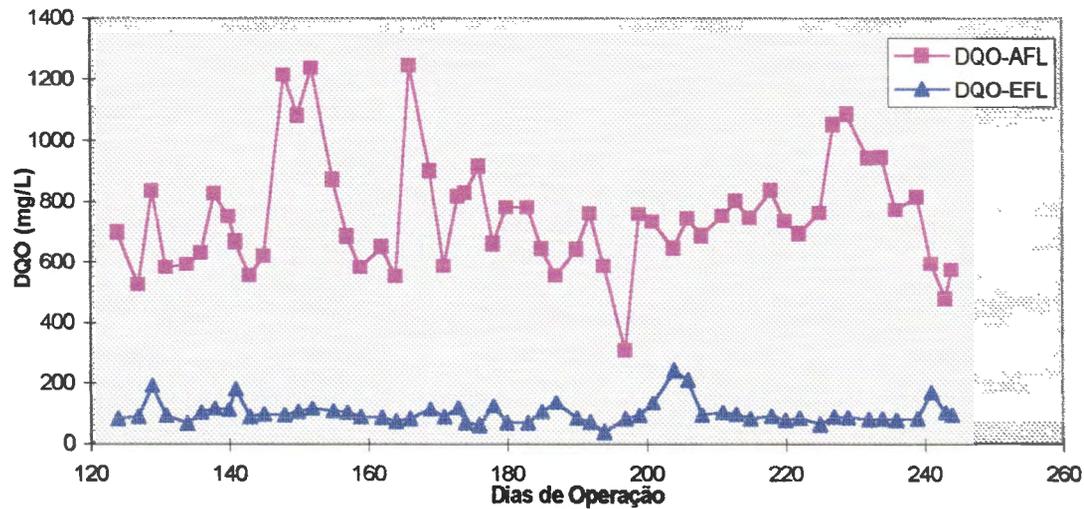


FIGURA 23 - Valores das concentrações de DQO aflente (DQO-AFL) e efluente(DQO-EFL) no reator, referentes a etapa II.

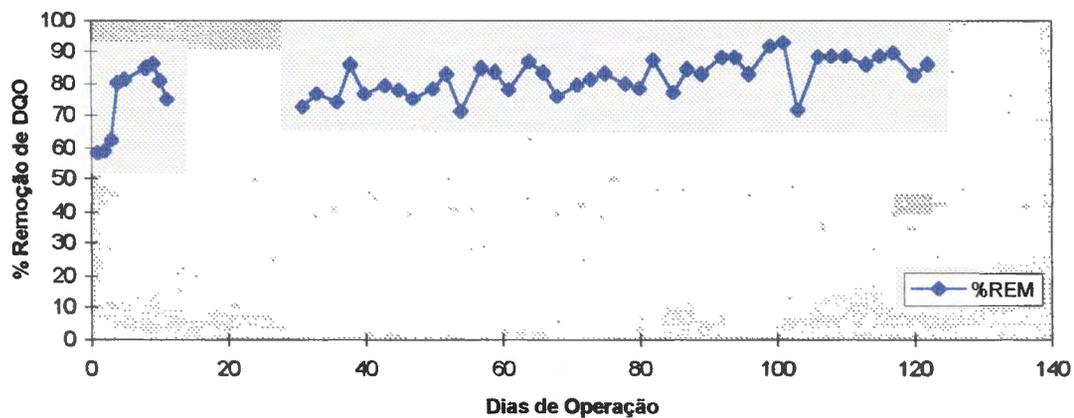


FIGURA 24 - Valores da eficiência da remoção de DQO referentes a etapa I.

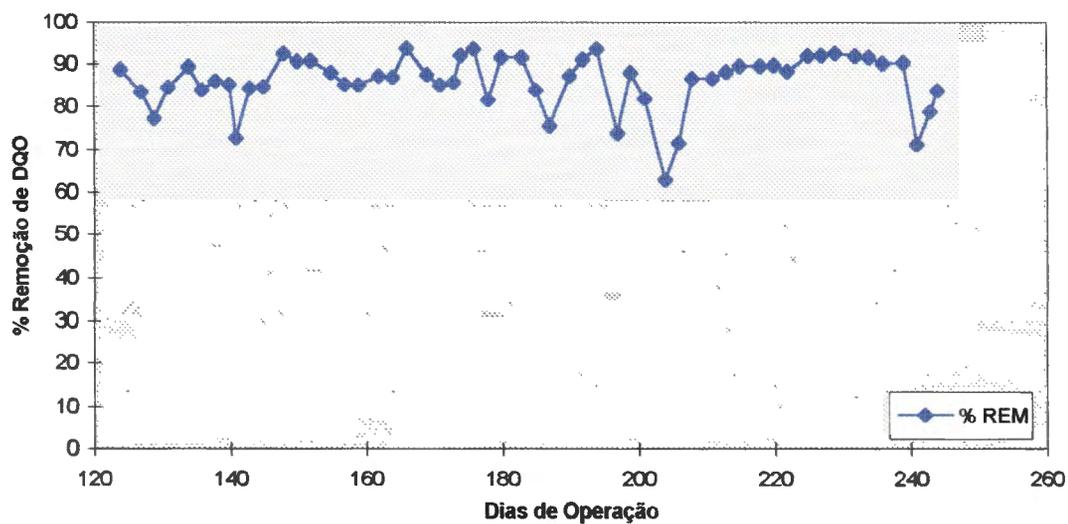


FIGURA 25 - Valores da eficiência da remoção de DQO referentes a etapa II.

A DQO média afluyente e efluente foi de $466 \pm 142 \text{ mg.L}^{-1}$ e $85 \pm 30 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente o que representou uma eficiência média de remoção em termos de DQO de $82 \pm 7\%$, na etapa I.

Na etapa II a DQO afluyente e efluente foi de $739 \pm 169 \text{ mg.L}^{-1}$ e $96 \pm 38 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente. Nesta etapa o reator alcançou uma média de remoção em termos de DQO de $86 \pm 7\%$. Esse aumento na eficiência do reator da etapa I para a etapa II pode ser evidenciado pelo aumento da atividade microbiana.

É necessário ressaltar que houve uma grande variação nos valores de DQO afluyente, durante toda a operação do reator, devido principalmente a dificuldade de se manter uma DQO mais estável. Essa instabilidade se deve ao motivo da degradação do substrato durante sua utilização antes de ser bombeado para o reator. O que pode também ter influenciado a variação da concentração dos sólidos suspensos voláteis afluyente ao reator como já foi comentado anteriormente

O substrato sintético logo após ser elaborado ficava em repouso no tanque de alimentação do reator a temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, o que acarretava num primeiro instante na deposição de alguns componentes de sua composição e no decorrer do período de alimentação ocorria a degradação no próprio recipiente, esta degradação foi da ordem de 20% em relação a DQO ao longo de um período de 24 h.

No 100^o dia de operação do reator, ocorreu uma elevação involuntária na concentração de DQO atingindo um valor de 45% a mais que o habitual ($935,5 \text{ mg.L}^{-1}$), isso acarretou em uma queda de eficiência para 71%. Este aumento na concentração de DQO refletiu no aumento da concentração de ácidos voláteis e na diminuição da concentração da

alcalinidade total. Mas o reator assimilou rapidamente esta carga de choque, como pode ser observado nas FIGURAS 22 e 24.

Na segunda etapa, precisamente no período compreendido entre o 140^o e o 175^o dias de operação, houve uma seqüência de aumento na concentração de DQO afluente involuntariamente, devido a problemas com o substrato sintético, o que acarretou em um aumento da concentração de ácidos voláteis, mas o reator respondeu rapidamente e não houve queda na eficiência de remoção.

Assim sendo, baseado nos parâmetros já delineados e discutidos, pode-se notar que de maneira geral, o reator teve um bom desempenho, absorvendo muito bem pequenos choques de cargas orgânicas, e isto pode ter ocorrido pelo fato do reator estar sendo operado com carga orgânica volumétrica baixa, um tempo de detenção alto e a temperatura constante de 30 ± 1 °C.

TABELA 12 - Valores médios, desvio padrão(δ), coeficiente de variação (CV) e valores máximos (MÁX) e mínimos (MÍN), dos resultados da primeira etapa (ETAPA I)

		MÉDIA	δ	CV	MÁX	MÍN
pH	AFL	7,2	7.1	1.5	7.7	6.3
	EFL	7.2	6.8	2	7.7	6.6
ALC (mg.L ⁻¹)	AFL	295	53	5.6	393	179
	EFL	361	39	9	421	221
AV (mg.L ⁻¹)	AFL	66	15	4.6	114	34
	EFL	17	5	4	26	9
SSV (mg.L ⁻¹)	AFL	154	34	4,5	236	100
	EFL	123,0	80,1	1,5	215,0	6
DQO (mg.L ⁻¹)	AFL	466	142	3	935	231
	EFL	85	30	3	200	52
%REM DQO		81	7	11	93	58

TABELA 13 - Valores médios, desvio padrão(δ), coeficiente de variação (CV) e valores máximos (MÁX) e mínimos (MIN), dos resultados da segunda etapa (ETAPA II)

		MÉDIA	δ	CV	MAX	MIN
pH	AFL	7,2	7,1	1,3	7,8	6,50
	EFL	7,1	6,7	2	7,7	6,6
ALC (mg.L ⁻¹)	AFL	177	20	9	235	124
	EFL	289	20	15	360	214
AV (mg.L ⁻¹)	AFL	61	10	5,8	105	48
	EFL	20	4,6	4	35	13
SSV (mg.L ⁻¹)	AFL	190	31	6	233,0	126,0
	EFL	21	13	1,6	52	7
DQO (mg.L ⁻¹)	AFL	739	169	4	1245	306
	EFL	96	38	3	242	39
%REM DQO		86	7	12	94	63

4.3 - PERFIS DE CONCENTRAÇÕES

Os perfis de concentrações ao longo do reator foram realizados com o intuito de tentar comprovar os dados do teste de hidrodinâmica do reator apresentado anteriormente, no item 5.1.

No teste de hidrodinâmica apresentado anteriormente, no item 5.1, foi verificado que o reator se comportou como um reator de mistura completa, pois pelos ajustes dos modelos teóricos de N-CSTR em série e pequena dispersão aos dados experimentais, obteve-se o valor de 3 para N e 0,17 para o coeficiente de dispersão longitudinal. Desta forma a primeira hipótese sugerida para o comportamento dos parâmetros de monitoramento ao longo do reator foi mais adequada.

Pode-se notar que nas FIGURAS ²⁶28A e ²⁷29A, que o pH não sofreu alteração, durante os ensaios de perfis de concentração, e mesmo durante a operação do reator, pois na preparação do substrato sintético é adicionado em sua formulação bicarbonato de sódio (NaHCO₃) com intuito de se manter o pH próximo de 7,0.

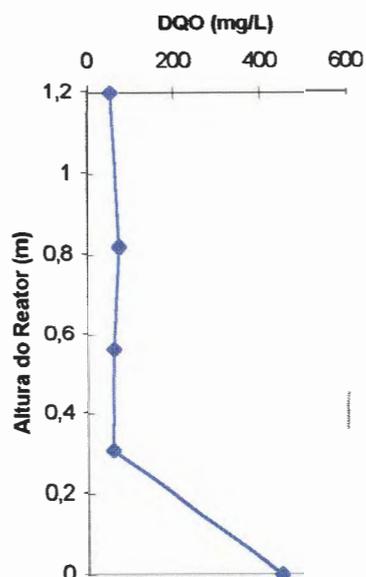
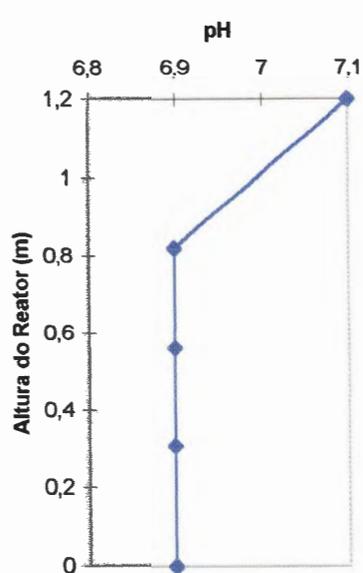
Observando-se os gráficos das FIGURAS 28 e 29, mais especificamente as Letras B e C pode-se notar que o reator se comporta como um reator de mistura pois as concentrações após o ponto de 0,31m se mantêm praticamente constante. No intervalo compreendido entre o início e o ponto 0,31m existem duas hipóteses plausíveis para explicar, a saber:

- A primeira hipótese, se relaciona com o fato do reator se comportar como mistura completa, em que imediatamente após a entrada do afluente, ocorre a mistura em todo seu volume e conseqüentemente a concentração deverá permanecer a mesma por toda a extensão do reator.

- A segunda hipótese, é a existência de uma grande concentração de biomassa na parte inferior do reator que é responsável pela quase totalidade da remoção das concentrações. Esta premissa implica que a parte superior do reator serve apenas para se dar um polimento, ou suportar ocasionais cargas de choque aplicadas, e a primeira parte (até 0,31m de altura) poderia apresentar escoamento próximo ao reator pistonado.

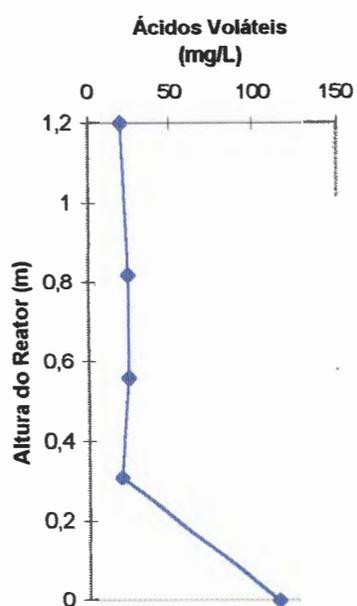
Nos gráficos das FIGURAS 28B, 28C e 29C pode-se notar um incremento nas concentrações, principalmente, no ponto 0,82m, que pode representar talvez anomalias de escoamento tais como, recirculação interna, zonas mortas, caminhos preferenciais ou ainda de erros referentes aos procedimentos de coleta e leitura. Pode-se salientar, que foram tomadas certas precauções quanto a coleta e leitura para minimizar estes erros.

Ao observar os gráficos das FIGURAS 28D e 29D, pode-se notar que há um acréscimo nas concentrações de alcalinidade. O bicarbonato se forma em digestão anaeróbia por dois processos distintos a redução dos ácidos graxos voláteis e a amonificação. Em contrapartida, o aumento da alcalinidade acarretou uma diminuição dos ácidos voláteis, isto pode ser comprovado neste caso observando as FIGURAS 28C, 28D, 29C e 29D.

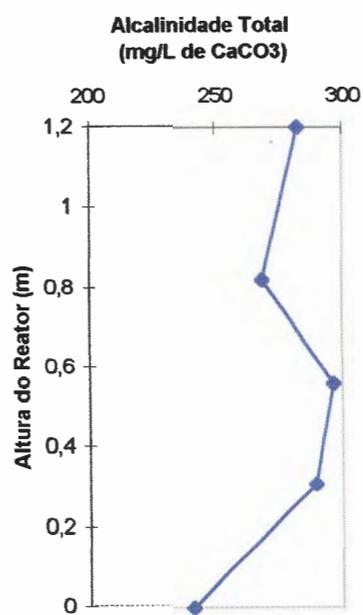


A

B

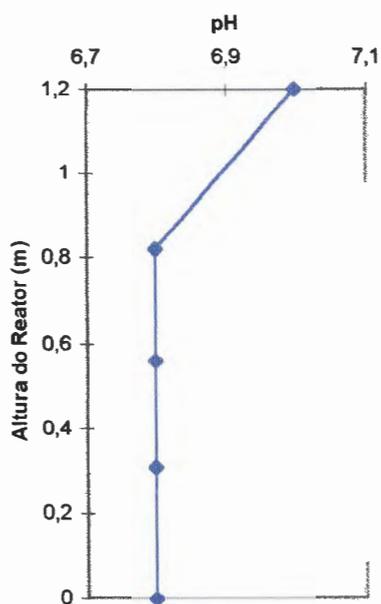


C

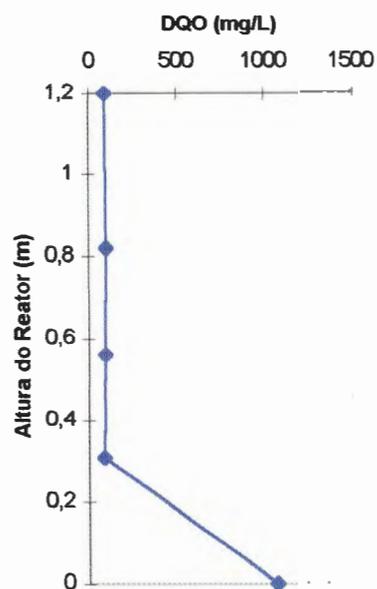


D

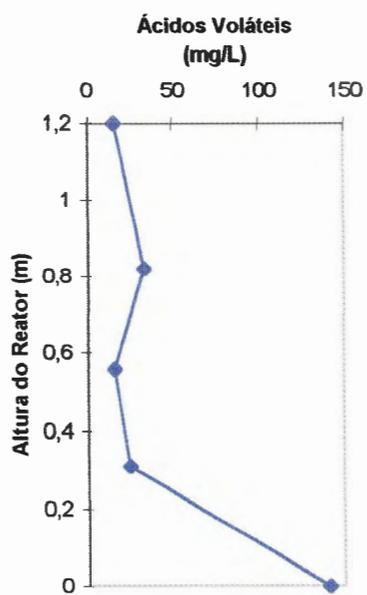
FIGURA 26 - Valores das análises de pH, DQO, alcalinidade total e ácidos voláteis representando os perfis de concentração na primeira etapa (ETAPA I).



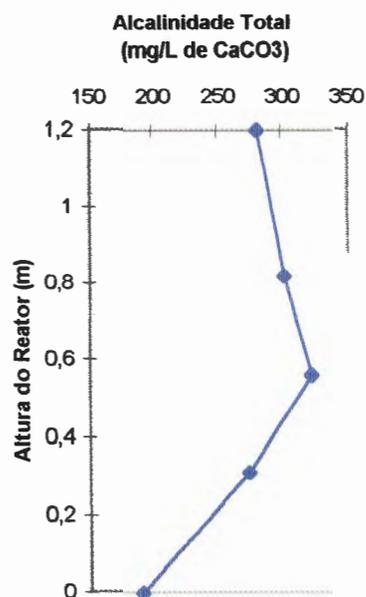
A



B



C



D

FIGURA 27 - Valores das análises de pH, DQO, alcalinidade total e ácidos voláteis representando os perfis de concentração na segunda etapa (ETAPA II).

4.4 - PRODUÇÃO DE GÁS

A produção de gás no reator foi monitorada durante sua operação através de análises cromatográficas e por deslocamento de líquido.

Na FIGURA ²⁸~~26~~ são apresentados os valores relativos aos primeiros 12 dias de operação, e pode-se ressaltar que o reator estabilizou, em termos de concentração de gás metano em 3 dias de operação quando alcançou a produção média de 25 mmol.L^{-1} .

Na FIGURA ²⁹~~27~~ pode-se observar as concentrações do gás metano durante toda a operação do reator (etapa I e etapa II) e nota-se que a concentração do gás permaneceu constante durante praticamente toda a operação do reator alcançando uma concentração média de 28 mmol.L^{-1} .

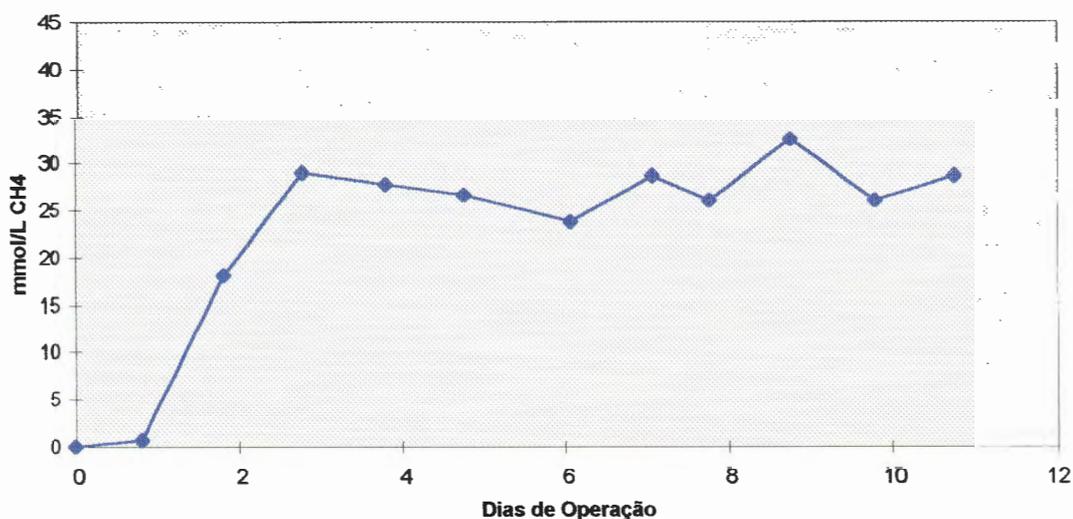


FIGURA 28 - Valores da concentração de metano nos primeiros 12 dias de operação do reator.

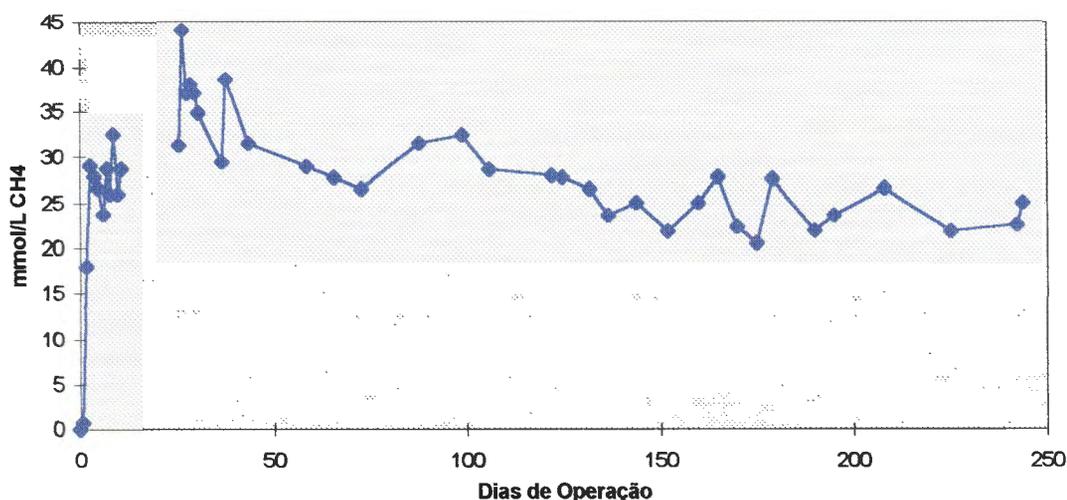


FIGURA 29 - Valores da concentração de metano durante a operação do reator (etapa I e etapa II).

Além da medição da concentração do gás metano por cromatografia foi realizada a medição da produção de gás em termos de volume de gás produzido por intermédio do deslocamento líquido a partir de um frasco tipo Mariotte contendo uma solução de NaOH 6M. Portanto conseguiu-se uma média em termos de volume de gás produzido de $1,78 \text{ L CH}_4 \cdot \text{d}^{-1}$.

Os valores de gás produzidos foram calculados através dos valores de vazão de gás, produzida segundo a relação teórica que afirma, que 1 Kg de $\text{DQO}_{\text{removida}}$ produz 350 L de gás metano na CNTP. Fazendo-se a correção para a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de 0,92 atm., obtem - se uma nova relação teórica em que 1 Kg $\text{DQO}_{\text{removida}}$ produz 430 L de gás metano.

Então a produção média do gás metano obtida através da relação supracitada foi de $1,36 \text{ L CH}_4 \cdot \text{d}^{-1}$, o que corresponde a uma produção de $0,1 \text{ L CH}_4 / \text{g DQO}_{\text{removida}}$.

TÉRAN (1995), operando um reator de leito fluidificado, tratando uma DQO média de 609 mg.L^{-1} , com um tempo de detenção hidráulica de 6,5 h e

utilizando o mesmo substrato sintético deste trabalho, obteve uma produção média de gás de $0,56 \text{ L.d}^{-1}$.

SOUZA (1996), tratando uma carga orgânica volumétrica de $2,25 \text{ KgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e um tempo de detenção hidráulico de 4,7 h com o mesmo substrato sintético deste trabalho, obteve uma produção média da concentração de metano de $2,0 \text{ L CH}_4.\text{d}^{-1}$.

4.5 - MONITORAMENTO MICROSCÓPICO DO REATOR

O monitoramento microbiológico do reator foi realizado uma vez por mês durante toda a operação do reator, sendo observado inúmeros campos por microscopia de campo claro, de contraste de fase e fluorescência, sendo eficiente na verificação das morfologias predominantes nas amostras de grânulos, biofilmes e material em suspensão.

As observações microscópicas foram realizadas levando-se em conta as características dos tipos microbianos presentes em biodigestores anaeróbios descrito na literatura (ROBINSON et al., 1984; DUBOURGUIER et al., 1985; ; DUBOURGUIER et al., 1987; SANCHEZ et al., 1994; MacLEOD et al., 1990; GROTENHUIS et al., 1991) e as informações contidas no manual de BERGEY (1988). Foram analisados inúmeros campos, sendo que essas fotomicrografias apresentadas são somente uma amostra das morfologias predominantes.

Nas amostras de grânulos analisados sob as técnicas supracitadas, verificaram-se as seguintes morfologias predominantes: cocobacilos; bacilos em pares; bacilos curvos; víbrios; bactérias cuja a morfologia assemelhou-se ao gênero *Desulfomaculum* sp , bactérias cuja a morfologia assemelhou-se ao gênero *Methanothrix* sp .

Nas amostras de biofilme aderido ao material suporte de PVC, verificaram-se as seguintes morfologias predominantes: bacilos curtos; bacilos fluorescentes; bacilos curvos; víbrios; cocos; bactérias cujo morfologia assemelhou-se ao gênero *Methanosarcina* sp, bem como bactérias cuja a morfologia assemelhou-se ao gênero *Methanothrix* sp .

Em amostras do material em suspensão, verificaram-se as seguintes morfologias predominantes: bacilos livres; bacilos fluorescentes; bacilos curvos; bacilos em pares; víbrios; cocos; bactérias esporuladas; bactérias cuja morfologia assemelhou-se ao gênero *Desulfomaculum* sp , bactérias cuja morfologias assemelhou-se ao gênero *Methanothrix* sp .

Na FIGURA 30.A verificam-se as morfologias que predominam na amostra de grânulos, bacilos em pares, bacilos curtos, cocobacilos. A presença de flocos bacterianos também foi constatada. A FIGURA 30.B evidencia as morfologias referidas, grânulos, bacilos em pares, bacilos curtos, cocobacilos. Na FIGURA 30.C notam-se as morfologias da amostra de grânulos, bacilos em pares, bacilos curtos, cocobacilos e morfologias semelhantes a *Desulfomaculum* sp. A FIGURA 30.D mostra uma formação regular que pode ser relacionada a presença de uma fase de sarcinas metanogênicas.

Na FIGURA 31.A verificam-se as morfologias que predominam na amostra de biofilme aderido ao material suporte, bacilos fluorescentes. Na FIGURA 31.B pode-se constatar as morfologias referentes ao biofilme aderido ao material suporte, principalmente o gênero *Methanosarcina* sp .Na FIGURA 31.C verificam-se no material em suspensão as seguintes morfologias, bacilos livres, bacilos em pares, bacilos curvos, (esses tipos de morfologias foram freqüentemente encontrados, neste trabalho, no material em suspensão). Na FIGURA 31.D verificam-se no material em suspensão as seguintes morfologias, bacilos livres, bacilos em pares, bacilos curvos, e morfologias semelhantes a *Methanothrix* sp .

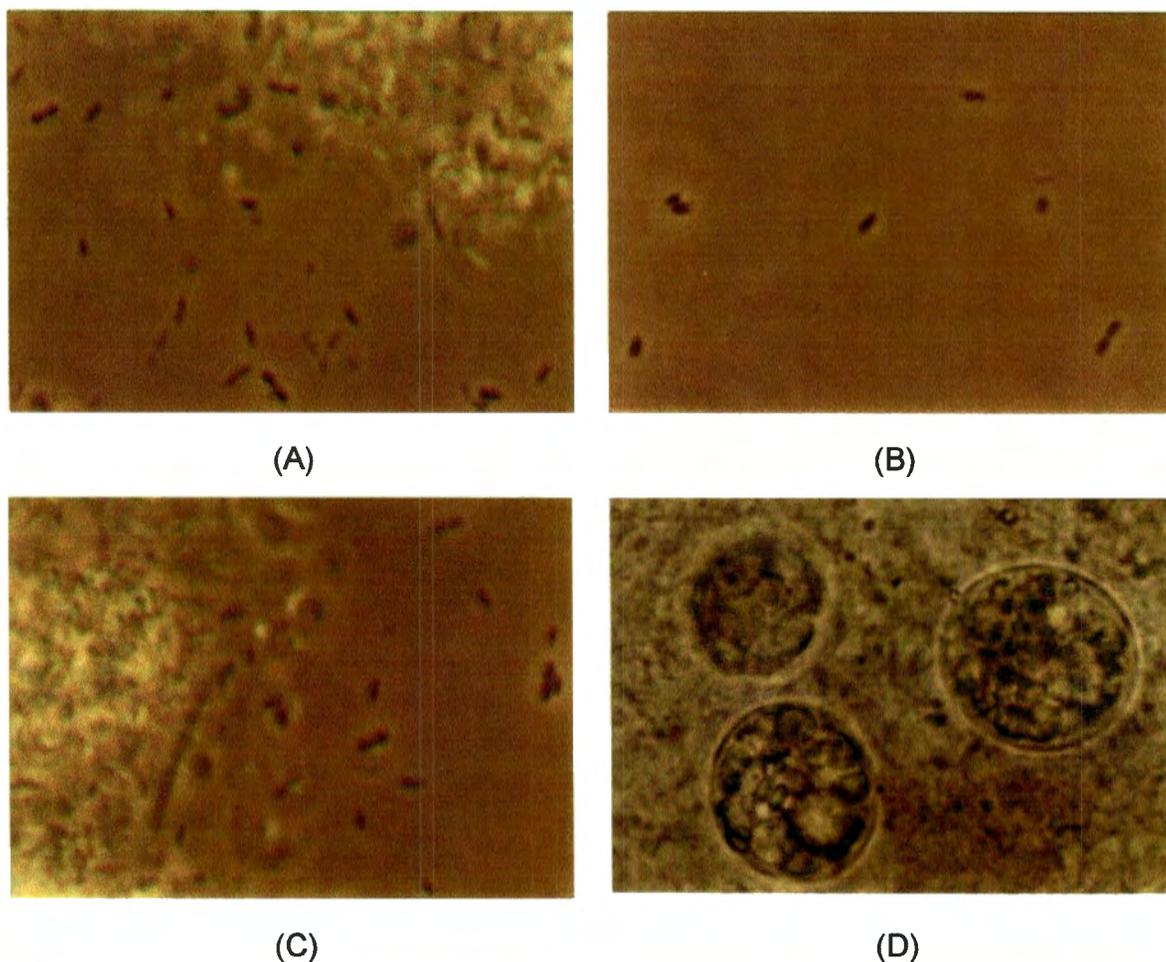


FIGURA 30 - Fotomicrografias das amostras (A) grânulos, bacilos em pares, curtos, cocobacilos e aglomerado bacteriano no alto a direita; (B) grânulos, bacilos em pares; (C) grânulos, semelhantes a (A), com aglomerados bacterianos a esquerda; (D) grânulo, provável arranjo regular de uma fase de sarcinas metanogênicas. (Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25). Uma barra de 1 cm \cong 8 μ m.

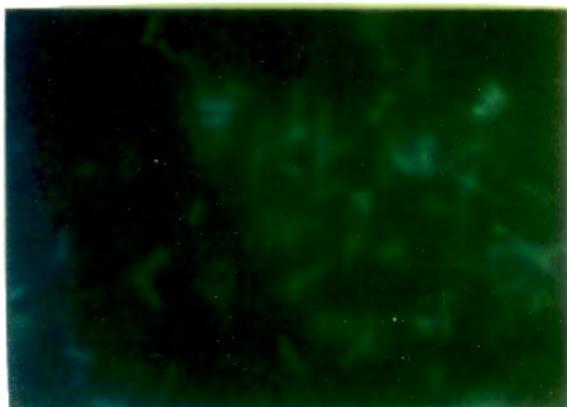


FIGURA 31.A

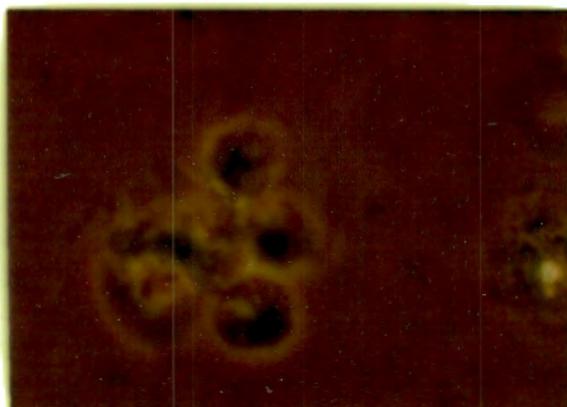


FIGURA 31.B

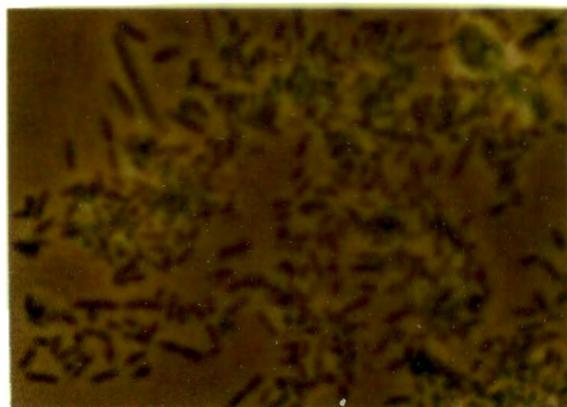


FIGURA 31.C

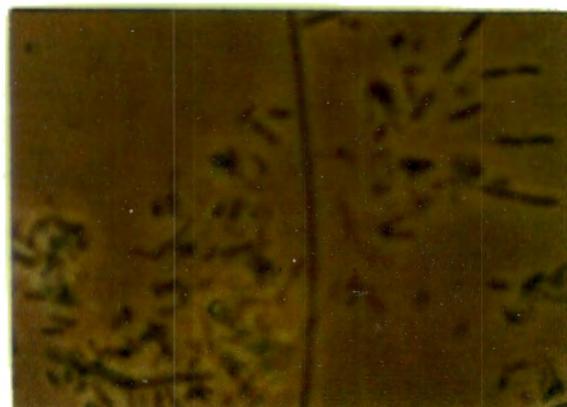


FIGURA 31.D

FIGURA 31 - Fotomicrografias das amostras (A) biofilme aderido, bacilos fluorescente; (B) biofilme aderido, gênero *Methanosarcina* sp; (C) material em suspensão, bacilos livres, bacilos em pares, bacilos curvos; (D) material em suspensão, bacilos livres, bacilos em pares, bacilos curvos. (Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25). Uma barra de 1 cm \cong 8 μ m.

As amostras retiradas dos grânulos, do biofilme aderido ao material suporte e do material em suspensão apresentaram, de maneira geral, basicamente as mesmas morfologias predominantes. Com predomínio das bactérias metanogênicas dos gênero *Methanothrix* sp sendo também observado bactérias do gênero *Methanosarcina* sp, mas em menor quantidade, o que pode ser devido as condições de operação do reator.

4.6 - ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

4.6.1 - Crescimento do biofilme aderido ao material suporte

Neste item apresentar-se-á os resultados referentes ao crescimento do biofilme aderido ao material suporte, PVC, em três alturas diferentes: baixo, médio e alto. O baixo é relativo ao biofilme aderido na parte inferior do material suporte que dista $\pm 0,28$ m da base do reator. O médio é relativo ao biofilme aderido na parte mediana do material suporte que dista $\pm 0,54$ m da base do reator. O alto é relativo ao biofilme aderido na parte superior do material suporte que dista $\pm 0,79$ m da base do reator.

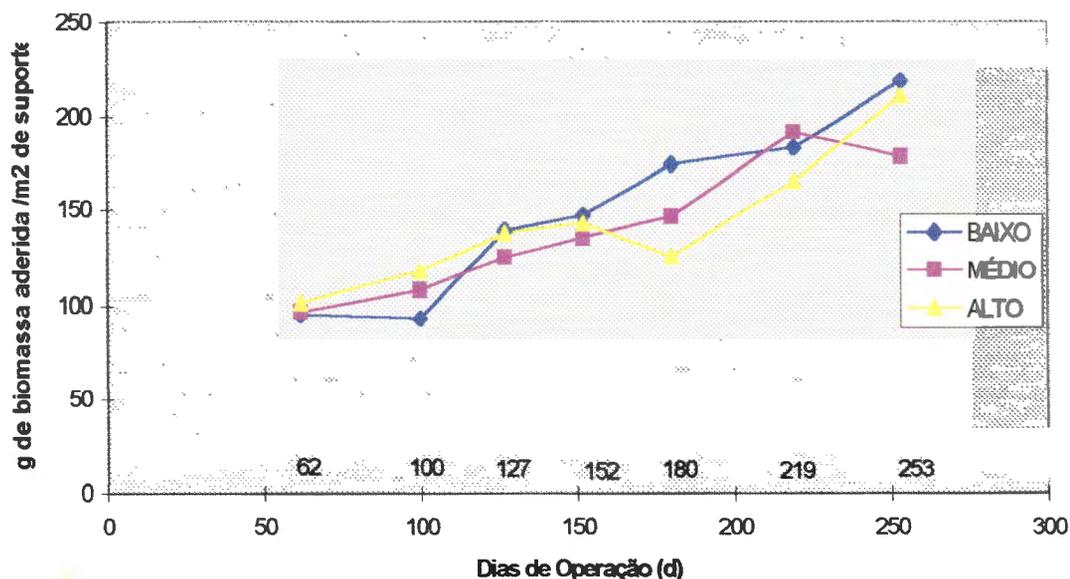


FIGURA 32 - Gráfico que representa o crescimento do biofilme aderido ao material suporte, PVC, em três alturas diferentes, baixo, médio e no alto, durante a operação do sistema.

Na FIGURA 32 pode-se observar o crescimento do biofilme aderido ao material suporte, no caso o PVC através do aumento de biomassa aderida (g.m^{-2}) em função do tempo (dias). De maneira geral houve um aumento na faixa de 97 g de biomassa aderida / m^2 de suporte no 62º dia de

operação para a faixa de 202 g de biomassa aderida / m² de suporte no 253^o dia de operação.

Pode-se observar que com o aumento da carga orgânica volumétrica de de 0,48 Kg DQO.m⁻³.d⁻¹ para 0,75 Kg DQO.m⁻³.d⁻¹ no 122^o de operação do reator, acarretou em um aumento médio do crescimento do biofilme que passou de 1,64 g.m⁻².d⁻¹ para 2,60 g.m⁻².d⁻¹, ou seja um aumento de 36 %.

Pode-se notar também que todas as três alturas, baixa, média e alta, tiveram as mesmas características, ou seja, apresentaram um crescimento similar. Ao correlacionar-se esses resultados com aqueles obtidos no teste de hidrodinâmica do reator, em que verificou-se que o reator se comporta como um reator de mistura completa com N-CSTR em série de 3 e coeficiente de dispersão longitudinal de 0,17, pode-se afirmar que nestas condições o crescimento foi homogêneo nas três diferentes alturas estudadas.

Se observarmos atentamente as curvas apresentadas no gráfico pode-se notar que se formaram três retas, basicamente com mesma inclinação. Portanto, levando-se em consideração os estudos realizados por BELKADIR et al.(1988), pode-se concluir que este período correspondeu a fase de crescimento linear do biofilme, em que o reator operou em regime de equilíbrio dinâmico aparente. Como explicado no item 3.4.3.3.

No período estudado (62^o a 253^o dia de operação), a camada do biofilme aderido no material suporte era visivelmente muito fina. Esta demora na aderência pode ter sido provocada pelo fato do reator estar trabalhando com uma carga orgânica volumétrica baixa, ou ser devida ao material suporte, no caso o PVC.

Segundo estudos publicados por VERRIER et al. (1988), sobre vários materiais suportes, concluiu-se que a adesão bacteriana deve ocorrer

primeiramente em superfícies hidrofóbicas. O grau de hidrofobicidade é calculado através do ângulo de contato da superfície e da água. Utilizando-se o teste de atividade metanogênica, os autores concluíram que entre outros, o PVC foi o que apresentou uma colonização lenta e com pouca diversidade microbiana.

Segundo artigo publicado por Van Den BERG & KENNEDY (1981), em função de seus estudos com quatro materiais suportes, entre os quais o PVC mostrou o biofilme formado com 1 a 3mm de espessura, e 5 a 8 % de sólidos orgânicos não solúveis. Destacam-se ainda que o desenvolvimento do biofilme no PVC teve uma fase lag grande antes da formação do biofilme, e mesmo assim não ocorreu a inibição no desenvolvimento das bactérias metanogênicas.

Neste trabalho, ocorreu a mesma demora que VERRIER et al. (1988) e Van Den BERG & KENNEDY (1981) relataram sobre a aderência de microrganismos no material suporte, o que revela a importância dos estudos da pré-condição de superfície, ressaltando-se as características físicas e químicas do suporte.

4.6.2 - Exames microscópicos das morfologias predominantes no material suporte e grânulos utilizando a microscopia de varredura eletrônica

Esses exames foram realizadas em dois períodos. No primeiro período, o reator estava em operação durante 127 dias, e no segundo, o reator estava em operação a cerca de 253 dias. Nas FIGURAS 33 e 34 pode-se observar as fotomicrografias de varredura eletrônica realizadas com amostras de grânulo e do biofilme aderido.

Na FIGURA 33.A observa-se uma amostra de grânulo com 4 meses de operação com um tamanho de aproximadamente 350 μ m. Na FIGURA 33.B verifica-se uma amostra do grânulo com 4 meses de operação com

uma estrutura não identificada, mas freqüentemente encontrada no lodo granular. Na FIGURA 33.C observa-se a organização interna do grânulo, após 4 meses de operação, em que destacam-se diferentes tipos morfológicos, tais como cocos e bacilos. Na FIGURA 33.D pode-se observar no biofilme com 4 meses de operação, estrutura não identificada, anteriormente referida também encontrada no biofilme. Na FIGURA 33.E observa-se no biofilme, com 4 meses de operação, um arranjo estrutural, não identificado, mas freqüentemente encontrado no biofilme. Na FIGURA 33.F pode-se observar na amostra de biofilme após 4 meses de operação a sua organização interna com diferentes tipos morfológicos tais como bacilo e cocos, com predominância de estruturas celulares que se parecem morfológicamente com o gênero *Methanothrix* sp .

Na FIGURA 34.A observa-se na amostra de biofilme, após 4 meses de operação em que demonstra uma estrutura não identificada mas freqüentemente encontrada nesta mesma amostra, sendo esta fotomicrografia uma ampliação da FIGURA 33.E. Na FIGURA 34.B pode-se observar uma amostra do biofilme com 4 meses de operação, em que demonstra a organização interna do biofilme aderido, em que é possível verificar diferentes tipos morfológicos tais como cocos e bacilos, arranjo este, similar a FIGURA 33.C referentes aos grânulos. Na FIGURA 34.C verifica-se o grânulo com 8 meses de operação, em que observa-se sua organização interna, semelhante a FIGURA 33.C e 34.B., e também os tipos morfológicos semelhantes ao cocos. Na FIGURA 34.D nota-se na amostra do biofilme com 8 meses de operação, as estruturas celulares não identificadas, como visto nas FIGURAS 33.E e 34.A. Na FIGURA 34.E verifica-se o biofilme com 8 meses de operação, em que demonstra a organização do biofilme com diferentes tipos morfológicos tais como cocos e bacilos. Na FIGURA 34.F verifica-se o biofilme com 8 meses de operação, em que demonstra a organização interna das estruturas celulares com diferentes tipos morfológicos e com predominância de um tipo morfológico semelhante a *Methanothrix* sp. Esta fotomicrografia é semelhante a

FIGURA 33.F.

Confrontando-se os resultados apresentados no item 5.5 referentes ao acompanhamento microscópico do reator utilizando microscopia de luz, campo claro, contraste de fase e a fluorescência com os apresentados (item 5.6.2) sobre microscopia de varredura eletrônica, pode-se concluir que tanto nos grânulos quanto no biofilme aderido ao material suporte, basicamente as mesmas morfologias bacterianas predominantes, que foram as bactérias do gênero *Methanothrix* sp e as *Methanosarcinas* sp .

ROBINSON et al.(1984), examinando o biofilme aderido em vários materiais suportes,(bolas plásticas sólidas, anéis cilíndricos de plástico, esferas de plástico com superfície interna, blocos de pinheiro, blocos de cipreste, blocos de carvalho) e em três alturas diferentes de meio suporte, através de microscopia eletrônica de varredura, e transmissão , juntamente com a microscopia de campo claro e a fluorescência, visualizando as seguintes espécies, *Methanothrix* sp, *Methanosarcina* sp, *Methanospirillum* sp e *Methanococcus* sp e concluíram que, o biofilme aderido aos materiais suportes e nas diferentes alturas não diferiram significativamente nas características microbianas e na aparência global ,e constataram também que o biofilme aderido ao material suporte não é visualizado em sua formação ou na formação das populações microbianas.

WU et al. (1996), utilizando um reator de fluxo ascendente com material suporte de grãos de areia, sendo alimentado com um meio de cultura estéril a base de propionato, butirato, acetato e inoculado com 4 espécies pré definidas de microrganismos,(*Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanosaeta* sp e *Methanosarcina mazei*) e auxiliado pela microscopia eletrônica de varredura, e transmissão, microscopia campo claro e fluorescência, concluíram que os grânulos e o biofilme aderido ao material suporte apresentaram a mesma composição microbiana, com as mesmas cinco espécies inoculadas.

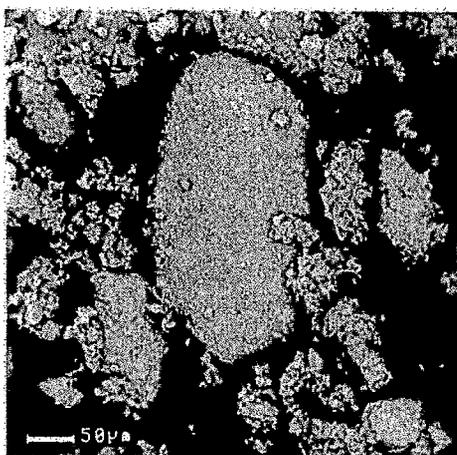


FIGURA 33.A

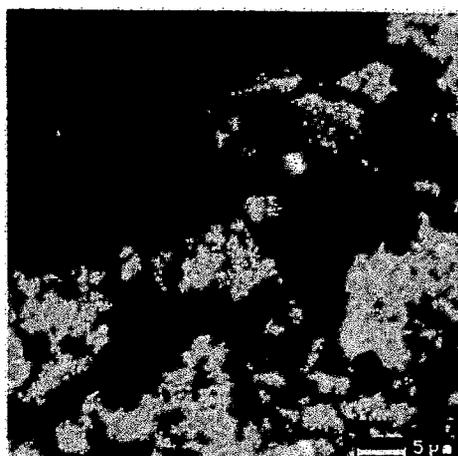


FIGURA 33.B

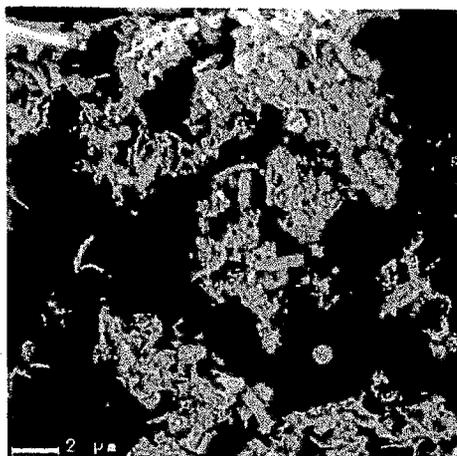


FIGURA 33.C

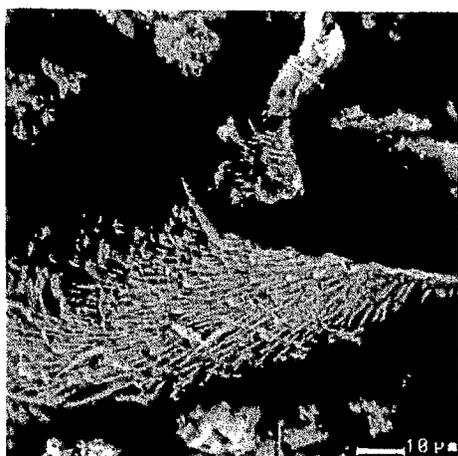


FIGURA 33.D

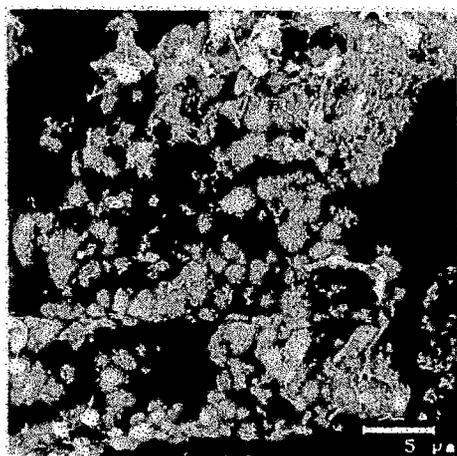


FIGURA 33.E

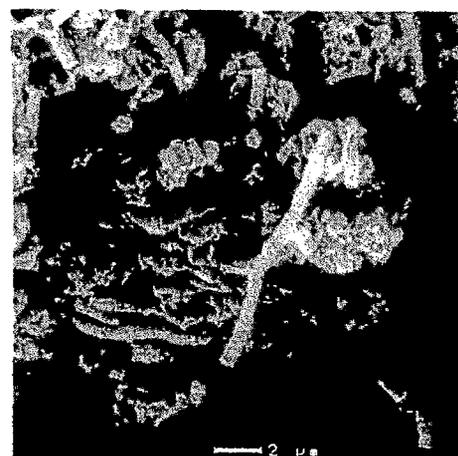


FIGURA 33.F

FIGURA 33 - Fotomicrografia de varredura eletrônica de análise do grânulo (A), (B), (C) e do biofilme aderido ao material suporte (D), (E) e (F).

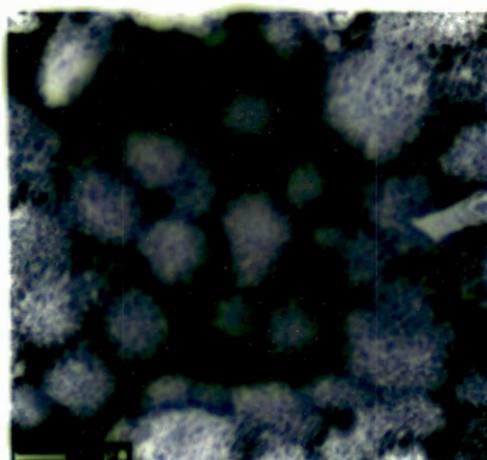


FIGURA 34.A

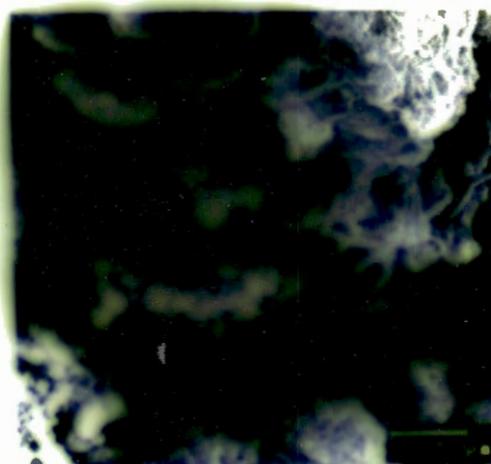


FIGURA 34.B

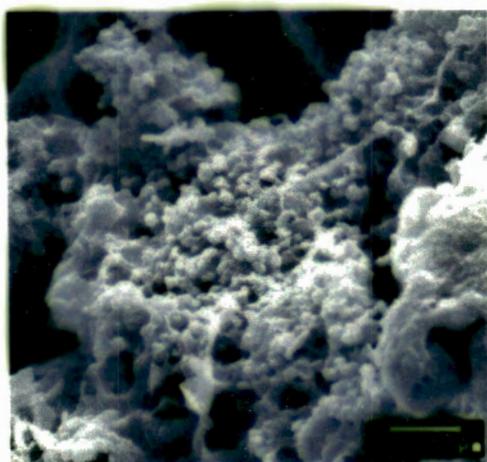


FIGURA 34.C

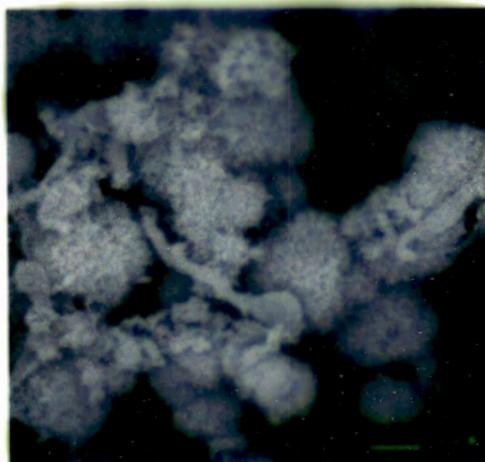


FIGURA 34.D

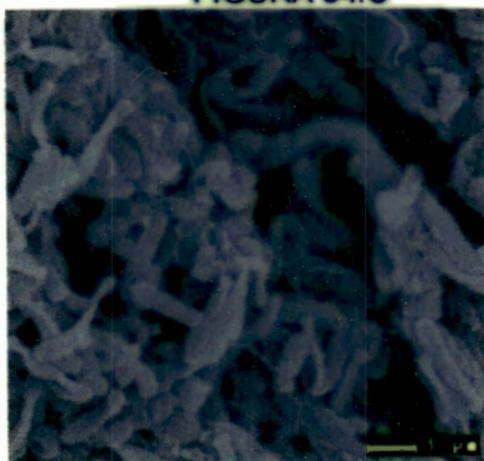


FIGURA 34.E

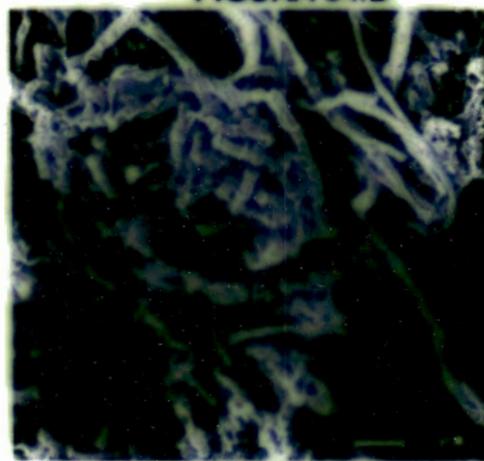


FIGURA 34.F

FIGURA 34 - Fotomicrografia de varredura eletrônica de análise do grânulo, (C), e do biofilme aderido ao material suporte, (A), (B), (D), (E) e (F).

4.7 CONTAGEM BACTERIANA

Os resultados pertinentes à contagem de bactérias anaeróbias estritas realizadas nos grânulos e no biofilme aderido ao material suporte estão apresentadas a seguir. Foram realizadas 6 contagens, sendo a primeira realizada no 130^o dia de operação do reator, com isso o reator já estava operando em regime de equilíbrio hidrodinâmico aparente.

É importante salientar, que após a primeira contagem, o reator foi operado de forma a manter as mesmas características ao longo de sua operação.

TABELA 14 - Resultados das análises nos dias de inoculações das contagens bacterianas

Dias	pH		ALC mg.L ⁻¹		AV mg.L ⁻¹		DQO mg.L ⁻¹			SSV mg.L ⁻¹		
	AFL	EFL	AFL	EFL	AFL	EFL	AFL	EFL	%	AFL	R	EFL
130	7,3	7,1	173	290	57	17	581	90	85	178	72	11
145	7,0	7,2	173	276	61	17	621	95	85	178	128	26
149	6,8	7,0	165	290	65	22	1080	103	91	194	31	21
180	7,3	7,1	179	290	57	17	780	68	91	218	12	7
194	7,3	7,1	183	290	61	17	586	39	93	176	62	10
219	7,1	7,2	179	290	65	13	733	76	90	233	28	24

Na TABELA 14 pode-se verificar os resultados das análises referentes aos dias de inoculações do teste de contagem bacteriana. Pelos dados observados nesta tabela pode-se notar que: o pH, a alcalinidade

total(AT) e os ácidos voláteis(AV) não sofreram variações significativas que pudessem afetar os resultados, os valores de DQO sofreram alterações, devido principalmente a dificuldade de se manter uma concentração mais estável, mas mesmo sofrendo estas alterações a percentagem de remoção em termos de DQO variou de 85 a 93%, ou seja, um ótimo grau de eficiência de remoção de matéria orgânica, a concentração de sólidos suspensos voláteis afluente e efluente, não sofreram alterações significativas, mas houve uma diminuição da concentração dos sólidos suspensos voláteis dentro do reator (SSVR), mas que não acarretou em perda da eficiência global ou em um desequilíbrio do mesmo. A diminuição dos SSVR no meio líquido pode ser explicada devido talvez com a aderência ao material suporte que ocorreu de forma lenta, como mencionado anteriormente.

É importante ressaltar que, segundo COLLERAN et al.(1991), os sólidos suspensos voláteis, embora de fácil execução, fornecem apenas uma indicação da quantidade de biomassa dentro do reator, pois o método não permite fazer a distinção entre a biomassa microbiológica e qualquer outro material orgânico particulado da amostra ensaiada, nem tão pouco fornece a indicação sobre a atividade das bactérias presentes.

Cabe aqui salientar, que a metodologia do teste de NMP segundo MILLER & WOLIN apud GIAJ-LEVRA (1991), demonstra que se deve fazer as leituras da concentração de metano nos frascos incubados após 15 e 30 dias, sendo que se utiliza os dados de 30 dias como resposta do teste, mas resolveu-se fazer também leituras com 60 dias de inoculação afim de confirmar as leituras de 30 dias.

Na TABELA 15 apresentam-se os resultados finais relativos ao teste de contagem de bactérias anaeróbias estritas no biofilme aderido ao material suporte e nos grânulos e flocos do reator anaeróbio, mostrando as leituras de 30 e 60 dias após a data de inoculação.



TABELA 15 - Resultado das contagens bacterianas, referentes as inoculações dos grânulos e do biofilme aderido ao material suporte, com leituras de 30 e 60 dias após as datas de inoculações .

Tempo Amostra (Dias)	30 dias		60 dias	
	GRÂNULO Log (NMP.mL ⁻¹)	BIOFILME Log (NMP.mL ⁻¹)	GRÂNULO Log (NMP.mL ⁻¹)	BIOFILME Log (NMP.mL ⁻¹)
130	7,32	8,17	8,66	8,32
145	6,96	7,96	8,18	10,04
149	8,66	5,87	8,66	5,63
180	9,37	8,96	9,37	10,38
194	5,59	5,59	6,08	6,07
219	7,08	6,17	7,18	9,32
Média	8,67	8,28	8,75	9,79

Pode-se notar que na TABELA 15 houve um acréscimo nos valores de bactérias metanogênicas após 60 dias de incubação para os de 30 dias, este acréscimo ocorreu tanto para o biofilme formado quanto para os grânulos e flocos, isto talvez possa ter acontecido, pois nas diluições mais altas (-6) e (-7) com quantidades inferior de microrganismos, pode ter havido uma demora maior na resposta do microrganismo ao meio em que foi inoculado, o que influenciou diretamente na degradação do meio e portanto na produção de metano e conseqüentemente na resposta do teste.

Na TABELA 15 pode-se observar os resultados das contagens bacterianas referentes aos dias 130° e 145° dias de operação do reator e demonstram que o biofilme aderido ao material, contém um número maior de células metanogênicas que a dos grânulos formados. É importante visualizar que houve uma diminuição da quantidade de células viáveis nos grânulos e no biofilme, o que pode denotar algum fator limitante no interior do reator. No 149° dia de operação, nota-se que os grânulos foram mais ativos e tiveram um crescimento mas rapido que o biofilme aderido.

No 180° dia de operação, constatou-se que os grânulos são mais ativos que o biofilme aderido, pode-se destacar também que o número de células metanogênicas viáveis relativas ao biofilme aderido cresceu consideravelmente, denotando uma recuperação em função do 149° dia de operação.

No 194° dia de operação houve uma queda na quantidade de bactérias metanogênicas viáveis, nos grânulos e no biofilme aderido, o que pode ter sido ocasionado devido a queda da concentração de DQO afluente, como pode ser observado na TABELA 14. No 219° dia de operação nota-se um incremento do número de células metanogênicas nos grânulos, e um incremento menor no biofilme.

Portanto pode-se concluir que o biofilme aderido ao meio suporte tem aproximadamente o mesmo número de bactérias metanogênicas acetoclásticas, sendo mais sensível a variações de carga orgânica e respondendo de forma mais lenta sua recuperação que os grânulos formados dentro do reator.

Apesar do reator estar operando com regime de equilíbrio hidrodinâmico aparente, pode-se notar ainda que, não deve ter ocorrido a estabilidade microbiana, ou seja, a constância do número de bactérias metanogênicas, que deverá ocorrer possivelmente com o passar do tempo, quando as linhas de tendências de acréscimo, no caso dos grânulos e flocos, e de decréscimo, no caso do biofilme aderido ao material suporte tornarem-se constantes. Ressalvando-se que o afluente bruto deverá permanecer com as mesmas características físicas e químicas.

4.7.1 Exames microscópicos das morfologias predominantes no material suporte e grânulos durante a contagem bacteriana

Após a leitura da concentração de metano referente a 60 dias de inoculações, foram efetuadas exames microscópicos, utilizando microscopia

comum, de contraste de fase e a de fluorescência, em todos os frascos do teste de contagem bacteriana.

Nas FIGURAS 35, 36 e 37 podem-se observar algumas fotomicrografias que foram realizadas, possibilitando a visualização dos tipos morfológicos predominantes.

Na FIGURA 35.A observa-se a fotomicrografia da 1^o contagem bacteriana, (130 dias de operação do reator), amostra de grânulo, diluição de 10^{-3} , pode-se observar as morfologias de cocos fluorescentes e bacilos. Na parte inferior esquerda, nota-se uma estrutura celular que se parece morfológicamente a *Methanothrix sp.* Na FIGURA 35.B observa-se a fotomicrografia da 1^o contagem bacteriana, (130 dias de operação do reator) amostra de grânulo, diluição de 10^{-3} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias semelhantes a *Methanosarcina sp.*, pois são fluorescentes. Na FIGURA 35.C observa-se a fotomicrografia da 1^o contagem bacteriana, (130 dias de operação do reator), amostra de biofilme aderido, diluição de 10^{-3} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias semelhantes a *Methanosarcina sp.*, pois são fluorescentes, como observado na FIGURA 35.B. Na FIGURA 35.D observa-se a fotomicrografia da 1^o contagem bacteriana, (130 dias de operação do reator) inoculada com amostra de biofilme aderido, diluição de 10^{-4} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias semelhantes a *Methanothrix sp.* Na FIGURA 35.E observa-se a fotomicrografia da 1^o contagem bacteriana, (130 dias de operação do reator), amostra de biofilme aderido, diluição de 10^{-6} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias de cocos não fluorescentes, o que pode ter sido ocasionado pelo tempo de incubação (60 dias), e por ser em uma diluição mais alta. Na FIGURA 35.F observa-se a fotomicrografia da 2^o contagem bacteriana, (145 dias de operação do reator), amostra de grânulo, diluição de 10^{-2} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias semelhantes a *Methanothrix sp.*

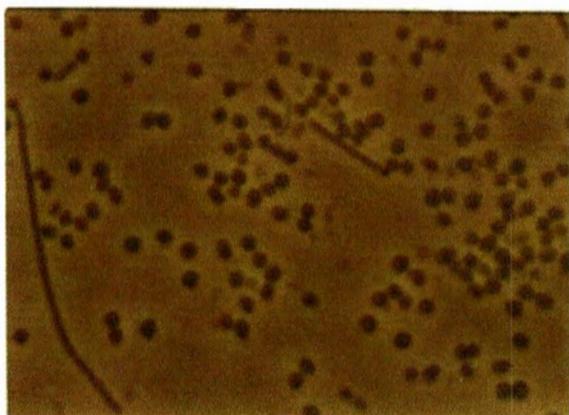


FIGURA 35.A

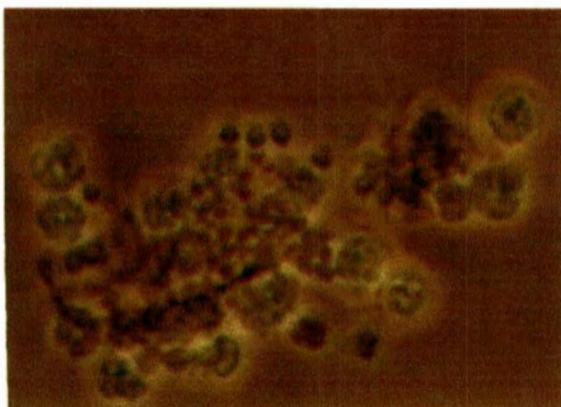


FIGURA 35.B



FIGURA 35.C



FIGURA 35.D

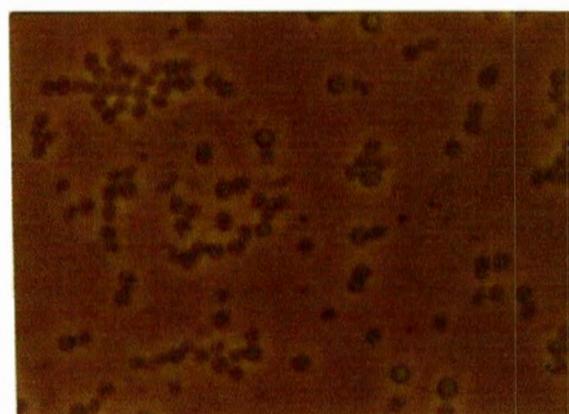


FIGURA 35.E

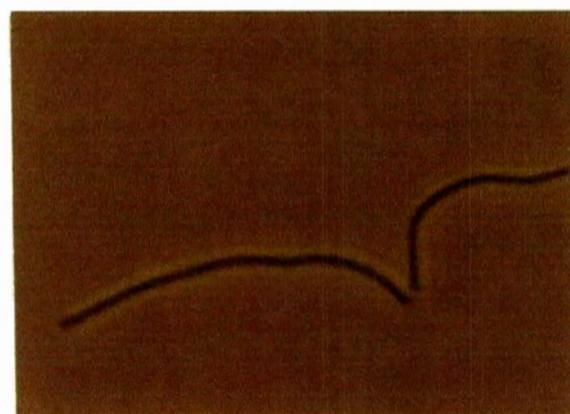


FIGURA 35.F

FIGURA 35 - Acompanhamento microscópico das análises de contagem bacteriana, referentes aos grânulos, (A), (B), (F) e o biofilme aderido, (c), (D), (E). Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25, ou seja, uma barra de 1cm \cong 8 μ m.

Na FIGURA 36.A observa-se a fotomicrografia da 3^o contagem bacteriana, (149 dias de operação do reator), amostra de biofilme aderido, diluição de 10^{-6} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias de *Methanothrix sp*, semelhantes àsquelas da FIGURA 35.D referente a amostra de biofilme aderido, diluição de 10^{-4} . Na FIGURA 36.B observa-se a fotomicrografia da 4^o contagem bacteriana, (180 dias de operação do reator), amostra de grânulo, diluição de 10^{-2} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias semelhantes a *Methanothrix sp*. Na FIGURA 36.C observa-se a fotomicrografia da 4^o contagem bacteriana, (180 dias de operação do reator), amostra de grânulo na diluição de 10^{-2} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias de cocos e bacilos curvos, sendo estes, bacilos curvos, semelhantes aos vibrios o que podem ser as bactérias redutoras de sulfato. Na FIGURA 36.D observa-se a fotomicrografia da 4^o contagem bacteriana, (180 dias de operação do reator), amostra de grânulo, diluição de 10^{-3} , nota-se a presença de estruturas celulares sem identificação, que são semelhantes a FIGURA 33.D só que utilizando a microscopia de varredura eletrônica. Na FIGURA 36.E observa-se a fotomicrografia da 4^o contagem bacteriana, (180 dias de operação do reator), amostra de biofilme aderido, diluição de 10^{-4} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologia semelhantes a *Methanothrix sp*. Na FIGURA 36.F observa-se a fotomicrografia da 5^o contagem bacteriana, (194 dias de operação do reator), amostra de grânulo, diluição de 10^{-4} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias de cocos fluorescentes.



FIGURA 36.A



FIGURA 36.B

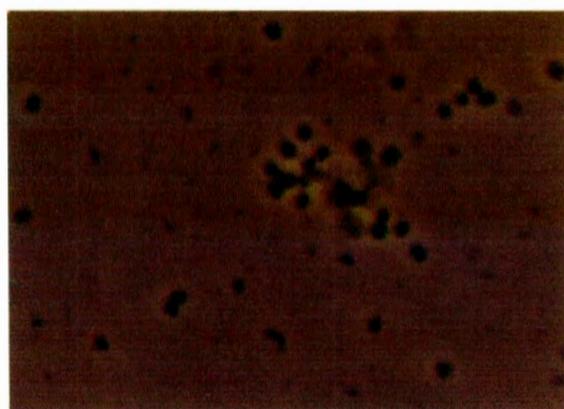


FIGURA 36.C

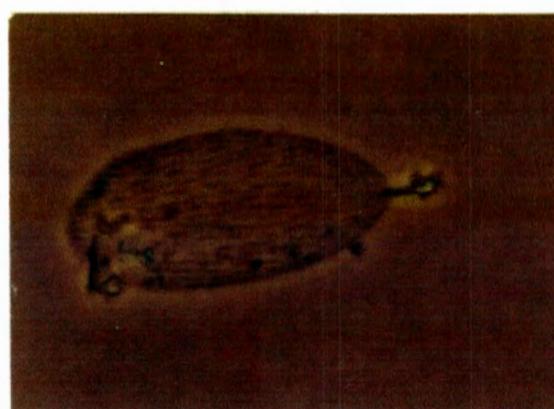


FIGURA 36.D

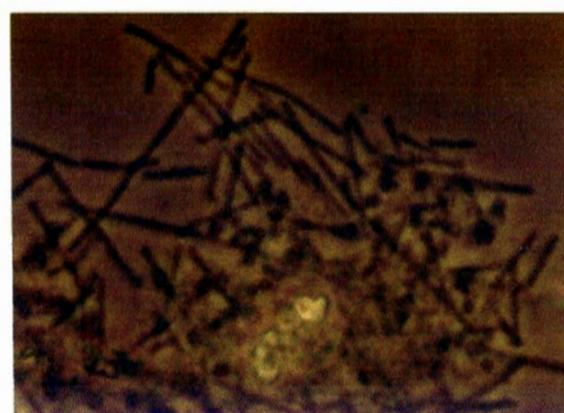


FIGURA 36.E

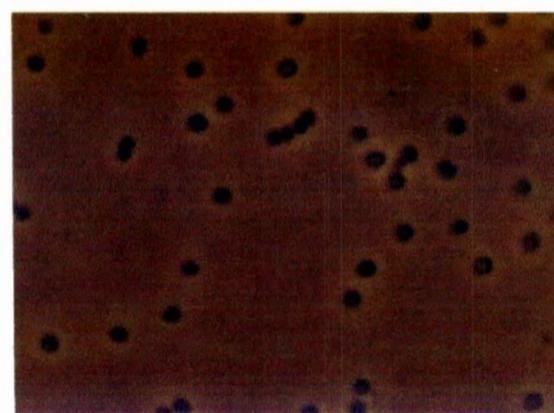


FIGURA 36.F

FIGURA 36 - Acompanhamento microscópico das análises de contagem bacteriana, referentes aos grânulos, (B), (C), (D), (F) e o biofilme aderido, (A), (E). Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25, ou seja, uma barra de 1cm \cong 8 μ m

Na FIGURA 37.A observa-se a fotomicrografia da 4^o contagem bacteriana, (180 dias de operação do reator), amostra de biofilme, diluição de 10^{-2} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias bastantes específicas de cocos e bacilos, sendo estes últimos, com morfologias semelhantes a *Methanothrix* sp. Na FIGURA 37.B observa-se a fotomicrografia da 5^o contagem bacteriana, (194 dias de operação do reator), amostra de grânulo, diluição de 10^{-6} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias de cocos fluorescentes. Na FIGURA 37.C observa-se a fotomicrografia da 5^o contagem bacteriana, (194 dias de operação do reator) amostra de biofilme, diluição de 10^{-4} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias semelhantes a *Methanosarcina* sp ,pois são fluorescentes, como observado na FIGURA 34.B e Na FIGURA 34.C. Na FIGURA 37.D observa-se a fotomicrografia da 5^o contagem bacteriana, (194 dias de operação do reator), amostra de biofilme, diluição de 10^{-4} , nota-se a presença de estruturas celulares com morfologias de cocos fluorescentes.

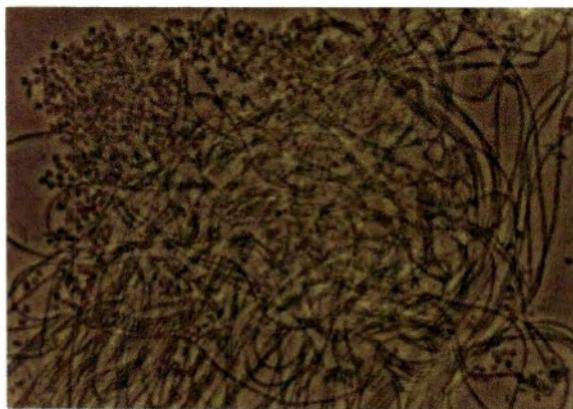


FIGURA 37.A

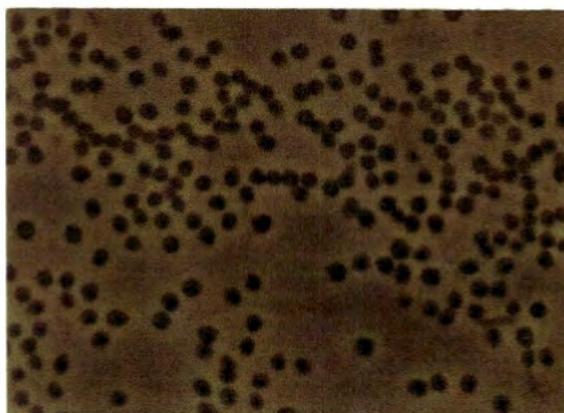


FIGURA 37.B



FIGURA 37.C

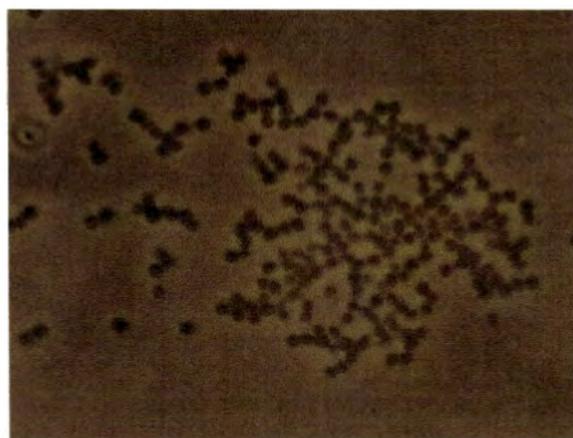


FIGURA 37.D

FIGURA 37 - Acompanhamento microscópico das análises de contagem bacteriana, referentes aos grânulos, (B) e o biofilme aderido, (A), (C), (D), Objetiva 100, Ocular 10, Zoom 1,25, ou seja, uma barra de 1cm \cong 8 μ m.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através do teste de hidrodinâmica do reator, do acompanhamento do mesmo, dos aspectos microbiológicos, das contagens bacterianas por um período de 244 dias, realizado em um filtro biológico anaeróbico de filme fixo e material suporte em PVC permitem concluir que:

Referentes ao teste de hidrodinâmica de reator pode-se concluir que os modelos teóricos de N-CSTR em série e de pequena dispersão foram ajustados aos dados experimentais, obtendo-se um valor de 3 para N e 0,17 para o coeficiente de dispersão (D/UL). Esses valores permitem representar o reator como aproximadamente 3 reatores de mistura completa em série. Este valor de N e o elevado valor do coeficiente de dispersão (0,17) indicam uma grande dispersão longitudinal e elevado grau de mistura.

O tempo de detenção hidráulico real obtido através da curva resposta foi de 33 horas. Portanto, um atraso na resposta de 9 horas foi observado uma vez que o TDH esperado era de 24 horas. O atraso na resposta pode indicar a existência de zonas mortas hidrodinâmicas no interior do reator. O traçador teria difundido nestas zonas e liberado aos poucos provocando atraso na resposta e gerando uma enorme "cauda" como observado. Entretanto, o atraso observado e a enorme "cauda" podem ter ocorrido devido a interação traçador/recheio.

A análise da curva modificada permitiu verificar que o TDH real, o parâmetros N do modelo de N-CSTR em série e o parâmetro (D/UL) do modelo de pequena dispersão não foram modificados significativamente quando comparados com os obtidos pela análise da curva original. Portanto, pode-se concluir que a interação traçador/suporte não causou interferência significativa na curva resposta experimental. Segundo a metodologia apresentada por CABRAL (1995).

O reator foi operado e monitorado durante um período de 244 dias, sendo dividido em 2 etapas: a primeira (Etapa I) correspondeu da partida do reator até o 122º dia de operação, quando foi submetido a uma carga orgânica volumétrica (COV) média de 0,48 Kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ e um tempo de detenção hidráulico teórico (TDH) médio de 23,12 horas, alcançando uma eficiência média em termos de DQO de 82 ± 7 % . A segunda etapa (Etapa II) ocorreu do 122º até o 244º dia de operação, quando o reator foi acrescido de carga orgânica volumétrica e atingiu 0,75 Kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ e com um tempo de detenção hidráulico teórico (TDH) médio de 23,12 horas e com estes parâmetros o reator alcançou uma eficiência média em termos de DQO de 86 ± 7 % .

Sobre os parâmetros de estabilidade do processo, entende-se que o reator não foi submetido a variação significativa de pH, de alcalinidade total e de ácidos voláteis a ponto de comprometer seu desempenho ou ocasionar a instabilidade do processo, que na digestão anaeróbia ocorre quando há predominância da fermentação ácida sobre a fermentação metanogênica, refletindo-se em variações de parâmetros como pH, ácidos voláteis e alcalinidade.

Pode-se notar que a concentração de sólidos suspensos voláteis estabilizou-se no 82º dia de operação do reator, Etapa I, isto pode denotar a possível aderência dos microrganismos ao material suporte, no caso o

PVC. Esta aderência ocorreu de forma lenta, o que pode ter ocasionado a demora na estabilização do reator, devido principalmente ao tipo de material suporte utilizado. Após a estabilização, o reator operou com uma eficiência de remoção em termos de concentração de sólidos suspensos voláteis de $87 \pm 8\%$.

É importante salientar, que a instabilidade da concentração de sólidos suspensos voláteis no reator não influenciou na operação do sistema como um todo, pois neste período não houve redução da eficiência de remoção de matéria orgânica expressa em concentração de DQO como mostra a FIGURA 23 e 24 .

Pode-se concluir que os perfis de concentrações ao longo do reator ajudaram a comprovar os dados do teste de hidrodinâmica, em que o reator se comportara como mistura completa, imediatamente após a entrada do afluente, ocorre a mistura em todo seu volume e conseqüentemente a concentração deverá permanecer a mesma por toda a extensão do reator. Como pode ser observado nas FIGURAS 29 e 30.

O reator foi acompanhado em sua operação, por microscopia de campo claro, de contraste de fase, de fluorescência, verificando-se as seguintes morfologias predominantes: Nas amostras de grânulos foram encontrados cocobacilos; bacilos em pares; bacilos curvos; víbrios; bactérias cujo morfologia assemelham-se ao gênero *Desulfomaculum* sp , bactérias cuja a morfologia assemelham-se ao gênero *Methanothrix* sp, Nas amostras de biofilme aderido ao material suporte de PVC, foram visualizados bacilos curtos, bacilos fluorescentes, bacilos curvos, víbrios, cocos, bactérias cuja morfologia assemelhou-se ao gênero *Methanosarcina* sp, bem como bactérias cuja a morfologia assemelhou-se ao gênero *Methanothrix* sp; e no material em suspensão, verificaram-se as bacilos livres; bacilos fluorescentes; bacilos curvos; bacilos em pares; víbrios;

cocos; bactérias esporuladas; bactérias cuja morfologia assemelham-se ao gênero *Desulfomaculum* sp, bactérias cuja morfologias assemelham-se ao gênero *Methanothrix* sp, e portanto pode concluir-se que, as amostras apresentaram, de maneira geral, as mesmas morfologias predominantes.

Com relação ao crescimento do biofilme aderido ao material suporte, PVC, sendo realizado em três alturas diferentes, conclui-se que as três alturas apresentaram um crescimento similar, ou seja, o crescimento foi homogêneo nas três diferentes alturas estudadas, o que era esperado ao correlacionar-se esses resultados com aqueles obtidos no teste de hidrodinâmica do reator e no teste de perfil do reator.

Pode-se concluir, também que o aumento da carga orgânica volumétrica no 122^o dia de operação do reator, não influenciou significativamente no crescimento do biofilme, que pode se explicado pelo fato de ser um pequeno incremento de 0,48 Kg DQO.m⁻³.d⁻¹ para 0,75 Kg DQO.m⁻³.d⁻¹, concomitantemente ao fato da dificuldade de aderência microbiana no material suporte.

Pode-se concluir, com auxílio da microscopia de varredura eletrônica, em análises referentes ao acompanhamento do biofilme formado e dos grânulos e flocos em suspensão, que foram observados basicamente, morfologias de cocos, bacilos, bactérias do gênero *Methanothrix* sp e a *Methanosarcina* sp, nos dois suportes e nas duas épocas de análise, com 4 meses e 8 meses de operação do reator.

Confrontando-se os resultados apresentados no item 5.5 referentes ao acompanhamento microscópico do reator utilizando microscopia comum, de contraste de fase e de fluorescência com os apresentados (item 5.6.2) referentes a microscopia de varredura eletrônica pode-se concluir que tanto nos grânulos quanto no biofilme aderido ao material suporte apresentam de

maneira geral basicamente as mesmas morfologias bacterianas predominantes.

Com relação a contagem de bactérias metanogênicas através da metodologia do NMP, pode-se concluir que o biofilme aderido ao meio suporte tem aproximadamente o mesmo número de bactérias metanogênicas acetoclásticas, sendo mais sensível a variações de carga orgânica e respondendo de forma mais lenta sua recuperação que os grânulos formados dentro do reator. É importante ressaltar que foi visualizado ao microscópico as mesmas morfologias que o ensaio da microscopia no reator.

6. RECOMENDAÇÕES

As principais recomendações deste trabalho são:

- Sugere-se, utilizar uma carga orgânica volumétrica mais alta para observar o desenvolvimento do biofilme aderido ao material suporte, diminuindo-se o tempo de detenção hidráulico e verificando seus efeitos no desempenho do reator e sempre que possível acompanhar o reator com exames microscópicos e análise das morfologias predominantes;
- Recomenda-se estudar um outro meio suporte com características físicas e químicas mais apropriadas para o desenvolvimento do biofilme aderido;
- Sugere-se melhorar o sistema de coleta de gás com intuito de se diminuir as perdas de coleta de gás;
- Aconselha-se fazer estudos sobre a degradação do substrato no próprio recipiente de alimentação, autoclavando-o ou resfriando-o, para tentar minimizar este efeito de degradação;
- Recomenda-se fazer novos ensaios de perfis de concentrações tentando diminuir-se as alturas de coletas iniciais;
- Sugere-se repetir o ensaio hidrodinâmico do reator, mas fazendo este com o reator operando normalmente.
- Recomenda-se fazer novos estudos relativos a contagem bacteriana com intuito de quantificar e identificar as principais morfologias microbianas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA;AWWA;WPFC. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th edition, 662-677.
- ARAÚJO, J.C. (1995). *Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético*. São Carlos. 158p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ATLAS,R.S. & BARTHA,R. (1981). Determination of microbial, biomass and activities. In: *Microbial ecology - fundamentals and application*, p.81-132.
- BALCH,W.E.; FOX,G.E.; MAGRUM,J.L.; WOESE,C.R.; WOLFE,R.S. (1979). Methanogens: Reevaluation of Unique Biological Group. *Microbiology Reviews*,v.43, p.260-96.
- BATTERSBY,N.S.;STEWART,D.J.;SHARMA,A.P. (1985). A simple most probable number method for enumeration of sulphate-reducing bacteria in biocide contamin waters. *Journal of Applied Bacteriology*,v.58,p.425-429.
- BELKHADIR,R.; CAPDEVILLE,B; ROQUES,H. (1988). Etude descriptive fondamentale et modelisation de la croissance d'un film biologique - I. Etude descriptive fondamentale de la croissance d'un film biologique. *Water Resarch*,v.22,n.1 p. 59-69.
- BELKHADIR,R.; CAPDEVILLE,B; ROQUES,H. (1988b). Etude descriptive fondamentale et modelisation de la croissance d'un film biologique - II. Nouveau concept de modelisation de la croissance d'un film biologique. *Water Resarch*, v.22,n.1,p.70 - 77.
- BROCK, T.D. & MANDIGAN, M.T. (1988). *Biology of Microorganisms*. 5.ed. New Jersey, Prentice-Hall, p. 657-82.
- BRYANT,M.P & WOLIN, M.J. (1973). Methanogenic bacteria and their interactions. Seminar of Role of Bacteria in Producing Non-polluting Fuel-73rd In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, 73rd, Florida, p.17.
- BRYANT,M.P. (1972).Commentary on the Hungate technique for the culture of anaerobic bacteria. *The Americam Journal of Clinical Nutrition*, v.25,p.1324-8.
- BRYANT,M.P.; TZENG, S.F.; ROBINSON, I.M.; JOYNER Jr.,A.E. (1971). Nutrient requirements of methanogenic bacteria. *Adv. Chem. Ser.* v.105, p.23-39,.
- BRYERS, J.D. (1988). " Modeling biofilm accumulation." In: BAZIN, M.J. & DROSSER, J.I. ed. *Physiological Models in Microbiology*, v.2, Séries in mathematical models in microbiology, Boca Raton, Florida, CRC Press, p.109 - 144.

- CABRAL, A . K. A . (1995). *Caracterização hidrodinâmica de um reator horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 86p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- CAMPOS, J. R. (1990). "Proyecto y Operacion de Filtros Anaerobios para Tratamiento de Efluentes Liquidos Industriales" In: I TALLER REGIONAL Y CONFERENCIA SOBRE TRATAMIENTO ANAERÓBIO DE ÁGUAS RESÍDUAIS EM AMÉRICA LATINA. Mexico, 6-9 nov.
- CAMPOS, J.R. (1994).Um estudo sobre reatores anaeróbios de leito expandido. In: II. TALLER REGIONAL SOBRE TRATAMIENTO ANAERÓBIO DE ÁGUAS RESIDUALES EN AMERICA LATINA, Habana, 20-22 nov.
- CARVALHO, E. H. (1994). *Filtros Biológicos Anaeróbios: Conceitos Básicos, Projeto e Desenvolvimento*. São Carlos. 280p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- CHIANG,C.F. & DAGUE,R.R. (1992).Effects of reactor configuration and biomass activity on the performance of upflow static media anaerobic reactor. *Water Environmental Resarch*, v.64, n.2, p.141-149.
- DALTRO, J. F. (1988). *Desempenho de filtro anaeróbio no tratamento de esgotos sanitários. efeito da altura do filtro e da toxicidade por cobre*. São Carlos. 287p. 2v. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- de ZEEUW, W. (1987).Granular sludge in UASB reactors In: GASMAT WORKSHOP, Lunteren, The Netherlands, Proceedings. 132-145.
- DEL NERY,V. (1993). *Digestão anaeróbia em duas fases com culturas mistas acidogênicas e metanogênicas imobilizadas separadamente em gel agar*. São Carlos. 320 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DI LALLO,R & ALBERTISON, O. E. (1961). Volatile acids by direct filtration. *Journal Water Control Federation*,v.33(4),p.356-365.
- DOLFING, J. (1987). *Microbiological aspects of granular methanogenic sludge*. Wageningen, The Netherlands, 74p, (pH.D Thesis) - .Agricultural University of Wageningen,.
- DUBOURGUIER, H.C. et al. (1985). Granular methanogenic sludge: microbial and structural analysis. In: 3 th, INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMASS. Venice, Italy, p.542-546.
- DUBOURGUIER, H.C. et al. (1987). Structure and microbial activities of granular anaerobic sludge In: GASMAT WORKSHOP, Lunteren, The Netherlands, Proceedings. p.18-33.
- DUBOURGUIER, H.C.(1987b). Curso Ecologia da Digestão anaeróbia. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, São Paulo.

- FORESTI, E. (1994). Fundamentos do Processo de Digestão Anaeróbia. Notas de Aula (EESC - USP) 15p.
- GIAJ-LEVRA, L.A. (1991) *Estudo de metodologia de contagem para bactéria anaeróbia celulolíticas*. São Carlos. 140p. Dissertação (mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- GROTEHUIS, J.T.C.; SMIT, M.; PLUGGE, C.M.; YUANSHENG, X.; van LAMMEREM, A.A.M.; STAMS, A.J.M.; ZEHNDER, A.J.B. (1991). Bacterial composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.1942-1949.
- GUIMARAES, H. G. D. (1990). *Avaliação do desempenho de filtro anaeróbio no tratamento dos efluentes líquidos de uma indústria de refrigerantes*. São Carlos. 165p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- GUIOT, S.R.; PAUSS, A.; COSTERTON, W.J. (1991). A structure model of the anaerobic granule consortium In: 6TH. INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION. Paper Preprints CETESB, IPT, SABESP e IAWPRC, São Paulo, p.1-10,
- HENZE, M ; HARREMÕES, P. (1983). "Anaerobic Treatment of Wasterwater in Fixed Film Reactors - A Literature Review. In: Henze, M (ed) , ANAEROBIC TREATMENT OF WASTERWATER IN FIXED FILM REACTORS. Oxford, Pergamom Press. *Water Science Technology*, v.15, n.8/9, p. 01 - 101
- HULSHOFF POL, L.W. (1989) The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. Wageningen, The Netherlands.120p. (Doctoral Thesis) - Agricultural University of Wageningen.
- HULSHOFF POL, L.W.; DE ZEEUW, W.J.; VELZEBOER, C.T.M.; LETTINGA, G. (1983). Granulation in UASB - reactors In: HENZE, M. ed Anaerobic treatment of wastewater in fixewd film reactors. Oxford: Pergamon Press. (*Water Science and Technolgy*, v.15, n.8/9 p.291-304).
- HUNGATE, R.E (1982). The microbiology of biodigestion. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA. São Paulo. p 91.
- HUNGATE, R.E. (1969). A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: METHODS in microbiology. Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons, New York, New York: Academic, . v.38, p117-132.
- JHUNG, J.K. & CHOI, (1995). Acomparative study of UASB and anaerobic fixed film reactors with development of sludge granulation. *Water Resarch*, v.29, n.1, p. 271-277.
- KENNEDY, K. J. & DROSTE R.L, (1987). "Steady State Kinects of Anaerobic Downflow Stationary Fixed Films Reactors " *Water Sciense and Technology*, v.19, p. 275 - 283.

- KENNEDY, K. J. & DROSTE R.L. (1986). Anaerobic fixed-film reactors treating carbohydrate wastewater. *Water Research*, v.20,n. 6, p.685 - 695.
- LEVENSPIEL, O. (1974). Engenharia das Reações Químicas. Ed Edgard Blucher. v2, cap 9, p 207-259.
- LJUNGDAHL, L. & WIEGEL, J. (1986). Working with anaerobic bacteria. In: Manual of Industrial Microbiology & Biotrchnology. Eds. A.L. Demain e N.A. Solomon, Washington, American Society Microbiology, . p 84-96.
- MAH,R.A.;SMITH,M.R. (1981). The methanogenic bacteria. In: The Prokaryotes. Eds M.P.Starr, H.Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel. Heidelberg, Springer-Verlag, p.948-77.
- MAH,R.A.;SMITH,M.R.;BARESI,L. (1978).Studies on an acetate-fermenting strain of Methanosarcina. *Applied and Environmental Microbiology*,v.35, p.1174-1184.
- McINERNEY,M.J. & BRYANT, M.P. (1981). Review of methane fermentation fundamentais. In: Fuel gas production from biomass. Ed D.L. Wise, West Palm Beach, p. 19-47.
- MOSEY, F. E. (1983). "Mathematical Modeling of Process: Regulatory Mechanisms for Formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science Technology*, v.15,p. 209-232.
- NOVAES, R.F.V.(1986). "Microbiology of Anaerobic Digestion" *Water Science and Technology*, v.18,p.1-14.
- OBISPO,N.E. & DEHORITY,B. A . (1992). A most probable number method for enumeration of rumen fungi with studies on factor affecting their concentration in the rumen. *Journal of Microbiology Methods*,v.16, p.259-270.
- OREMLAND, R.S. Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In: *Biology of Anaerobic Microorganiss*. Ed. A.J.B. Zehnder, Wageningen, Jonh Wiley & Sons, 1988 p. 641-706.
- PIRES,E.C. (1990). Hidrodinâmica de reatores. São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, Apostila.
- ROBINSON,R.W. et al. (1984).Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed bed reactors. *Applied and Environmental Microbiology*,v.48,n.1,p. 127-136.
- SANCHEZ,J.M.; ARIJO,S.; MUÑOZ,M.A.; MORIÑIGO,M.A.; BARREGO,J.J. (1984). Microbial colonization of different support materials used to enhance the metanogenic process. *Applied Microbiology Biotechnology*,v.41, p.480-486.

- SOUSA, J. T. de (1996). *Pós tratamento de efluentes de reator anaeróbio de fluxo ascendente em reator aeróbio seqüencial em batelada e coluna de lodo anaeróbio para desnitrificação* São Carlos. 258p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- SPEECE, R. E. (1983). "Review - Environmental Requirements for Anaerobic Digestion of Biomass " In : Advances in Solar Energy - an Annual Review of Reserch and development. Environmental Studies Institute, Drexel University, Philadelphia, 70p.
- TÉRAN, F.J.C. (1995). *Tratamento de esgoto sanitário empregando reator anaeróbio de leito fluidificado.* São Carlos. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- TORRES, P. (1992). *Desempenho de um Reator Anaeróbio de Manta de Lodo (UASB) de Bancada no Tratamento de Substrato Sintético Simulando Esgoto Sanitário.* São Carlos. 185p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- Van den BERG, L & KENNEDY, K.J. (1981). Support materials for stationary fixed film reactors for high-rate methanogenic Fermentations *Biotechnology Letters*, v.3,n.4,p.165-170.
- van den BERG, L & LENTZ, C.P. (1979). Comparison Between Up and Downflow Anaerobic Fixed Film Reactors of Varying Surface-to-Volume Ratios for the Treatment of Bean Blanching Waste. In: Proc.34 th Industrial Waste Conference, Purdue University, Lafayette, Indiana. Ann Arbor Science, Ann Arbor Michigan, p319-325.
- VAZOLLER R.F. (1989). *Estudos sobre isolamento, caracterização e crescimento de culturas puras de bactérias metanogênicas provenientes de biodigestores de lodo de esgoto.* São Paulo. 145p. Dissertação (mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- VAZOLLER R.F (1989b) In: Manual Técnico do Curso de Ecologia da Digestão Anaeróbia. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo CETESB , São Paulo, Brasil, 100-107,.
- VAZOLLER, R.F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas.* São Carlos. 259p. Tese (doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VERRIER, D.; MORTIER, B.; DUBOURGUIER, H.C.; ALBAGNAC, G. (1988). Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilms. In: HALL, E.R.; HOBSON, P.N. eds. Anaerobic digestion 1988, 5th international symposium on anaerobic digestion. Pergamon Press,

- VIEIRA, M.B.S. (1989). *Avaliação do desempenho de um reator anaeróbio de leito fluidificado piloto no tratamento de efluentes líquidos apresentando baixa concentração de DQO*. São Carlos. 276p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- WU, W. et al. (1996). Formation of fatty acid-degrading, anaerobic granules by defined species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.6, p.2037-2044.
- YOUNG, H.W. & YOUNG, J.C. (1988). Hydraulic behavior of upflow anaerobic filters *Journal of Environmental Engineering ASCE*, v.114, n.3, p.621-638.
- YOUNG, J.C. (1990). "Factors affecting the design and performance of upflow anaerobic filters." Fayetteville: Univ. of Arkansas, 33p. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE DESENVOLVIMENTO DE REATORES ANAERÓBIOS. São Carlos,
- YOUNG, J.C. & McCARTY, P.L. (1969). The anaerobic filter for waste treatment. *Journal Water Pollution Control Federation*, v.41, n.5, p.160-173.
- YOUNG, J.C.; DAHAB, M.F. (1983). Effect of media design on the performance of fixed-bed anaerobic reactors. In: HENZE, M. ed Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors. Oxford: Pergamon Press, 369-383. (*Water Science and Technology*, v.15, n. 8/9).
- ZEIKUS, J.G. & WINFREY, M. (1976). Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.31, p.99-107.
- ZEIKUS, J.G. (1977). The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews*, v.41, p.514-541.
- ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, p. 796-807.

ANEXOS

TABELA 16- Valores de pH , alcalinidade total e de ácidos voláteis referentes as análises realizadas na etapa I

Dias	pH - AFL	pH - EFL	ALC-AFL	ALC-EFL	AV-AFL	AV-EFL
1	7,2	7,0	296,7	358,8	69,92	26,22
2	7,3	7,2	282,9	365,7	65,55	17,48
3	7,4	7,2	289,8	365,7	69,92	13,11
4	7,4	7,2	295,0	372,6	61,18	8,74
5	7,5	7,3	317,4	379,5	61,18	13,11
8	7,4	7,3	358,8	414,0	74,29	21,85
9	7,5	7,5	310,5	365,7	65,55	17,48
10	7,5	7,4	276,0	345,0	69,92	26,22
11	7,4	7,3	372,6	400,2	61,18	13,11
31	7,3	7,1	393,3	420,9	65,55	17,48
33	7,2	7,0	386,4	414,0	69,92	13,11
36	7,3	7,2	379,5	414,0	61,18	8,74
38	7,0	7,0	372,6	400,2	61,18	13,11
40	7,3	7,0	379,5	407,1	74,29	21,85
43	7,8	7,6	345,0	372,6	65,55	17,48
45	7,2	7,2	317,4	372,6	69,92	26,22
47	7,4	7,0	303,6	379,5	65,55	17,48
50	7,8	7,3	317,4	386,4	69,92	13,11
52	7,3	7,1	324,3	372,6	61,18	8,74
54	7,4	7,1	296,7	358,8	61,18	13,11
57	6,9	7,0	282,9	365,7	74,29	21,85
59	7,2	7,2	289,8	365,7	65,55	17,48
61	7,7	7,3	227,7	372,6	69,92	26,22
64	7,2	7,0	213,9	379,5	61,18	13,11
66	7,2	7,3	358,8	414,0	65,55	17,48
68	7,3	6,9	310,5	365,7	69,92	13,11
71	7,1	7,3	276,0	345,0	74,29	13,11
73	6,5	6,6	213,9	345,0	65,55	17,48
75	6,9	7,2	207,0	365,7	69,92	26,22
78	6,3	6,9	331,2	345,0	61,18	13,11
80	7,0	7,3	324,3	358,8	65,55	17,48
82	7,0	7,2	289,8	358,8	69,92	13,11
85	7,1	7,1	331,2	420,9	74,29	13,11
87	7,2	7,3	289,8	393,3	81,2	17,4
89	6,8	7,1	276,0	345,0	87,4	13,11
92	7,6	7,4	331,2	400,2	43,7	13,11
94	7,3	7,1	317,4	345,0	43,7	21,85
96	7,0	7,2	282,9	296,7	39,33	17,48
99	6,8	7,0	324,3	358,8	65,55	21,85
101	6,9	7,0	179,4	220,8	113,62	17,48
103	7,0	7,1	241,5	324,3	91,77	13,11
106	6,8	7,0	213,9	296,7	56,81	13,11
108	7,0	7,2	241,5	345,0	61,18	21,85
110	6,9	7,1	255,3	324,3	34,96	17,48
113	6,8	7,0	276,0	351,9	69,92	21,85
115	7,0	7,1	262,2	338,1	61,18	17,48
117	7,1	7,2	241,5	303,6	52,44	13,11
120	7,2	7,2	255,3	296,7	43,7	13,11
122	7	7,1	241,5	282,9	48,07	17,48

TABELA 17- Valores de pH , alcalinidade total e de ácidos voláteis referentes as análises realizadas na etapa II

Dias	pH - AFL	pH - EFL	ALC-AFL	ALC-EFL	AV-AFL	AV-EFL
124	7,2	7,4	172,5	296,7	52,4	17,5
127	6,8	7,1	186,3	310,5	56,8	13,1
129	7,6	7,4	201,5	312,0	61,2	21,9
131	7,3	7,1	172,5	289,8	56,8	17,5
134	7,0	7,2	165,6	282,9	52,4	17,5
136	6,8	7,0	144,0	360,0	48,1	21,9
138	6,9	7,0	124,2	213,9	52,4	17,5
141	7,0	7,1	165,6	276,0	61,2	21,9
143	6,8	7,0	179,4	262,2	56,8	17,5
145	7,0	7,2	172,5	276,0	61,2	17,5
148	6,9	7,1	179,4	276,0	69,9	21,9
150	6,8	7,0	165,6	289,8	65,6	21,9
152	7,0	7,1	179,4	289,8	104,9	35,0
155	7,1	7,2	186,3	276,0	100,5	30,6
157	7,2	7,2	179,4	289,8	65,6	13,1
159	7,3	7,1	193,2	303,6	61,2	17,5
162	7,2	7,0	158,7	282,9	69,9	26,2
164	7,3	7,2	172,5	282,9	48,1	17,5
166	6,9	7,0	193,2	289,8	52,4	13,1
169	7,3	7,0	138,0	207,0	56,8	21,9
171	7,7	7,7	179,4	262,2	91,8	26,2
173	7,2	7,2	172,5	276,0	65,6	17,5
176	7,4	7,0	179,4	276,0	56,8	13,1
178	7,8	7,3	165,6	289,8	61,2	21,9
180	7,3	7,1	179,4	289,8	56,8	17,5
183	7,3	7,1	186,3	276,0	52,4	17,5
185	6,9	7,0	179,4	289,8	48,1	21,9
187	7,2	7,2	193,2	303,6	52,4	17,5
190	7,7	7,3	158,7	282,9	61,2	21,9
192	7,2	7,1	172,5	282,9	56,8	17,5
194	7,3	7,1	193,2	289,8	61,2	17,5
197	7,0	7,2	234,6	296,7	69,9	21,9
199	6,8	7,0	193,2	303,6	65,6	21,9
204	7,0	7,1	172,5	282,9	61,2	17,5
206	6,8	7,0	193,2	289,8	65,6	13,1
208	7,0	7,2	234,6	296,7	61,2	17,5
211	6,9	7,1	179,4	262,2	69,9	26,2
213	6,8	7,0	172,5	276,0	65,6	21,9
215	7,0	7,1	179,4	276,0	61,2	26,2
218	7,1	7,2	165,6	289,8	61,2	17,5
220	7,2	7,2	179,4	289,8	65,6	13,1
222	7,0	7,1	186,3	276,0	61,2	17,5
225	7,3	7,1	179,4	289,8	69,9	26,2
227	6,9	7,0	165,6	276,0	48,1	17,5
229	7,2	7,2	158,7	303,6	56,8	13,1
232	7,7	7,3	158,7	303,6	48,1	21,9
236	7,2	7,1	144,9	317,4	65,6	21,9
239	7,2	7,3	158,7	331,2	52,4	17,5
241	7,3	6,9	172,5	310,5	56,8	13,1
243	7,1	7,3	165,6	289,8	61,2	21,9
244	7,0	6,9	158,7	303,6	65,6	17,5

TABELA 18 - Valores de DQO afluente, efluente e de remoção referentes a etapa I

DIAS	DQO-AFL	DQO-EFL	%REM
1	480,28	200,10	58,34
2	441,30	180,50	59,10
3	361,73	135,00	62,68
4	435,00	85,00	80,46
5	460,00	85,40	81,43
8	396,88	60,44	84,77
9	406,00	55,70	86,28
10	420,00	80,00	80,95
11	441,30	110,00	75,07
31	480,28	132,30	72,45
33	441,30	103,25	76,60
36	361,73	94,40	73,90
38	420,08	60,44	85,61
40	365,70	85,40	76,65
43	267,61	55,47	79,27
45	280,87	62,10	77,89
47	287,50	72,04	74,94
50	367,05	80,33	78,12
52	415,00	71,30	82,82
54	231,15	67,07	70,98
57	337,22	52,15	84,53
59	345,50	57,13	83,47
61	396,88	86,96	78,09
64	423,40	57,13	86,51
66	406,82	68,73	83,11
68	378,65	91,93	75,72
71	430,03	88,61	79,39
73	400,19	75,36	81,17
75	481,40	81,99	82,97
78	448,26	90,27	79,86
80	378,65	81,99	78,35
82	526,15	68,73	86,94
85	421,74	96,90	77,02
87	541,07	85,30	84,23
89	534,44	91,93	82,80
92	668,68	81,99	87,74
94	577,53	70,38	87,81
96	352,13	60,44	82,84
99	600,73	52,15	91,32
101	x 935,52	68,73	92,65
103	327,27	93,59	71,40
106	547,70	65,41	88,06
108	705,15	83,64	88,14
110	676,97	80,33	88,13
113	797,96	115,13	85,57
115	667,03	78,67	88,21
117	531,12	57,13	89,24
120	784,70	138,33	82,37
122	476,43	68,73	85,57



TABELA 19- Valores de DQO afluente, efluente e de remoção referentes a etapa II

DIAS	DQO-AFL	DQO-EFL	% REM
124	695,20	78,67	88,68
127	522,84	86,96	83,37
129	834,42	191,37	77,07
131	580,84	90,27	84,46
134	592,45	63,75	89,24
136	630,57	101,87	83,84
138	824,47	115,13	86,04
140	748,24	110,16	85,28
141	665,37	181,43	72,73
143	554,33	86,96	84,31
145	620,62	95,24	84,65
148	1212,29	93,59	92,28
150	1080,00	103,00	90,46
152	1237,15	115,13	90,69
155	870,00	105,00	87,93
157	683,00	101,00	85,21
159	582,50	86,96	85,07
162	650,45	83,64	87,14
164	551,01	72,04	86,93
166	1245,44	80,33	93,55
169	897,40	111,82	87,54
171	585,82	86,96	85,16
173	815,92	117,21	85,64
174	826,18	67,21	91,87
176	910,79	60,79	93,33
178	659,51	122,33	81,45
180	780,05	67,50	91,35
183	780,50	67,50	91,35
185	644,50	104,00	83,86
187	554,50	136,00	75,47
190	641,56	82,59	87,13
192	758,23	68,49	90,97
194	586,00	39,00	93,34
197	305,67	80,03	73,82
199	756,30	91,00	87,97
201	730,03	132,59	81,84
204	646,69	241,56	62,65
206	741,56	210,79	71,57
208	685,15	91,56	86,64
211	749,26	100,54	86,58
213	800,54	95,41	88,08
215	742,85	78,74	89,40
218	835,00	87,50	89,52
220	732,59	76,18	89,60
222	691,56	81,31	88,24
225	759,51	63,36	91,66
227	1050,54	85,15	91,89
229	1082,59	83,87	92,25
232	939,00	77,46	91,75
234	940,28	80,03	91,49
236	771,05	76,18	90,12
239	814,64	80,03	90,18
241	595,41	171,05	71,27
243	476,18	101,82	78,62
244	572,33	92,85	83,78

TABELA 20 - Valores referentes ao crescimento do biofilme em função da área do material suporte

DIAS	BAIXO	MÉDIO	ALTO
62	95,18	96,78	101,40
100	93,46	107,85	117,90
127	138,98	125,53	138,12
152	147,04	135,86	143,03
180	174,08	146,37	125,61
219	182,74	191,29	165,18
253	218,39	177,83	210,35

TABELA 21- Valores referentes ao crescimento do biofilme em função da área do material suporte e por dia de operação

	BAIXO	MÉDIO	ALTO
62	1,54	1,56	1,64
100	1,51	1,74	1,90
127	2,24	2,02	2,23
152	2,37	2,19	2,31
180	2,81	2,36	2,03
219	2,95	3,09	2,66
253	3,52	2,87	3,39

TABELA 22 - Série dos frascos de diluições que foram utilizados para encontrar, o valor do NMP

Tempo (Dias)	Dias da Leitura	Grânulo				Suporte			
		Leitura dos Frascos				Leitura dos Frascos			
		diluição	a	b	c	diluição	a	b	c
130	30	-4	+	+	+	-65	-	+	+
		-5	+	-	+	-6	-	+	-
		-6	+	+	-	-7	-	-	-
	60	-5	+	+	+	-4	+	+	+
		-6	+	+	+	-5	-	+	+
		-7	-	+	-	-6	+	+	+
145	30	-4	+	+	+	-4	+	+	+
		-5	+	-	+	-5	+	-	+
		-6	-	-	-	-6	-	-	-
	60	-5	+	+	+	-5	+	+	+
		-6	-	+	+	-6	+	+	+
		-7	+	-	-	-7	-	+	+
149	30	-5	+	+	+	-2	+	+	+
		-6	+	+	+	-3	-	-	+
		-7	+	-	-	-4	+	-	-
	60	-5	+	+	+	-5	+	+	+
		-6	+	+	+	-6	+	-	+
		-7	+	+	-	-7	-	-	+
180	30	-5	+	+	+	-5	+	+	+
		-6	+	-	+	-6	-	+	+
		-7	+	+	+	-7	-	-	-
	60	-5	+	+	+	-5	+	+	+
		-6	+	+	+	-6	+	+	+
		-7	+	+	+	-7	+	+	+
194	30	-3	+	+	+	-2	+	+	+
		-4	-	-	-	-3	-	-	-
		-5	-	-	+	-4	+	-	-
	60	-3	+	+	+	-2	+	+	+
		-4	-	+	-	-3	-	-	+
		-5	-	+	+	-4	+	-	+
219	30	-4	+	+	+	-2	+	+	+
		-5	-	-	+	-3	+	-	+
		-6	-	+	+	-4	+	-	-
	60	-4	+	+	+	-5	+	+	+
		-5	+	-	+	-6	-	+	+
		-6	-	-	+	-7	+	+	-