

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

MARIA EDUARDA SIMÕES DIAS

USO DE COMPOSTOS DERIVADOS DA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL  
COMO FONTE DE CARBONO PARA DESNITRIFICAÇÃO E REMOÇÃO  
BIOLÓGICA DE FÓSFORO

São Carlos

2016



MARIA EDUARDA SIMÕES DIAS

USO DE COMPOSTOS DERIVADOS DA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL  
COMO FONTE DE CARBONO PARA DESNITRIFICAÇÃO E REMOÇÃO  
BIOLÓGICA DE FÓSFORO

Monografia apresentada ao Curso de  
Engenharia Ambiental, da Escola de  
Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Eugenio Foresti

VERSAO CORRIGIDA

São Carlos

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

D541u      Dias, Maria Eduarda Simões  
                 Uso de compostos derivados da fermentação de  
                 glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e  
                 remoção biológica de fósforo / Maria Eduarda Simões  
                 Dias; orientador Eugenio Foresti. São Carlos, 2016.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, 2016.

1. Fermentação de glicerol. 2. AGV. 3. RSB. 4.  
Desnitrificação. 5. Remoção biológica de fósforo. I.  
Título.

# FOLHA DE JULGAMENTO

---

Candidato(a): **Maria Eduarda Simoes Dias**

Data da Defesa: 08/11/2016

Comissão Julgadora:

**Eugenio Foresti (Orientador(a))**

**Eloisa Pozzi**

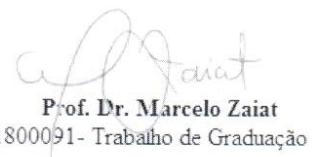
**Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**

Resultado:

Aprovada

Aprovada

Aprovada



Prof. Dr. Marcelo Zaiat  
Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação



## DEDICATÓRIA

*Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, primeiramente, a Deus, que sempre agraciou a mim e minha família. Aos meus amados pais Sérgio Ricardo e Marinez e irmãos Lívia Maria e Leandro, que sempre estiveram ao meu lado em momentos de dificuldades.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me agraciado com pessoas de valor inestimável.

Agradeço aos meus pais Sérgio Ricardo e Martinez por todo o apoio incondicional. A cada conselho e a cada palavra de força que proferiram em todos os meus momentos de desespero e angústia por achar que não estava fazendo o suficiente para honrá-los.

Agradeço aos meus irmãos por estarem ao meu lado sempre fazendo de meus dias mais alegres e leves.

Agradeço ao professor Foresti por todo apoio e por me acompanhar ao longo de todo o projeto.

Agradeço a companhia, dedicação, amizade e a cada um dos ensinamentos (de vida e laboratório) de minha querida parceira de noites viradas, Jéssica.

Agradeço a minha amiga Lívia Botta por ter tido paciência e persistência em me acompanhar no laboratório e aceitar que ensinar fizesse parte de sua rotina de laboratório.

Agradeço à professora Maria Bernadete por me colocar em contato com Lívia Botta e ter preparado uma carta de recomendação que me levou a participar do programa AguaClara.

Agradeço as minhas queridas amigas e irmãs Mayra, Caroline e Marina que sempre me mostraram a real importância da vida e transformaram minha graduação em uma parte inesquecivelmente incrível da minha vida.

Agradeço aos irmãos que fiz durante o intercâmbio, os quais pretendo levar para toda a minha vida. Renan, Alexandre, Beto, Karen, Drielly, Jamile, Matheus, Rodrigo.

Sou grata também ao incidente que serviu de estopim a irmandade que desenvolvi com Mayra ao longo de todos estes anos, a ovada que escolhi receber daquela menina.

Agradeço a minha Second Family, Kimberly, Liliane, Paulo e Larissa, que desde o dia do trote estão presente em minha vida e estão atados a mim por meio de ligações inexplicáveis.

Agradeço a possibilidade de ter partilhado momentos de companheirismo e amizades sinceras ao longo de minha graduação pela 011, foram fundamentais para o desenvolvimento desta e outras conquistas ao longo de minha passagem pela Escola de Engenharia de São Carlos.

Agradeço a Kimberly por ter me ensinado a tocar violão e por sempre partilharmos cifras em momentos de tristezas e alegrias.

Agradeço a Larissa por sempre me acolher em momentos de necessidade, ainda que estando no Japão está sempre em meu coração.

Agradeço a Liliane por ter sido um exemplo de força, modelo de perseverança e melhor amiga.

Agradeço aos pesquisadores do LPB que sempre ajudam a todos com muito carinho e pasciênciia: Leandro, Rachel, Jéssica Soares e Jézinha, Tainá, Alejandra, Marcos, Vanessa, Lucas, Cris, Rodrigo, Inaê, Moara e Carlinha.

Por fim, agradeço a experiência, ainda que rápida, na Unesp, onde conheci pessoas maravilhosas, dentre elas Vanessa, amiga querida, e Bruna, in memoriam.

Agradecimento especial à FAPESP por todo o suporte financeiro durante a execução da minha pesquisa.

## EPÍGRAFE

“Sempre parece impossível até que seja feito.”

Nelson Mandela



## RESUMO

DIAS, M.E.S. **Uso de compostos derivados da fermentação de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo.** 2016. 87p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Este projeto buscou avaliar a possibilidade de utilização do glicerol como fonte de carbono para desnitrificação, aliada à remoção biológica de fósforo (P) de um efluente sintético com composição semelhante à de efluente de reator anaeróbio usado no tratamento de esgoto doméstico. Primeiramente, visou-se obter processo estável de fermentação do glicerol em reatores operados em bateladas sequenciais (RSB), buscando-se o favorecimento da formação de propionato em relação à de acetato e outros ácidos graxos voláteis (AGV). Pretende-se obter concentrações elevadas de AGV que possibilitem a desnitrificação, associada à remoção biológica de fósforo (P). As variáveis a serem testadas serão a concentração inicial de glicerol e o tempo de fermentação para se atingirem as concentrações adequadas. Também foi avaliada a influência do pH na composição dos AGV. Na segunda etapa, os produtos da fermentação foram aplicados para a remoção de nitrogênio e fósforo em reatores alimentados em bateladas sequenciais (RSB). A adição de AGV ocorreu durante a fase anóxica, em que se espera alta demanda de carga orgânica para a desnitrificação do nitrato afluente e liberação de fosfato pelos organismos acumuladores de fósforo. Na fase aerada, foi observada remoção de fósforo pela ação dos organismos removedores de fósforo (ORP). O processo foi avaliado variando-se os principais fatores que podem, segundo a literatura, interferir nos processos, quais sejam os tempos de ciclo, a duração das etapas aeradas e não aeradas e as relações carbono/nitrogênio (C/N) e fósforo/nitrogênio (P/N).

Palavras-chave: Fermentação de glicerol. AGV. RSB. Desnitrificação. Remoção biológica de fósforo.



## ABSTRACT

DIAS, M.E.S. **Use of compounds derived from fermentation of glycerol as carbon source for denitrification and biological phosphorus removal.** 2016. 87p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

This project aims to evaluate the possibility of using glycerol as a carbon source for denitrification associated with biological phosphorus removal of a synthetic effluent. The synthetic effluent composition is similar to the effluent of a UASB, largely used in treatment of domestic sewage. First, the main goal is to obtain a stable fermentation process of glycerol in sequential batch reactors (SBR), aiming to favor the formation of propionate relative to the formation of acetate and other volatile fatty acids (VFA). It is intended to obtain high concentrations of VFA allowing, when applied, denitrification associated with the biological removal of phosphorus. The variables to be tested will be the initial concentration of glycerol and the fermentation time to achieve suitable concentrations of VFA. The effect of pH on the composition of the VFA will also be investigated. In the second stage, the fermentation products will be applied for the removal of nitrogen and phosphorus biological accumulation in sequencing batch reactors (RSB). The addition of VFA will only occur during the anoxic phase. A high organic load demand is expected in the anoxic phase due the demand of carbon for the denitrification of the influent nitrate and the release of phosphate by the phosphate accumulating organisms (PAO). In the aerated stage, it is expected to occur phosphorus biological accumulation by the action of PAO. The process will be evaluated by varying the main factors that can interfere in the processes, which are cycle times, the duration of aerated and non-aerated stages and the ratios between carbon/nitrogen (C/N) and phosphorus/nitrogen (P/N).

**Keywords:** Glycerol fermentation. VFA. SBR. Denitrification. Biological phosphorus removal.



## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

FIGURA 1: MODELO BIOQUÍMICO PARA OAP EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS. PHB (POLIHIDROXIBUTIRATO) E OAP (ORGANISMOS ACUMULADORES DE POLIFOSFATO).....	35
FIGURA 2: MODELO BIOQUÍMICO SIMPLIFICADO PARA O ACÚMULO DE FÓSFORO PELOS OAP SOB CONDIÇÕES AERÓBIAS (OU ANÓXICAS).....	37
FIGURA 3: FLUXOGRAMA COM AS ATIVIDADES CIENTÍFICAS PREVISTAS PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO.....	45
FIGURA 4: ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO DO GLICEROL REALIZADOS EM FRASCOS DURAN ® DE 500 mL .....	48
FIGURA 5: FASES DA BATELADA ALIMENTADA. DA ESQUERDA PARA A DIREITA, AS FIGURAS REMETEM A FASE ANÓXICA, FASE AERÓBIA E, POR FIM, FASE DE SEDIMENTAÇÃO, SEGUIDA POR DESCARTE DE 300 mL DO EFLEUNTE TRATADO .....	50
FIGURA 6: FASES DA BATELADA ALIMENTADA. DA ESQUERDA PARA A DIREITA, AS FIGURAS REMETEM À FASE ANÓXICA, FASE AEROBIA E, POR FIM, FASE SEDIMENTAÇÃO SEGUIDA POR DESCARTE DE 450 mL DO EFLEUNTE TRATADO.....	51
FIGURA 7: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE GLICEROL – 0 A 30 G.L <sup>-1</sup> .....	53
FIGURA 8: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE GLICEROL – 0 A 1500 MG.L <sup>-1</sup> .....	54
FIGURA 9: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA FÓSFORO TOTAL E INORGÂNICO .....	56
FIGURA 10: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA FÓSFORO TOTAL E INORGÂNICO .....	57
FIGURA 11: REATIVAÇÃO DE LODO ACIDOGÊNICO EM GLICEROL A CONCENTRAÇÃO DE 1G.L <sup>-1</sup> .61	61
FIGURA 12: SEQUÊNCIA DE ENSAIOS REALIZADOS COM LODO ACIDEGRÊNICO MESOFÍLICO.....	62
FIGURA 13: COMPORTAMENTO DO DECAIMENTO DE GLICEROL.....	63
FIGURA 14: DECAIMENTO DO GLICEROL, SENDO A CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 5G/L .....	64
FIGURA 15: DECAIMENTO DE GLICEROL EM ENSAIOS COM A CONCENTRAÇÃO VARIANDO DE 5 A 25 G.L <sup>-1</sup> .....	65
FIGURA 16: DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE GLYCEROL, SENDO CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 15 G.L <sup>-1</sup> .....	66
FIGURA 17: DECAIMENTO DO GLICEROL, SENDO CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 15 G/L – CONCENTRAÇÃO DE 1,24 GSSV.L <sup>-1</sup> .....	66
FIGURA 18: DECAIMENTO DO GLICEROL, SENDO CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 20 G/L – CONCENTRAÇÃO DE 1,24 GSSV.L <sup>-1</sup> .....	67
FIGURA 19: DECAIMENTO DO GLICEROL, SENDO CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 15 G/L (VERMELHO) E 20 G/L (VERDE) – CONCENTRAÇÃO DE 1,24 G.L <sup>-1</sup> DE BIOMASSA.....	68

FIGURA 20: ENSAIO FERMENTAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICEROL DE 25G/L.....	68
FIGURA 21: CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM RELAÇÃO A CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DAS BATELADAS DE 5, 15, 20 E 25 G.L <sup>-1</sup> .....	69
FIGURA 22: CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DE GLICEROL PARA OS MEIOS I E II .....	71
FIGURA 23: FINALIZAÇÃO DE ENSAIO EM DIFERENTES MEIOS PARA FORNECIMENTO DE MACRONUTRIENTES.....	72
FIGURA 24: ENSAIO A EM BATELADA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE GLICERINA .....	73
FIGURA 25: ENSAIO B EM BATELADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE GLICERINA .....	75
FIGURA 26: CONCENTRAÇÃO DE ACETATO EM BATELADAS VOLTADAS À FERMENTAÇÃO EM “MEIO I” E “MEIO II” .....	78
FIGURA 27: CONCENTRAÇÃO DE PROPIONATO EM BATELADAS VOLTADAS À FERMENTAÇÃO EM “MEIO I” E “MEIO II” .....	78
FIGURA 28: VARIAÇÃO DE pH NO INÍCIO E FINAL DOS ENSAIOS.....	79
FIGURA 29: DESNITRIFICAÇÃO PARA CICLOS EM REATOR EM BATELADA ALIMENTADA E AERAÇÃO INTERMITENTE .....	80
FIGURA 30: DESNITRIFICAÇÃO PARA CICLOS EM REATOR EM BATELADA ALIMENTADA E AERAÇÃO INTERMITENTE .....	81
FIGURA 31: REMOÇÃO BIOLÓGICA DE FÓSFORO PARA CICLOS EM REATOR EM BATELADA ALIMENTADA E AERAÇÃO INTERMITENTE .....	84
FIGURA 32: RESPOSTA DO SISTEMA DE BATELADA ALIMENTADA PARA SEGUNDO ENSAIO PARA OS PARÂMETROS DQO, FÓSFORO E NITRATO EM MG/L .....	85
FIGURA 33: AMOSTRA DE BIOMASSA RETIRADA AO FINAL DE ETAPA NÃO AERADA. A MICROSCOPIA DE COLORAÇÃO POSSIBILITOU O RECONHECIMENTO DA PRESENCE DOS GRÂNULOS DE PHB E DE POLIFOSFATO .....	87
FIGURA 34: REMOÇÃO BIOLÓGICA DE FÓSFORO PARA CICLOS EM REATOR EM BATELADA ALIMENTADA E AERAÇÃO INTERMITENTE .....	89
FIGURA 35: RESPOSTA DO SISTEMA DE BATELADA ALIMENTADA PARA SEGUNDO ENSAIO PARA OS PARÂMETROS DQO, FÓSFORO E NITRATO EM MG/L .....	91
FIGURE 41: CONTRASTE DE FASE. POSSIVELMENTE, PONTOS CLAROS E BRANCOS REPRESENTAM GRÂNULOS DE POLIFOSFATO INTRACELULAR.....	96

## LISTA DE TABELA

TABELA 1: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE MONITORAMENTO .....	52
TABELA 2: COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZADA NA ANÁLISE DE GLICEROL .....	53
TABELA 3: MEIO UTILIZADO POR BARBIRATO ET AL. (1995) NA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL A PARTIR DE CULTURAS PURAS. MEIO I.....	70
TABELA 4: MEIO UTILIZADO POR BARBIRATO ET AL. (1995) NA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL MODIFICADO PARA CULTURAS PURAS. MEIO II.....	71
TABLE 5: DADOS DE MONITORAMENTO DAS BATELADAS PARA ENSAIO A.....	74
TABELA 6: DADOS DE MONITORAMENTO DAS BATELADAS PARA ENSAIO DO DIA 02 DE ABRIL...	75
TABELA 7: RESULTADO DE ÁCIDOS LIDOS EM HPLC PARA ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO DE GLICEROL, CONCENTRAÇÕES INICIAIS VARIANTES ( $10 - 30 \text{ g.L}^{-1}$ ) EM MEIO II E MESMO SSV APLICADO .....	76
TABELA 8: RESULTADO DE ÁCIDOS LIDOS EM HPLC PARA ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO DE GLICEROL, CONCENTRAÇÕES INICIAIS VARIANTES ( $10 - 30 \text{ g.L}^{-1}$ ) EM MEIO I E MESMO SSV APLICADO .....	77



## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AGV - ácidos graxos voláteis

APHA – *American public health association*

BPR - *biological phosphorus removal*

CoA – Coenzima-A

DQO – demanda química de oxigênio

EBPR - *Enhanced biological phosphorus removal*

OAG - *glycogen accumulatin organisms*

GOH – Glicerol

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

LPB – Laboratório de Processos Biológicos

OAP – Organismos acumuladores de polifosfato

OAG – Organismos acumuladores de glicogênio

PAO - *phosphate accumulating organisms*

PHB - polihidroxibutirato

pH – Potencial Hidrogeniônico

Poli-P - Polifosfato

RSB - reatores sequencias em batelada

SBR - *sequential batch reactors*

SSF – Sólidos suspensos fixos

SST – Sólidos suspensos totais

STV - Sólidos suspensos voláteis

VFA - *volatile fatty acids*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>32</b>
2.1. Remoção biológica de nitrogênio .....	32
2.2. Parâmetros considerados para a desnitrificação .....	33
2.3. Remoção biológica de fósforo .....	34
2.4. Parâmetros para a remoção de nitrogênio e fósforo .....	37
2.5. Fermentação do Glicerol .....	39
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
3.1. Objetivo principal .....	42
3.2. Objetivos específicos .....	42
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1. Esquema Operacional e Instalações .....	44
4.3. Substrato .....	45
4.4. Composição do Meio Nutricional de Macronutrientes - <i>Glycerol Anaerobe Medium</i> ...	45
4.6. Inóculo .....	46
4.7. Verificação da capacidade fermentativa do lodo acidogênico em relação ao glicerol ...	46
4.8. Enriquecimento e Manutenção do Inóculo Acidogênico Mesofílico .....	47
4.9. Reativação do Inóculo Acidogênico Mesofílico .....	47
4.10. Ensaios com reatores anaeróbios com glicerol como substrato .....	47
4.11. Ensaios com reatores em aeração intermitente .....	48
4.12. Retirada de amostra .....	51
4.13. Monitoramento do sistema .....	51
4.13.1. Método enzimático para análise da concentração de glicerol .....	52
4.13.2. DQO .....	54
4.13.3. pH .....	54
4.13.4. Sólidos Totais Voláteis .....	54
4.13.5. Ácidos Voláteis e Álcoois .....	54
4.13.6. Fósforo Inorgânico .....	55
4.13.7. Fósforo Total .....	56
4.13.8. Nitrato .....	57
4.13.9. Microscopia .....	57
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>61</b>
5.1. Seleção de biomassa capaz de degradar glicerol .....	61
5.1.1. Verificação do lodo acidogênico .....	61
5.2. Consumo de glicerol .....	63
5.3. Verificação da Composição do Meio Nutricional de Macronutrientes - <i>Glycerol Anaerobe Medium</i> - a ser utilizado .....	69
5.4. Consumo de glicerol em Meio Nutricional de Macronutrientes modificado, “Meio II”	72
5.5. Produção de Ácidos Graxos Voláteis .....	76
5.6. pH .....	79
5.7. Remoção biológica de nitrogênio .....	79
5.8. Remoção biológica de fósforo .....	82
5.9. Microscopia .....	92
5.9.1. Coloração de Neisser .....	92
5.9.2. Coloração de Polihidroxialcanoato .....	93
5.9.3. Contraste de fase .....	95
<b>6. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO CIENTÍFICO NA XIII SEMANA DA ENGENHARIA AMBIENTAL .....</b>	<b>98</b>

<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>100</b>
<b>8. DIFICULDADES ENCONTRADAS .....</b>	<b>103</b>
<b>9. ESTUDOS SUGERIDOS.....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo estimativas realizadas no ano de 2008 pelo IBGE, dos 55% dos municípios que dispõem de sistemas esgotamento sanitário, apenas 28,5% coletam e tratam esgoto doméstico. O tratamento biológico em sistemas convencionais, aplicados no Brasil, é, em geral, voltado para a remoção de matéria carbonácea (CHERNICHARO et al., 2006).

A digestão anaeróbia apresenta-se como alternativa consolidada para remoção de fração considerável da matéria orgânica do esgoto nas regiões de climas tropical e subtropical (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006). O reator de manta de lodo (UASB) tem sido a principal opção para pré-tratamento devido ao seu baixo custo de implantação e operação, baixa produção de lodo e reduzida área necessária para sua implantação (SILVA; AQUINO; SANTOS, 2007).

Segundo Haandel e Lettinga (1994), a remoção do material orgânico varia de 65% a 80% em reatores UASB. Mesmo apresentando remoção adequada de matéria carbonácea (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006), efluentes de reatores anaeróbios dificilmente atendem à legislação ambiental do país. De forma geral, sistemas compactos de tratamentos, tal como reatores UASB, resultam em efluentes com constituintes residuais, tais como organismos patogênicos e nutrientes, que apresentam concentrações próximas às do esgoto bruto (CHERNICHARO et al., 2006).

A descarga, em corpos d'água e sistemas aquáticos, de efluente resultante de sistema de tratamento que apresenta baixa eficiência de remoção de nutrientes, pode acelerar o crescimento de macrófitas aquáticas e de algas. O desequilíbrio entre espécies leva à eutrofização dos corpos d'água (CONLEY et al., 2009; PIJUAN et al., 2004; SCHINDLER, 2006; WANG; WANG, 2009).

Os reatores UASB têm seu uso consolidado no Brasil. Porém, há a necessidade de que se aprimorem as alternativas de pós-tratamento para possibilitar a remoção de nutrientes, não apenas para atender a legislação, mas também para garantir que corpos d'água não sejam afetados e que os custos de tratamento de água para abastecimentos não sejam elevados.

Lagoas de polimento e maturação podem ser aplicadas como pós-tratamento. Contudo, tal alternativa exige grandes áreas, pois, para efetiva remoção de nitrogênio (por volatilização) e de fósforo (por precipitação), a lagoa precisa ter profundidade menor que um metro (MASCARENHAS; VON SPERLING; CHERNICHARO, 2004).

A aplicação de lodos ativados convencionais, em efluentes de reatores anaeróbios,

resulta em inexpressiva remoção biológica de fósforo e não atende às condições para que ocorra a desnitrificação (VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005). Para tanto, é indispensável que o sistema possibilite a existência de uma região anóxica. Segundo Kuba et al. (1996), condições alternadas de fornecimento e ausência de oxigênio possibilita o desenvolvimento de organismos acumuladores de fósforo.

Os sistemas de remoção biológica de fósforo, bem como de nitrogênio, também são dependentes, dentre outros parâmetros, da disponibilidade de ácidos graxos voláteis. Na maioria dos casos, o efluente de reatores anaeróbios não apresenta concentração de matéria orgânica suficiente para disponibilizar AGV para a remoção biológica de P (TORRES; FORESTI, 2001).

Atualmente, a remoção de nitrogênio aliada à captação de fósforo tem sido largamente estudada, e, para tanto, fontes exógenas de carbono e adaptações em sistemas convencionais de lodos ativados vêm sendo analisados, a fim de se obter eficiência adequada de remoção em um sistema viável ambiental e economicamente.

Aliada à necessidade de uma fonte exógena de carbono para remoção eficiente de nitrogênio e fósforo, é importante investigar novos usos para o glicerol, que é um subproduto da produção de biodiesel. Destaque-se que, no ano de 2013, cerca de 250 toneladas de glicerol foram produzidas no Brasil (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).

No momento, é importante que se pesquisem novos usos para o glicerol, uma vez que há a clara tendência de esgotamento do mercado consumidor desse produto pelo excesso de produção. O acúmulo desse material poderá causar impacto ambiental, se for considerado um resíduo sólido a ser disposto no ambiente (CARNEIRO, 2015). Além disso, a fermentação de glicerol resulta em proporções de propionato e acetato que favorecem a atuação de organismos acumuladores de fósforo, visto que organismos competidores não são capazes de utilizar propionato quando na ausência de oxigênio (FERRARO et al., 2009; HIMMI et al., 2000; ZHANG; YANG, 2009).

O uso de glicerol como fonte de carbono para remoção de fósforo e de nitrogênio vem sendo estudado (CARNEIRO, 2015) nos últimos anos. Determinados parâmetros em relação a esta aplicação do glicerol já foram analisados (GUERRERO et al., 2011), assim como a produção de propionato a partir da fermentação do glicerol (FERRARO et al., 2009; HIMMI et al., 2000; ZHANG; YANG, 2009). Contudo, embora sustentável e economicamente viável, há ainda a necessidade de se aprofundar o conhecimento sobre os processos de remoção estável de nutrientes a partir do uso de glicerol, como fonte exclusiva de carbono, bem como as condições operacionais dos reatores que viabilizam a ocorrência desses processos.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Remoção biológica de nitrogênio

Segundo Madigan, Matinko e Parker (1997), o nitrogênio tem elevado número de estados de oxidação, logo pode estar presente na fórmula de diferentes compostos. Dentre os compostos nitrogenados, estão nitrogênio orgânico, amônia, gás nitrogênio, óxido nitroso, óxido nítrico, íon nitrito, dióxido de nitrogênio e íon nitrato. No meio ambiente, a forma mais frequente nitrogênio são compostos de amônia ( $\text{NH}_3$ ), estado de oxidação -3; amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), estado de oxidação -3; nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), estado de oxidação +5 ou nitrogênio gasoso, estado de oxidação 0.

A remoção de nitrogênio de águas residuárias usualmente implica em aumento considerável dos custos de instalação e operação de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). Em primeiro lugar, há a necessidade de se promover a aeração da massa líquida, uma vez que a oxidação do íon amônio a nitrito e nitrato é realizada por bactérias aeróbias. Na sequência, deverá existir a etapa anóxica de desnitrificação, com o uso de fontes de carbono por bactérias heterotróficas, que é a etapa final do processo da remoção biológica de nitrogênio (ROSSO; STENSTROM, 2015).

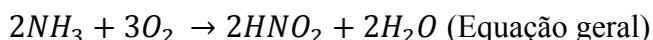
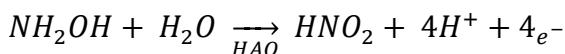
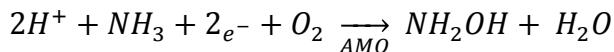
Portanto, para que haja a remoção eficiente de nitrogênio de esgoto sanitário (o que engloba, de acordo com Metcalf e Eddy (1991), nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico) é preciso que ocorram três etapas: amonificação, nitrificação e desnitrificação. A regulação entre os processos e caminhos do ciclo de nitrogênio é complexa e pode ser descrita pela interação entre processos microbiológicos aeróbios e anaeróbios (THAMDRUP; DALSGAARD, 2002).

Bactérias nitrificantes são, em sua maioria, autotróficas e sua energia deriva da oxidação da amônia ou do nitrito. Segundo Madigan, Matinko e Parker (1997), em sistemas convencionais voltados à remoção biológica de nitrogênio, a desnitrificação é etapa subsequente à nitrificação e é essencial como parte integrante da remoção de compostos nitrogenados de efluentes líquidos em tratamento. Sendo assim, compostos de nitrogênio oxidados podem ser utilizados como aceptores de elétrons por bactérias desnitrificantes em etapa anóxica. Bactérias desnitrificantes são majoritariamente heterotróficas e necessitam de certa quantidade de carbono para a redução dos compostos oxidados de nitrogênio.

Em certos casos, a água residuária não possui quantidade suficiente de doadores de elétrons, sendo necessária a adição de fonte exógena de carbono orgânico para efetivo e completo processo de desnitrificação. Os compostos orgânicos mais usados como fonte

exógena de doador de elétrons são o etanol, o metanol ou demais fontes simples de carbono (SLIEKERS et al., 2002). De acordo com Jianlong e Ning (2004), as reações para nitrificação podem ser descritas como a seguir.

Reação estequiométrica para oxidação de amônia a nitrito, pelas Nitrossomonas:



Onde:

AMO: Ammonia monooxygenase

HAO: hydroxylamine oxidoreductase

De acordo com Ferreira (2000), a reação de oxidação do nitrito a nitrato pela Nitrobacter é:



Segundo Bueno (2011), ambos os gêneros citados acima (*Nitrossomonas* e *Nitrobacter*) são aeróbias obrigatórias e apresentam atividade bioquímica apenas em presença de oxigênio dissolvido (OD).

Segundo Slekers et al. (2002), apesar de as bactérias desnitrificantes cobrirem uma grande diversidade de gêneros, as bactérias responsáveis pela oxidação da amônia e do nitrito pertencem a um grupo restrito e autótrofo. *Nitrosomonas* e *Nitrosospira* são as espécies mais conhecidas de bactérias que oxidam amônia por processos aeróbios. *Nitrobacter* e *Nitrospira* são as mais conhecidas em relação à oxidação do nitrito a nitrato.

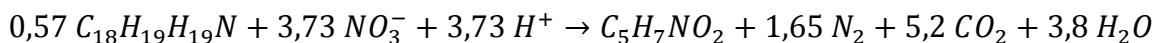
## 2.2. Parâmetros considerados para a desnitrificação

Segundo Metcalf e Eddy (2003), grupos de bactérias obtêm energia para síntese de moléculas de ATP por meio da oxidação de compostos orgânicos. Como compostos orgânicos a serem oxidados, podem ser citados os ácidos orgânicos, carboidratos, álcoois, aminoácidos e ácidos de cadeia curta. Em condições anóxicas, os aceptores finais de elétrons serão os compostos nitrogenados oxidados em etapa de nitrificação. Sendo assim, o nitrato recebe os elétrons equivalentes da redução que não foram usados na geração de ATP, resultando na formação de nitrogênio gasoso.

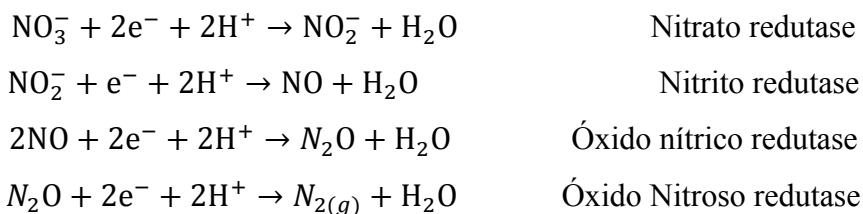
De acordo com Souza e Foresti (1999), muitas bactérias que oxidam o substrato, a partir do nitrato como acceptor de elétron, são desnitrificantes facultativas. Na presença de oxigênio, tais bactérias heterotróficas deixam de utilizar o nitrato como acceptor e passam a utilizar oxigênio molecular, sendo, portanto, essencial que seja mantida a condição de

ambiente anóxico para que a desnitrificação ocorra. Mais especificamente, valores de oxigênio dissolvido iguais a 1 mgO<sub>2</sub>/L ou ainda menores podem inibir a atividade e a síntese de enzimas desnitrificantes.

Segundo Henze et al. (2002), a equação de desnitrificação pode ser escrita de forma simplificada (Equação seguinte), partindo-se do princípio que a geração de energia foi toda utilizada para o crescimento celular e que apenas o nitrato é assimilado. Em casos em que apenas nitrato é assimilado e na ausência de amônia, o fator de rendimento de substrato em biomassa é de 0,36 Kg biomassa/Kg matéria orgânica.



A desnitrificação acontece em etapas. Primeiro o nitrato é reduzido a nitrito, então, o nitrito é reduzido a óxido nitroso. As equações a seguir representam as etapas e as enzimas catalizadoras para cada uma delas, segundo Souza e Foresti (1999).



A conversão total de nitrato presente em efluente líquido a nitrogênio molecular, como mencionado anteriormente, é realizada por meio de bactérias heterotróficas. Diferentes grupos de microrganismos compõem uma microbiota desnitrificante (MANSELL; SCHROEDER, 1998<sup>1</sup> *apud* BASSIN, 2012). Dentre os diversos gêneros de bactérias estão *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Hiphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas* e *Klebsiella* (RITTMAN; LANGELAND, 1985<sup>2</sup> *apud* BASSIN, 2012).

### 2.3. Remoção biológica de fósforo

Assim como a remoção de nitrogênio, a remoção biológica de fósforo necessita de etapas anóxicas e aeradas. Em condições anaeróbias (Figura 1), os ácidos graxos voláteis (AGV) são armazenados como compostos celulares por organismos acumuladores de polifosfato (OAP). Contudo, na ausência de AGV no afluente a ser tratado, como ocorre em

<sup>1</sup> MANSELL, B.O.; SCHROEDER, E.D. Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor. *Water Science and Technology*, v.38, n.1, p.9-14, 1998.

<sup>2</sup> RITTMAN, W. E.; LANGELAND, B. E. Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 300-308, 1985.

sistemas convencionais de tratamento de esgoto, esse substrato foi fornecido aos OAP por organismos facultativos, por meio da fermentação prévia da matéria orgânica biodegradável, na ausência de oxigênio (STENSEL; SEDLAK, 1991).

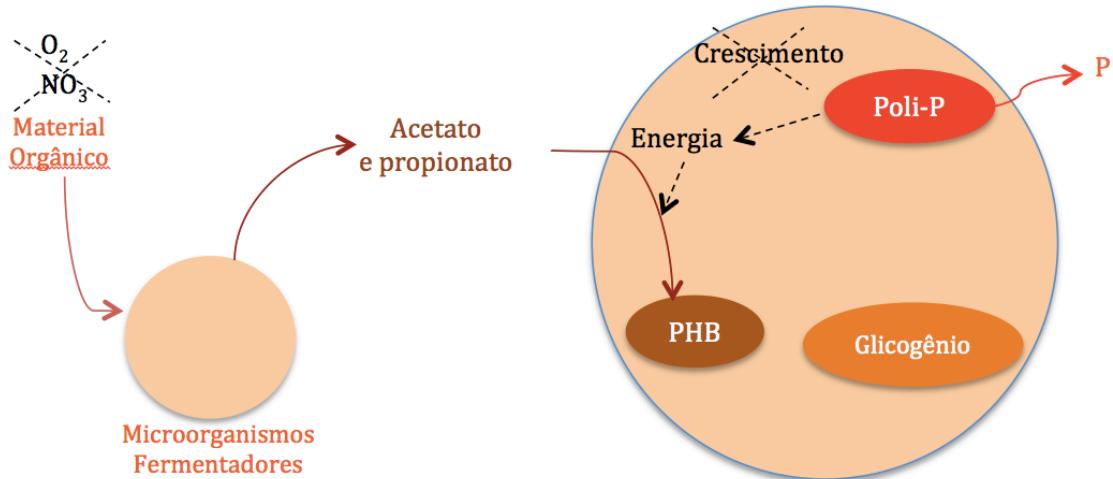


Figura 1: Modelo bioquímico para OAP em condições anaeróbias. PHB (polihidroxibutirato) e OAP (organismos acumuladores de polifosfato)

A assimilação de AGV pelos OAP acontece apenas durante a ausência de oxigênio, o que funciona como uma vantagem competitiva para esses organismos. Portanto, a adição de AGV em fases anaeróbias ou anóxicas contribui para seleção desses organismos e remoção de fósforo, pois organismos heterotróficos não utilizam AGV na ausência de acetores de elétrons (HENZE, 2008).

Os organismos acumuladores de fósforo podem incorporar quantidades superiores a 0.38 mgP/mgSSV (0.17 mgP/mgSTV). Organismos heterotróficos encontrados em sistemas de lodos ativados de mistura completa conseguem remoção típica de aproximadamente 0.02 mgP/mgSSV (0.0015 mgP/mgSTV). No sistema de remoção biológica de fósforo, os organismos heterotróficos e os OAP coexistem no lodo ativado. Os primeiros não acumulam fósforo em excesso, sendo que a remoção de fósforo da fase líquida ocorre apenas devido à síntese celular. Por outro lado, os organismos acumuladores de polifosfato removem grandes quantidades de fósforo da fase líquida, que são, então, estocados no interior celular em longas cadeias de polifosfato (HENZE, 2008).

O grande desafio, de acordo com Henze (2008), está em aumentar a quantidade de OAP em relação aos organismos heterotróficos presentes no lodo ativado e, por consequência,

aumentar a eficiência de remoção de fósforo. A proporção relativa entre os dois grupos citados depende da quantidade afluente de matéria orgânica biodegradável que foi destinada a cada grupo de organismo.

Na fase anaeróbia, anteriormente à etapa de nitrificação, os organismos heterótroficos que não acumulam fósforo não conseguem utilizar os ácidos graxos voláteis por falta de aceptores de elétron ( $O_2$  e  $NO_3^-$ ). Os OAP, no entanto, armazenam AGV internamente em suas células, formando longas cadeias de moléculas de carbono, polihidroxibutirato (PHB), utilizando glicogênio e a energia contida nos polifosfatos (Poli-P), ambos armazenados no interior das células (CHEN; RANDALL; MCCUE, 2004). O resultado dessa fase anaeróbia é o aumento de PHB e a diminuição de Poli-P, com a liberação de ortofosfatos ( $O-PO_4^{2-}$ ) para o meio exterior à célula de OAP's, reação esta que libera energia e que torna possível a síntese de PHB (GEBREMARIAM et al., 2011).

Na presença de oxigênio ou nitrato, o PHB é metabolizado, liberando gás carbônico, água e gerando glicogênio. A energia resultante da oxidação do PHB é utilizada para a síntese de novas células e formação de poli-P. A formação celular e a alta concentração de  $O-PO_4^{2-}$  no meio extracelular estão diretamente relacionadas com a formação de Poli-P, conforme modelo expresso pela figura 2 (HENZE, M., 2008).

O fósforo foi removido do meio líquido pelas bactérias poli-P por meio de sua incorporação na biomassa como parte do material celular. A remoção efetiva se dá pelo descarte do lodo excedente, contendo altas quantidades de fósforo, após sedimentação (METCALF; EDDY, 2003).

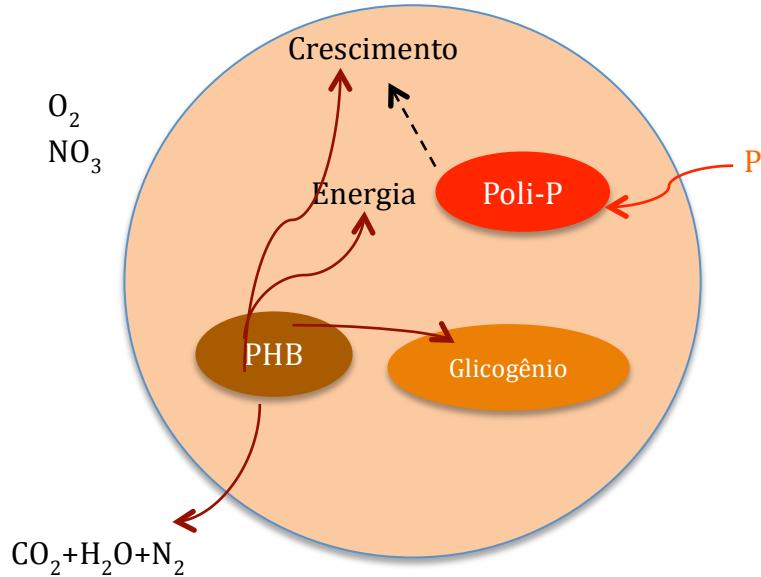


Figura 2: Modelo bioquímico simplificado para o acúmulo de fósforo pelos OAP sob condições aeróbias (ou anóxicas)

#### 2.4 Parâmetros para a remoção de nitrogênio e fósforo

De acordo com Randall, Benefield e Hill (1994), bactérias acumuladoras de polifosfato são dependentes da presença de ácidos graxos voláteis, produtos resultantes do processo fermentativo, que poderia convenientemente ocorrer por meio da fermentação do afluente a ser tratado. Neste mesmo artigo, os autores afirmam que a fase anaeróbia da sequência de bateladas para remoção de fósforo não está associada a processos fermentativos. Aliado a este fator, em dissertação concluída recentemente, Carneiro (2015) obteve resultados insatisfatórios para formação de AGVs durante a fase anaeróbia do reator operado em bateladas e aeração intermitente, visando à remoção conjunta de fósforo e nitrogênio. A remoção de fósforos foi inexpressiva, atribuindo-se esse resultado à baixa disponibilidade de AGV.

Ainda que a análise microbiológica do lodo de sistemas EBPR/BPR (*Enhanced biological phosphorus removal/ biological phosphorus removal*) seja complexa (BLACKALL et al., 2002), é sabido que organismos acumuladores de polifosfato (OAP) podem atuar como organismos acumuladores de glicogênio (OAG), quando presentes em sistemas de ciclo anaeróbio/aeróbio.

Os OAG são considerados uma das maiores causas da redução no acúmulo de fósforo por não contribuírem para a remoção de poli-P e por competirem pela mesma fonte de carbono com os OAP (LOPEZ-VAZQUEZ et al., 2009). Contudo, Callado e Foresti (2001) obtiveram remoções significativas de N e P em reator RSB, utilizando etanol como doador de

elétrons, o qual era adicionado na etapa anóxica do ciclo. Não houve predominância de OAG nas condições em que o reator foi operado.

A mudança na composição orgânica do afluente a ser tratado de ácidos graxos voláteis para açucares, como a glicose, por exemplo, pode ser responsável por induzir a predominância de metabolismo voltado à acumulação de glicogênio em sistemas EBPR/BPR (MULKERRINS; DOBSON; COLLERAN, 2004). Logo, um dos parâmetros essenciais para controle deste sistema é a determinação da carga ótima de DQO do afluente.

Segundo Zeng et al. (2003), é importante que se saiba quais os tipos de ácidos graxos voláteis (AGV) que são prontamente metabolizados por OAP e OAG. Muitos estudos restringem-se ao uso de acetato como fonte de carbono, pelo fato deste AGV ser comumente usado em sistemas BNR (remoção biológica de nitrogênio). Contudo, existe certa variedade de AGV que deve ser estudada. Oehmen et al. (2005) e Pijuan et al. (2004) apontaram que organismos acumuladores de glicogênio são incapazes de metabolizar propionato na ausência de oxigênio, o que contribui para o estudo de enriquecimento de culturas OAP (organismos acumuladores de polifosfato).

Os resultados do estudo feito por Lopez-Vazquez et al. (2009) indicaram que uma mistura de acetato (HAc) e propionato (HPr) no afluente (na ordem de 75-25 ou 50-50% de HAc-HPr), bem como um pH de 7,5, são benéficos para a OAP em temperatura moderada de 20 °C. Gu et al. (2005) observaram deterioração e declínio no desempenho do processo EBPR (*Enhanced biological phosphorus removal*) no tratamento de águas residuárias em temperaturas comuns no verão. Porém, segundo Lopez-Vasquez et al. (2009), um afluente adequado, em proporções de HAc-HPr (75-25%) e pH não inferior a 7,0, pode garantir o favorecimento do metabolismo de PAO, mesmo que em temperatura elevada (isto é, 30 °C).

Estudos apontam que a fermentação do glicerol produz propionato (FERRARO et al., 2009; HIMMI et al., 2000; ZHANG; YANG, 2009), bem como outras variedades de ácidos graxos voláteis em diferentes proporções, de acordo com as condições aplicadas. A aplicação do fermentado do glicerol pode, então, contribuir para o aumento da eficiência de remoção dos nutrientes em estudo, fósforo e nitrogênio, de modo conjunto.

De acordo com experimentos em bateladas realizados por Pattarkine e Randall (1999), o acúmulo de fósforo por organismos é afetado pela disponibilidade dos íons potássio, magnésio e cálcio, sendo os dois primeiros simultaneamente necessários. Jonsson et al. (1996) observaram que, para cada mol de P liberado na fase anóxica, 0.27–0.36 mol de potássio e 0.29–0.32 mol de magnésio são liberados simultaneamente a partir do lodo. Quanto

à temperatura ótima associada ao sistema BPR, esta é de aproximadamente 20°C ou menor (PANSWAD et al., 2003<sup>3</sup> *apud* MULKERRINS; DOBSON; COLLERAN, 2004).

## 2.5 Fermentação do Glicerol

De acordo com Almeida (2011), a produção de glicerina bruta está diretamente relacionada com o aumento da produção de biodiesel. A proporção estequiométrica da reação de produção de biodiesel e geração do resíduo glicerol, após a transesterificação, é de 1 tonelada de glicerina bruta gerada para cada 10 toneladas de biodiesel produzido. No ano de 2007, cerca de 72% da produção de glicerina provinha da indústria de biodiesel (HENARD, 2007<sup>4</sup> *apud* MATURAMA CORDOBA, 2011). Assim, a valorização da glicerina bruta por meio da fermentação e produção de compostos de interesse para a tecnologia ambiental deve favorecer a economia da indústria de biodiesel, reduzindo a produção de resíduos no meio ambiente e aumentando a produção de coprodutos.

Segundo Abad e Turon (2012), fermentações baseadas em glicerol como fonte de carbono podem representar uma baixa taxa de crescimento quando comparada a fontes tradicionais de carbono, tais como xilose e glicose. Contudo, a produção de compostos de considerável valor agregado seria suficiente para compensar a reduzida produtividade volumétrica. De acordo com Papanikolaou et al. (2008), esta conversão é realizada por células procarióticas pertencentes à família Enterobacteriaceae e ao gênero Clostridium.

A fermentação de glicerol pode ocorrer pela via redutora e por via oxidativa. Pela via redutora, o glicerol sofre desidratação resultando em 1,3-propanediol (PD) como via para a regeneração de NADH para obtenção de equilíbrio respiratório. O PD pode ser utilizado principalmente como um monômero para materiais plásticos de biodegradabilidade superior, tais como tereftalato de politrimetileno (SELEMBO et al., 2009).

A rota oxidativa, por sua vez, forma compostos à medida que o glicerol é desidrogenado. O resultado é a formação do composto dihidroxiacetona, que é convertido a succinato ou piruvato, dependendo das condições ambientais e enzimáticas. O composto succinato é convertido em propionato, enquanto o piruvato forma compostos simples como formiato, acetato, etanol, 2,3-butanodiol, lactato (CARNEIRO, 2015; TEMUDO et al., 2008).

A degradação anaeróbia do glicerol, em determinadas circunstâncias e parâmetros (pH em 7,0/7,5 e temperatura mantida em 30°C), pode aumentar a produção de propionato

<sup>3</sup> PANSWAD, T, DOUNGCHAI A., ANOTAI, A. Panswad T, Doungchai A, Anotai J. Temperature effect on microbial communit of enhanced biological phosphorus removal system. Water Res;37(2):409– 15, 2003.

<sup>4</sup> HENARD, M.C. (2007). Impacts on Oilseed Industry Following Biofuel Boom. Disponível em <<http://theinnovationgroup.com/chemprofiles/glycerin.htm>>. 2007.

(FERRARO et al., 2009; HIMMI et al., 2000; ZHANG; YANG, 2009). Conforme já apresentado, o propionato é considerado uma eficiente fonte de carbono para sistemas de remoção de fósforo, pois favorece o metabolismo voltado à acumulação de polifosfato. Tal favorecimento não ocorre quando na presença de acetato como fonte de carbono exclusiva (RANDALL; CHAPIN, 1997<sup>5</sup> *apud* MULKERRINS; DOBSON; COLLERAN, 2004).

Experiências que tentaram a adição de glicerol em sistemas BPR encontraram problemas em fases iniciais e intermediárias, e obtiveram fermentação e remoção dos nutrientes estudados, principalmente fósforo, em tempo não praticável. Segundo Guerrero et al. (2011), uma alternativa para obtenção rápida de um consórcio composto por microrganismos responsáveis pela degradação anaeróbia do glicerol e OAP pode ser alcançada por meio de uma estratégia de dois passos.

A estratégia de dois passos consistiu no enriquecimento do lodo anaeróbio de fermentação do glicerol, assim os organismos acumuladores de polifosfato (OAP) não participariam da fermentação. Desta forma, a fermentação se estabeleceu por meio da ação de organismos anaeróbios essencialmente acidogênicos e voltados a fermentação do glicerol e produção de AGV.

---

<sup>5</sup> RANDALL, C. W.; CHAPIN, R. W. Acetic acid inhibition of biological phosphorus removal. *Water environment research*, 69(5), 955-960, 1997.



### **3. OBJETVOS**

#### **3.1. Objetivo principal**

Promover a efetiva fermentação do glicerol e utilizar o efluente fermentado como fonte de carbono para desnitrificação conjunta à remoção biológica de fósforo de água resíduária sintética, em reator em batelada e submetido à aeração intermitente.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a fermentação de glicerol com relação ao rendimento na produção de ácidos orgânicos e outros compostos de fácil biodegradação;
- A partir dos ensaios de fermentação do glicerol com diferentes concentrações de glicerol, escolher a que apresente melhor relação concentração inicial de glicerol/produção de AGV;
- Usando os produtos de fermentação obtidos na etapa anterior, avaliar o desempenho do sistema de tratamento na remoção de nitrogênio e fosforo para diferentes relações DQO/N e DQO/P, sendo a DQO fornecida ao sistema por meio do fermentado de glicerol;
- Estabelecer dosagem adequada de fermentado de glicerol para desnitrificação e para a remoção biológica de fósforo.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Esquema Operacional e Instalações

Como já mencionado, a metodologia aplicada foi semelhante à aplicada por Callado e Foresti (2001) e Guerrero et al. (2011), visando separar a fermentação do glicerol da etapa de remoção de nutrientes. Os ensaios de fermentação foram executados em frascos Duran ® de 500 mL operados em bateladas e submetidos à atmosfera de N<sub>2</sub> (100%), durante 5 a 10 minutos, para manutenção das condições de anaerobiose, após inoculação.

Os ácidos de cadeia simples obtidos pela fermentação do glicerol foram estocados e mantidos em congelador a fim de serem usados posteriormente, durante a fase anóxica, para remoção de nitrogênio e estoque/formação de PHB, o que possibilitará a captura de fósforo na fase aeróbia. A biomassa enriquecida foi transferida para frascos apropriados de 50 mL e submetida à lavagem, em meio de cultura estéril, em centrífuga refrigerada, a 2.500 rpm por 16 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa resuspensa em meio de cultivo novo, sendo transferida para frasco de Duran ® de 500 mL sob condição de assepsia e mantida a 4 °C até que fosse necessária sua reativação. O fluxograma da Figura 3 apresenta as etapas a serem cumpridas.

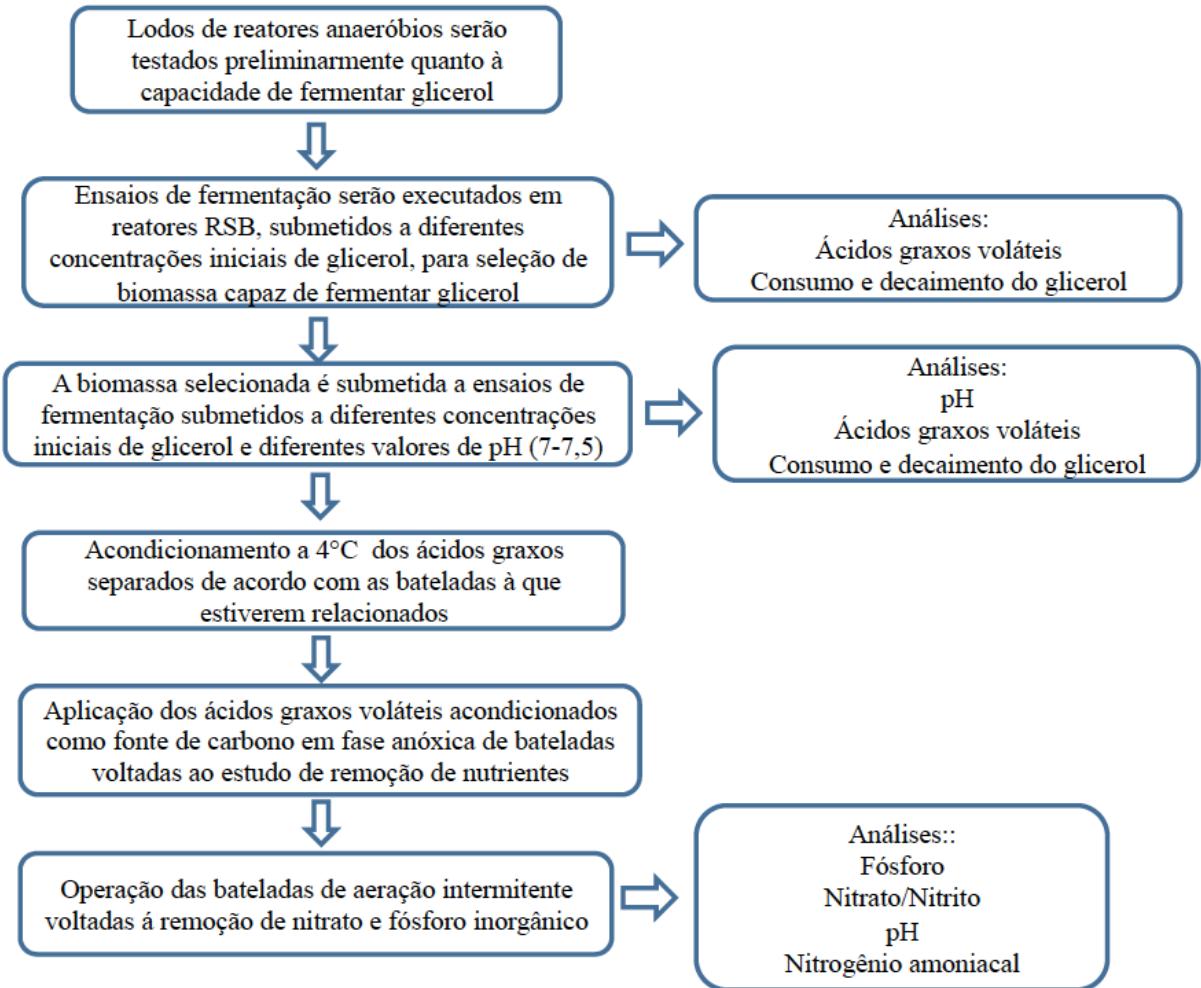


Figura 3: Fluxograma com as atividades científicas previstas para o desenvolvimento do projeto

#### 4.3. Substrato

O glicerol (Glicerol PA de 99,5% de pureza,  $C_3H_8O_3$ ) foi utilizado como substrato na etapa de formação de fermentado e formação de ácidos de cadeia curta e etanol, que foram acondicionados em frascos a 4°C. A etapa de caracterização foi realizada por meio da análises de DQO filtrada e não filtrada de uma solução de Glicerol PA de 99,5% a 1 g/L. Cada grama de glicerol corresponde a 1,2 g de DQO, tanto para DQO dissolvida, em que foram medidas amostras filtradas em SISTEMA *Millipore* com membrana de poro 0,22  $\mu$ m, quanto para amostras não filtradas, DQO total.

#### 4.4. Composição do Meio Nutricional de Macronutrientes - *Glycerol Anaerobe Medium*

Para os ensaios de fermentação voltados à seleção de biomassa eficiente em degradar glicerol foram realizadas diluições seriadas. Para este fim, o lodo do inóculo escolhido foi transferido para frascos Duran ® de 500 mL e, em cada reator, foi adicionado meio destinado

a proporcionar o enriquecimento da cultura responsável pela fermentação do glicerol. Tal meio possui composição semelhante à descrita por Barbirato et al. (1995): glicerol, cuja concentração poderá variar de 5 mg/L a 30 g/L, 3,4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 1,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 20 mg/L de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 5 mg/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Durante a inoculação, o meio permaneceu saturado com gás nitrogênio de modo a garantir condições anaeróbias. Terminada a inoculação, os reatores foram devidamente selados com tampas de borracha Halobutil e incubados a 30 °C e 120 rpm.

#### **4.6. Inóculo**

A primeira etapa da pesquisa consistiu na aplicação de lodos de reatores anaeróbios que foram testados quanto a capacidade de fermentar glicerol. Para inoculação dos reatores em batelada voltados à produção de ácidos de cadeia curta, foi utilizado lodo acidogênico mesofílico obtido no Laboratório de Processamentos Biológicos (LPB).

#### **4.7. Verificação da capacidade fermentativa do lodo acidogênico em relação ao glicerol**

Nas primeiras semanas, alíquotas de lodo acidogênico mesofílico de reatores anaeróbios foram testados em bateladas montadas em frascos Duran de 80 mL e 500 mL, a fim de observar a fermentação do glicerol, bem como a cinética de decaimento do substrato. Para tanto, foram preparados 1,184 L de meio Barbirato et al. (1995) adaptado, conforme descrito no item 4.4, para alimentar quatro reatores de 225 mL de volume de meio reacional e quatro reatores menores, dois de 70 e dois de 72 mL de meio reacional, contendo concentrações variáveis de glicerol como substrato orgânico. Sob condições assépticas foram adicionados 10% - 12,5% (v/v) de inóculo. Após a inoculação, os reatores foram submetidos à atmosfera de N<sub>2</sub> (100%), durante 5 a 10 minutos, para manutenção das condições de anaerobiose. Após a distribuição do meio de cultivo e do inóculo, e troca gasosa no *headspace*, os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica, tendo sido incubados a 30° C e sem agitação por um período que variou de 1 a 3 dias. Para esses reatores, foram realizadas análises da degradação do glicerol a fim de verificar se o lodo poderia ser utilizado na fermentação de glicerol. Uma vez detectado o decréscimo na concentração de glicerol e a sua completa degradação, a biomassa era armazenada a 4 °C para posterior reativação.

#### **4.8. Enriquecimento e Manutenção do Inóculo Acidogênico Mesofílico**

A cada semana, ao menos uma duplicata de reatores anaeróbios em batelada era montada em frascos Duran, a fim de enriquecer e aumentar a biomassa enriquecida. Foram preparados 0,5 litros (L) de meio Barbirato et al. (1995) adaptado, conforme descrito em item 4.4, para alimentar dois reatores de 250 mL de volume de meio reacional, contendo concentrações variáveis de glicerol como substrato orgânico. Sob condições assépticas, foram adicionados 10% (v/v) de inóculo enriquecido. Após a inoculação, os reatores foram submetidos à atmosfera de N<sub>2</sub> (100%), durante 5 minutos, para manutenção das condições de anaerobiose. Após a distribuição do meio de cultivo e do inóculo, e troca gasosa no *headspace*, os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica, incubados a 30° C e rotação de 120 rpm por um período que pode variar de 1 a 3 dias. Para esses reatores foram realizadas análises da degradação do glicerol a fim de verificar se o enriquecimento do inóculo foi eficiente. Uma vez detectado o crescimento da biomassa e a fermentação completa do glicerol inicialmente adicionado, a biomassa era armazenada a 4 °C para posterior reativação.

#### **4.9. Reativação do Inóculo Acidogênico Mesofílico**

A dois dias de se iniciar cada ensaio cinético de fermentação acidogênica do glicerol, nos quais foram testadas diferentes concentrações desse substrato, a biomassa enriquecida, mantida a 4 °C, foi reativada em reator anaeróbio com 225 mL de meio Barbirato et al. (1995) modificado, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Para tanto, o lodo enriquecido (10% v/v) foi transferida para frascos apropriados de 50 mL e submetido à lavagem, em meio de cultura estéril, em centrífuga refrigerada, a 2.500 rpm por 16 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi resuspendida em meio de cultivo novo, sendo transferida para frasco de Duran ® de 500 mL sob condição de assepsia. Os reatores anaeróbios de batelada em Duran ® de 500 mL continham 250 mL de volume reacional mais lodo e 250 mL de *headspace*, este submetido à atmosfera de N<sub>2</sub> (100%) por 10 minutos. Os reatores foram incubados a 30±1 °C, em agitação 120 rpm, por, no máximo, 72 horas..

#### **4.10. Ensaios com reatores anaeróbios com glicerol como substrato**

Foram operados reatores anaeróbios (Figura 4) para duas condições distintas de pH inicial, 7 e 7,5. Para ambos os valores de pH inicial, foram testadas diferentes concentrações de glicerol (1) 5 g.L<sup>-1</sup>; (2) 10,0 g.L<sup>-1</sup>; (3) 15,0 g.L<sup>-1</sup>; (4) 20,0 g.L<sup>-1</sup>; (5) 25,0 g.L<sup>-1</sup> e, por fim, (6) 30,0 g.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em frascos Duran ® de 500 mL, sendo 225 mL de volume reacional e 250 mL de *headspace*, cuja atmosfera original constitui-se de N<sub>2</sub> (100%),

conforme mostrado na Figura 4. Foram preparados, para cada ensaio, 1,35 L de meio Barbirato et al. (1995) adaptado, distribuídos em seis reatores anaeróbios de batelada, cada um dos reatores contendo uma concentração de glicerol distinta. Em cada reator, foi adicionado 10% v/v de inóculo previamente reativado. O pH no início do período de incubação foi 7,0 para os primeiros ensaios e passou a 7,5 em ensaios posteriores; a temperatura de incubação foi  $30 \pm 1$  °C e a agitação foi de 120 rpm. As análises efetuadas para os ensaios voltados à fermentação do glicerol a diferentes concentrações foram: ácidos voláteis, álcoois e acetona por cromatografia líquida; sólidos totais voláteis (STV); consumo de glicerol.



Figura 4: Ensaios de fermentação do glicerol realizados em frascos Duran ® de 500 mL

#### 4.11. Ensaios com reatores em aeração intermitente

Os ensaios foram realizados em frascos Duran ® de 1000 mL, Figura 5, sendo que o volume de controle utilizado para o tratamento do esgoto sintético afluente foi de 900 mL. Foram operados reatores de aeração intermitente para duas condições distintas de adição de fermentado. A primeira condição, ou configuração inicial, contou com adição de 40 mL de fermentado, enquanto que a segunda condição, ou configuração de verificação, contou com adição de apenas 20 mL de fermentado de glicerol. Em ambas as condições a adição do produto do glicerol fermentado ocorreu durante fase anóxica para cada um dos ciclos descritos pela aeração intermitente.

A batelada voltada ao ensaio de remoção de nutrientes foi inoculada com lodo aeróbio obtido da estação de tratamento de águas residuárias da Volkswagen e Lodo de UASB proveniente do tratamento da Avícola Dacar –Ltda., em uma proporção de 3:1, resultando em 1,22 gSSV/L.

Cada ciclo era compreendido por 2 horas sem aeração, que conferiu condição anóxica ao sistema, 2 horas de aeração ininterrupta, condição aeróbia e 20 minutos destinados a sedimentação, importante ressaltar que o tempo de sedimentação foi sendo reduzido conforme

a evolução dos ciclos. Após o período de sedimentação, o descarte manual era realizado.

Durante a primeira etapa, que consistia na adição de 40 mL de fermentado, o descarte era feito para 300 mL ou para a terça parte do volume do reator. Em uma segunda etapa, que consistia na adição de 20 mL de fermentado, o descarte era realizado para 450 mL, que representava metade do volume de controle do reator em batelada alimentada.

Além das variantes descritas para primeira e segunda condições, que basicamente tinham o propósito de verificar a eficiência do uso de glicerol fermentado como fonte exógena de carbono para remoção de nutrientes, bem como a resposta do sistema ao receber menores quantidades de matéria orgânica, o sistema de batelada alimentada montado para as duas condições diferiram no modo como foram operadas.

Os ciclos programados para a configuração inicial foram alternados de modo que dois deles ocorressem durante o dia de forma completa e seguidos um do outro, sendo o sistema, então, desligado durante o período da noite. Em termos práticos, devido a operação manual do sistema, foram destinadas 5 horas para cada um dos ciclos se completarem. Apesar das principais etapas já terem sido descritas, os primeiros 20 minutos foram destinados à alimentação do sistema com 260 ml esgoto sintético e 40 ml de fermentado, seguidos por 2 horas de aeração desligada, 2 horas destinadas a etapa aerada, 20 minutos voltados à sedimentação e, por fim, 20 minutos destinados a preparação para que fosse realizado o descarte de 300 mL do efluente tratado por meio da utilização de um sifão.

Finalizado o ciclo durante o período de 5 horas, outro ciclo era iniciado na sequência. Ao final do segundo ciclo diário, o sistema era desligado por um período de 14 horas e era reiniciado no dia seguinte. O período de interrupção de 14 horas foi aplicado devido à ausência de sistema automático de controle das etapas da batelada, resultando na necessidade de o reator ser submetido à operação manual.



Figura 5: Fases da batelada alimentada. Da esquerda para a direita, as figuras remetem a fase anóxica, fase aeróbia e, por fim, fase de sedimentação, seguida por descarte de 300 mL do efluente tratado

A segunda condição da pesquisa, ou configuração de verificação, foi realizada a partir da adição de apenas 20 mL de fermentado, também durante a etapa anóxica do ciclo de aeração intermitente voltado à desnitrificação. Os ciclos foram alternados de forma que viessem na sequência um do outro, Figura 6. Durante esta segunda configuração do sistema, que contou com adição reduzida de fermentado de glicerol, o sistema não foi desligado durante o período da noite. Desta forma, foram destinadas 5 horas para cada um dos ciclos. Em termos práticos, a descrição da operação manual do sistema foi dividida de forma semelhante à primeira configuração, sendo os primeiros 20 minutos destinados à alimentação, seguidos por 2 horas de etapa desprovida de aeração, 2 horas voltadas à etapa aerada, 20 minutos destinados a sedimentação e, por fim, 20 minutos para que fosse realizado o descarte de 450 mL do efluente tratado por meio da utilização de um sifão. Finalizado o ciclo de duração de 5 horas, outro ciclo era iniciado na sequência.



Figura 6: Fases da batelada alimentada. Da esquerda para a direita, as figuras remetem à fase anóxica, fase aerobia e, por fim, fase sedimentação seguida por descarte de 450 mL do efleunte tratado

#### 4.12. Retirada de amostra

As amostras eram retiradas para cada início de uma nova etapa de cada um dos ciclos. Desta forma, para cada ciclo, pelo menos três amostras necessariamente eram retiradas, a saber, após alimentação, ao final da etapa anóxica e ao final da etapa aerada. Com o intuito de coletar alíquotas que, de fato, representassem o sistema, a coleta era realizada com auxílio de um pipeta de 1mL, desta forma a alíquota representava a concentração de nutrientes e carga orgânica ao longo de toda a coluna de água do reator. O procedimento de coleta se repetia até que 12 mL fossem coletados. As amostras eram, então, colhidas em tubo falcon de 15 mL e levados à centrífuga, onde eram submetidas a rotação de 2500 rpm por 6 minutos, a fim de separar a matéria orgânica suspensa da amostra a ser analisada posteriormente. Seguindo a centrifugação, o sobrenadante era acondicionado em tubos de vidros previamente lavados com solução de HCl a 20% e água destilada, a amostra centrifugada era congelada até que fosse necessário alíquotas para análise.

#### 4.13. Monitoramento do sistema

Cada etapa descrita no plano de trabalho, bem como no fluxograma de atividades, ambos descritos no item anterior, conduziu a análises físico-químicas específicas destinadas ao monitoramento das condições operacionais dos reatores em bateladas montados em frascos Duran de 500 ml voltados à fermentação de glicerol, bem como análise de amostras retiradas

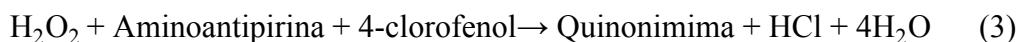
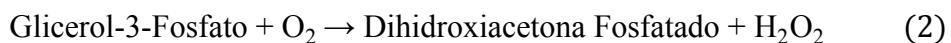
durante ensaio voltado ao estudo da aplicação de fermentado em sistema de batelada alimentada como fonte exógena de carbono para remoção biológica dos nutrientes fósforo e nitrogênio. A Tabela 1 a seguir sintetiza as análises realizadas, bem como as frequências de realizações e referências para cada método utilizado.

Tabela 1: Análises físico-químicas de monitoramento

Parâmetro (unidades)	Método	Frequência	Referência
$P-PO_4^{3-}$ (mgP.L <sup>-1</sup> )	Ácido ascórbico	1x semana	APHA, 2005; método 4500-P E
DQO (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	Espectrofotométrico	1x semana	APHA, 2005; método 5220 D
pH	Potenciométrico	5x semana	APHA, 2005; método 4500-H <sup>+</sup>
Alcalinidade (mgCaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	Titulométrico	2x semana	APHA, 2005; método 2320
Glicerol (mg.L <sup>-1</sup> )	Enzimático	1x semana	Greenhill (2003)
Ácidos Voláteis (mg.L <sup>-1</sup> )	Cromatografia - HPLC	1x semana	Moraes <i>et al.</i> (2000)
$N-NO_3^-$ (mgN.L <sup>-1</sup> )	Cromatografia de íons	1x semana	APHA, 2005; método 4500-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> C

#### 4.13.1. Método enzimático para análise da concentração de glicerol

O decaimento do substrato glicerol foi avaliado analisando-se esse composto por meio do método enzimático descrito por Greenhill (2003) e adaptado por Carneiro (2015). O método enzimático pode ser caracterizado como um procedimento foto-enzimático e não tóxico, pois dispensa uso do solvente piridina. De acordo com Valdez *et al.* (2011), tal método é preciso, pode ser realizado em curto período e não apresenta problemas de toxicidade. As reações enzimáticas envolvidas neste método são descritas a seguir:



O glicerol, na presença da adenosina trifosfato (ATP) e da enzima glicerol-quinase (GK), produz adenosina difosfato (ADP) e glicerol-3-fosfato (1) que, na presença de glicerol-3-fosfato oxidase e oxigênio, produz di-hidroxiacetonafosfato (DAP) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (2). Tal peróxido, na presença de uma peroxidase, de um acceptor de oxigênio e da 4-aminoantipirina, forma a água e a quinonimina, composto colorido, que pode ser determinado por espectrofotometria (3).

A solução comercial enzimática *Triglycerides FS Diasys* é utilizada para a determinação de glicerol em amostras. O reagente enzimático apresenta a composição descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Composição da solução enzimática utilizada na análise de glicerol

Componente	Concentração	Unidade
Tampão pH 7,2	50	$\text{m.mol.L}^{-1}$
4- Clorofenol	4	$\text{m.mol.L}^{-1}$
ATP	2	$\text{m.mol.L}^{-1}$
$\text{Mg}^{2+}$	15	$\text{m.mol.L}^{-1}$
GK	$\geq 4$	$\text{k.U.L}^{-1}$
Peroxidase	$\geq 2$	$\text{k.U.L}^{-1}$
LPL	$\geq 2$	$\text{k.U.L}^{-1}$
4- aminoantipirina	0,5	$\text{m.mol.L}^{-1}$
GPO	0,5	$\text{k.U.L}^{-1}$

Os resultados de absorbância, lidos no comprimento de onda 500 nm, foram relacionados às concentrações de cada uma das amostras. Tal relação possibilitou traçar a curva de calibração (Absorbância x Concentração de glicerol), Figura 7, para concentrações superiores a 350 mg/L e inferiores a 30 g/L e Figura 8, referente a concentrações inferiores a 350 mg/L.

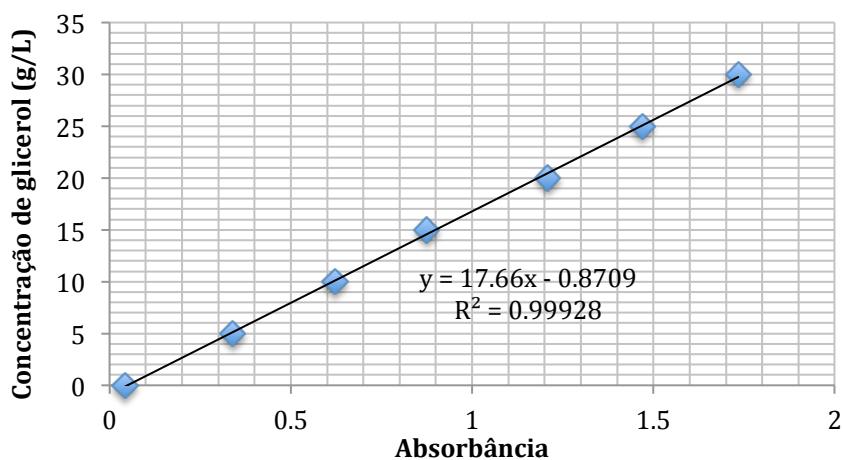


Figura 7: Curva de calibração para a análise de glicerol – 0 a 30  $\text{g.L}^{-1}$

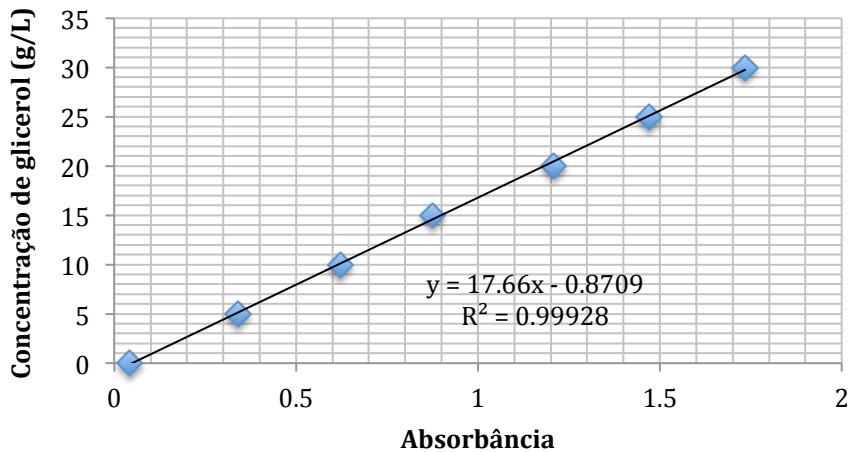


Figura 8: Curva de calibração para a análise de glicerol – 0 a 1500 mg.L<sup>-1</sup>

#### 4.13.2. DQO

A determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) inicial e final de cada ensaio, em que o fermentado foi reservado para a etapa seguinte de remoção de nutrientes, foi realizada de acordo com APHA (2005).

#### 4.13.3. pH

O pH inicial dos ensaios foi ajustado em 7,0 e 7,5 com adição de bicarbonato de sódio como alcalinidade. Foram realizadas leituras de pH das amostras líquidas coletadas durante o período de operação dos reatores e ao final das bateladas voltadas à produção de fermentado (APHA, 2005).

#### 4.13.4. Sólidos Totais Voláteis

A análise de Sólidos Totais voláteis foi realizada de acordo com APHA (2005).

#### 4.13.5. Ácidos Voláteis e Álcoois

A determinação de ácidos voláteis e álcoois foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Usou-se um sistema para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (SHIMADZU®) equipado com bomba LC-10ADVP, amostrador automático SIL-20A HT, forno CT-20A, dois detectores ligados em série: um detector de ultravioleta (UV) com arranjo de diodos do modelo SDP-M10 AVP, o detector por índice de refração RID-10A; além do controlador SCL-10AVP. A coluna utilizada foi AMINEX® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; BioRad) e software Class-VP (SHIMADZU®) para analisar os resultados. Os ácidos foram detectados pelo SDP-M10 AVP, e os alcoóis pelo RID-10A. Como fase móvel (FM), usou-se solução de ácido sulfúrico 0,005 M, e as condições operacionais da coluna foram de fluxo de

0,5 mL/ min e temperatura de 43°C. O preparo da amostra consistiu em utilizar 2,0 mL de amostra a ser analisada e adição de 80  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 2M. Essa solução foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 mm, anteriormente à injeção no cromatógrafo.

#### **4.13.6. Fósforo Inorgânico**

O fósforo é facilmente adsorvido por superfícies de vidro. Para evitar que as amostras perdem a concentração real por conta do quanto fácil esse nutriente pode ser adsorvido pelo vidro, as vidrarias utilizadas na retirada de amostras, bem como vidrarias usadas na diluição, armazenagem e análise das alíquotas, foram lavadas previamente com solução de ácido clorídrico a 20% v/v e enxaguadas com água deionizada e, por fim, foram secas em estufa a 60 °C. Detergentes foram evitados por conterem fosfato em sua composição.

O Método da Redução com Ácido Ascórbico permite que, em meio ácido, o ácido fosfomolibdico seja formado a partir da reação entre íons de ortofosfato, presente nas amostras, e molibdato de amônio com tartarato de potássio e antimônio, presente em reagente misto. O ácido fosfomolibdico de coloração amarelada, então formado, é reduzido pelo ácido ascórbico, que resulta na formação de um complexo azul de molibdênio. Em comprimento de onda 882 nm, a absorbância pode ser diretamente relacionada à concentração de ortofosfato presente em amostra.

A curva de calibração, Figura 9, foi preparada a partir de solução padrão de 50 mgP/L. A solução padrão, por sua vez, foi preparada a partir da diluição de 0,2197 gramas de fosfato monobásico anidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) previamente seco em estufa (103 a 105°C por 2 horas) em água deionizada, a adição de água deionizada se deu até que se atingiu o menisco de balão volumétrico de 1 litro. O preparo das soluções padrões foi realizado em duplicatas. A partir de leituras realizadas em espectofotômetro para o comprimento de onda de 882 nm, obteve-se a curva padrão da absorbância registrada por concentração de fósforo inorgânico. A curva padrão, uma vez traçada, fornece a equação de calibração e coeficiente de correlação, ambos apresentados em figura 9.

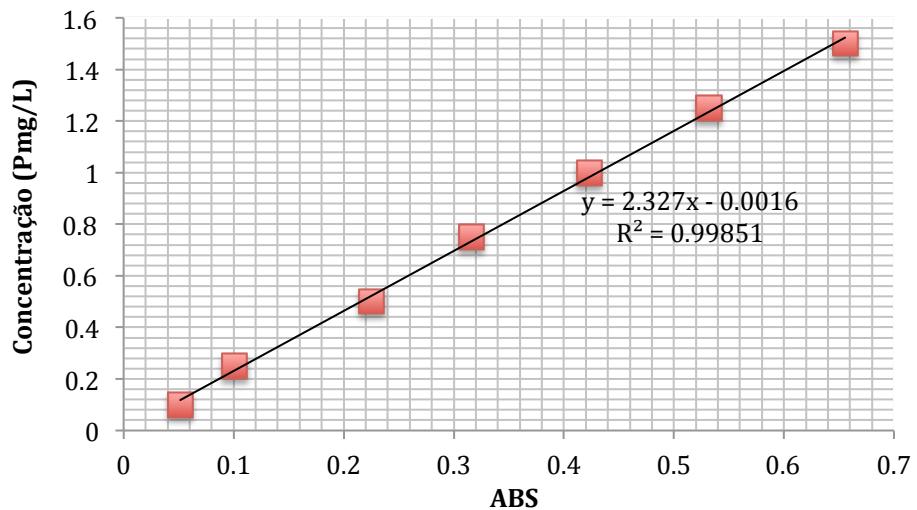


Figura 9: Curva de calibração para fósforo total e inorgânico

#### 4.13.7. Fósforo Total

Para a quantificação de fósforo total presente na porção de sólidos suspensos do sistema em batelada alimentada, foi retirada uma alíquota representativa do sistema e, após a amostra ser centrifugada por cerca de 6 minutos em rotação de 2500 rpm, o sobrenadante foi passado para tubo de ensaio, enquanto a biomassa retida no fundo do tubo falcon foi lavada com água deionizada e diluída para 100 e 50 vezes.

As amostras diluídas foram levadas à autoclave para o método da digestão simultânea com persulfato. A digestão ocorreu em autoclave a 120-130°C por aproximadamente 45 minutos, tal procedimento permitiu que polifosfatos e organofosforados fossem convertidos a ortofosfatos dissolvidos. Terminada a digestão, as amostras foram neutralizadas e tiveram as suas concentrações de fósforo total determinadas pelo método colorimétrico da redução com ácido ascórbico, descrito em item anterior. A curva de calibração para fósforo total pode ser observada pela figura a seguir, Figura 10.

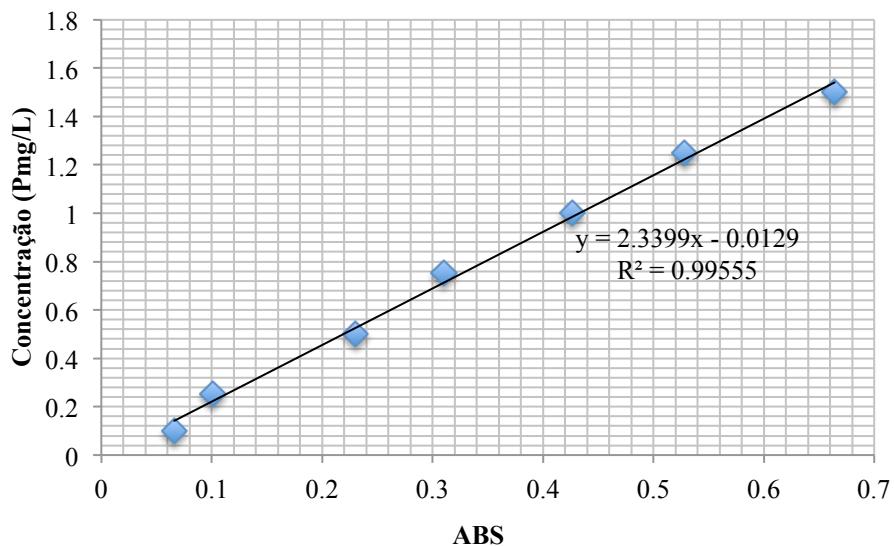


Figura 10: Curva de calibração para fósforo total e inorgânico

#### 4.13.8. Nitrato

O nitrato foi analisado quantitativamente pelo método espectrofotométrico da adsorção ultravioleta.

#### 4.13.9. Microscopia

##### Coloração de Neisser

A Coloração de Neisser é comumente aplicada na necessidade de coloração voltada à identificação de tricoma e dos grânulos intracelulares de polifosfato, que podem ser descritos como reservas de energia para determinados organismos. A coloração pode ser classificada em dois grupos, os grupos são denominados Neisser positivo e Neisser negativo. A metodologia para aplicação do tratamento foi descrita por Jenkins et al. (1993) e tem como base a utilização de duas soluções.

A primeira solução consiste em uma mistura entre as soluções A e B na proporção de 2:1 em volume/volume. A solução A é composta pelo corante principal neste tipo de tratamento, o azul-de-metilo (catiônico), responsável por se aos aniónicos das cadeias poliméricas de polifosfato, além de 5 mL de etanol 95%, 5 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água deionizada. A segunda solução é uma mistura de 33.3 mL de Bismark Bown diluído até completar uma solução final de volume total de 100 mL.

Preparadas as soluções o procedimento padrão para a preparação foi seguido, tal procedimento envolveu a deposição de uma gota da amostra em lâmina previamente limpa, a amostra em lâmina foi deixada secar ao ar por 30 minutos. Após secagem natural das amostras em lâmina, cobriu-se a área tomada pela amostra com a primeira solução, esperou-se

1 minuto até que a lâmina fosse lavada rapidamente em água corrente. Em seguida, a lâmina foi coberta pela segunda solução, após o tempo de 1 minuto a lâmina foi lavada novamente e seca. Após o tratamento, a lâmina foi examinada em óleo de imersão, em iluminação direta e aumento de 1000 vezes.

A aplicação do tratamento com o corante azul-de-metileno resulta, então, em duas colorações possíveis, coloração azul-violeta, indicando que o organismo identificado é Neisser positivo e, por tanto, acumulador de grânulos de polifosfato ou coloração amarelo-castanha, para Neisser negativo.

#### Coloração de Polihidroxialcanoato (PHB)

Os grânulos de PHB, tais como grânulos de polifosfato, podem ser descritos como reservas energéticas intracelulares para determinados organismos. A coloração por meio do uso do corante Negro de Sudão B, de acordo com a metodologia descrita por Jenkins et al. (1993), possibilita identificação de organismos acumuladores deste polímero e tem como base a utilização de duas soluções.

A primeira solução consiste em uma mistura entre 0,3 gramas de corante Negro de Sudão B em 100 mL de etanol 60%. A segunda solução é composta por 0,5 gramas de safranina dissolvida em 100 ml de água deionizada.

Preparadas as soluções o procedimento padrão para a preparação foi seguido, tal procedimento envolveu a deposição de uma gota da amostra em lâmina previamente limpa, a amostra em lâmina foi deixada secar ao ar por 30 minutos. Após secagem natural das amostras em lâmina, cobriu-se a área tomada pela amostra com a primeira solução, esperou-se 10 minuto até que a lâmina fosse lavada rapidamente em água corrente. Em seguida, a lâmina foi coberta pela segunda solução, após o tempo de 10 segundos a lâmina foi lavada novamente e seca.

Após a aplicação dos corantes, a lâmina foi examinada qualitativamente em óleo de imersão, em iluminação direta e aumento de 1000 vezes. Para casos em que PHB está presente, as células tornam-se escuras, enquanto que na ausência intracelular de PHB o citoplasma apresenta-se em uma coloração magenta.

#### Contraste de fase

Para avaliação microscópica da alíquota de biomassa, foi utilizado microscópio óptico de contraste de fase Olympus BX60, acoplado à câmara habilitada com captura de imagem Evolution QE e software Image-Pro Plus 4.5. A amostra era preparada de modo que uma gota

era sobreposta a uma camada previamente coberta de Ágar na concentração 2%, ainda sobre a camada Ágar e amostra posicionou-se uma lamínula e esperou-se cerca de 30 minutos para realização da leitura. A metologia foi aplicada de modo a reduzir o movimento dos organismos celulares na amostra, a fim de obter imagens nítidas.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Seleção de biomassa capaz de fermentar glicerol

A primeira etapa da pesquisa consistiu na aplicação de alíquotas de lodo de reator anaeróbio que foram testadas quanto à capacidade de fermentar glicerol.

#### 5.1.1. Verificação do lodo acidogênico

Testes em bateladas foram realizados com lodo acidogênico mesofilico obtido de reatores voltados à produção de hidrogênio no Laboratório de Processamentos Biológicos (LPB). Foram inoculados quatro reatores montados em frasco de vidro tipo Duran com capacidade de 80 ml, conforme Figura 11. Esta etapa pretendia verificar se glicerol poderia ser assimilado pelo lodo acidogênico selecionado. Para tanto, os reatores foram inoculados em 10% (UG1-2 e UG2-1) e 12,5% (UG1-2 e UG2-2) do volume total (Figura 4). Esta etapa tinha como fundamento reativar a biomassa em substrato contendo apenas 1 g.L<sup>-1</sup> de glicerol como fonte de carbono e solução de macronutrientes, descrita anteriormente.



Figura 11: Reativação de lodo acidogênico em glicerol a concentração de 1g.L<sup>-1</sup>

Decorridos dois dias pós inoculação, verificou-se a quantidade de glicerol restante para cada um dos reatores. As amostras foram diluídas 50, 100 e 200 vezes e, para todas as diluições, o resultado constatado indicava remoção total do glicerol adicionado. A pressão foi verificada em cada frasco Duran, mas a pressão relativa permanecia nula para todos os reatores. A fim de monitorar o decaimento do glicerol de forma mais detalhada, foram inoculados quatro reatores montados em frasco de vidro tipo Duran com capacidade de 500 ml, sendo que 20% do valor correspondeu ao conteúdo dos reatores anteriores (80 mL), completando-se o volume em 400 mL com meio macronutrientes em uma concentração de 5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. A concentração inicial de glicerol resultante de aproximadamente 4 g.L<sup>-1</sup>

apresentou, após 12 horas de ensaio, concentrações de glicerol de 0,483; 1,998; 1,703 e 0,034 g.L<sup>-1</sup> para os reatores UG1-1, UG1-2, UG2-1 e UG2-2, respectivamente.

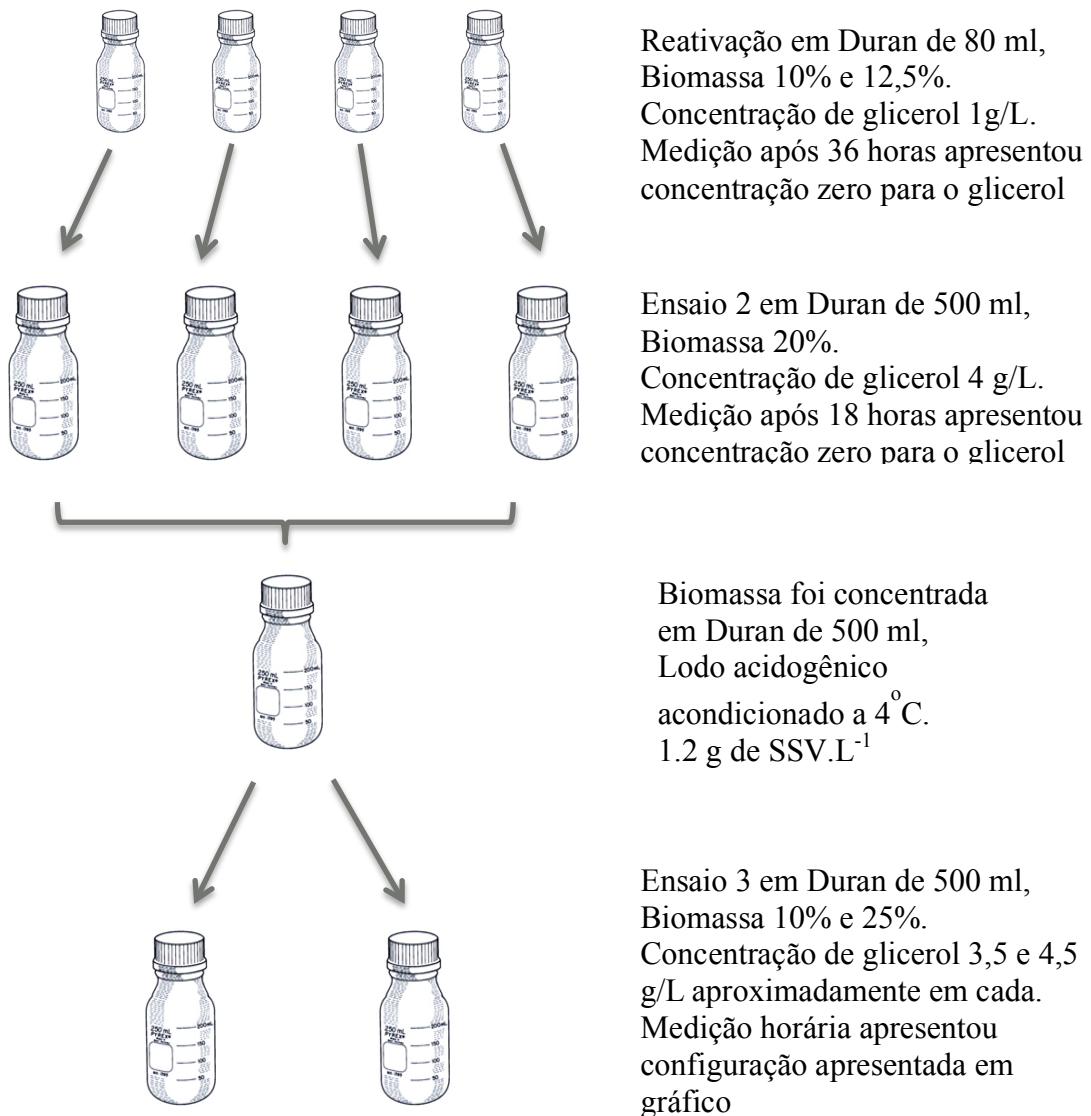


Figura 12: Sequência de ensaios realizados com lodo acidegênico mesofílico

O decaimento da concentração de glicerol foi analisado mais detalhadamente para que os ensaios pudessem ser programados a partir de cinética relativamente conhecida. Foram inoculados dois reatores montados em frasco de vidro tipo Duran com capacidade de 500 ml; um dos reatores foi inoculado em 25% de seu volume com a biomassa selecionada resultante dos últimos ensaios, enquanto que o outro reator foi inoculado em 10%. As medições foram realizadas a cada hora, como na Figura 13.

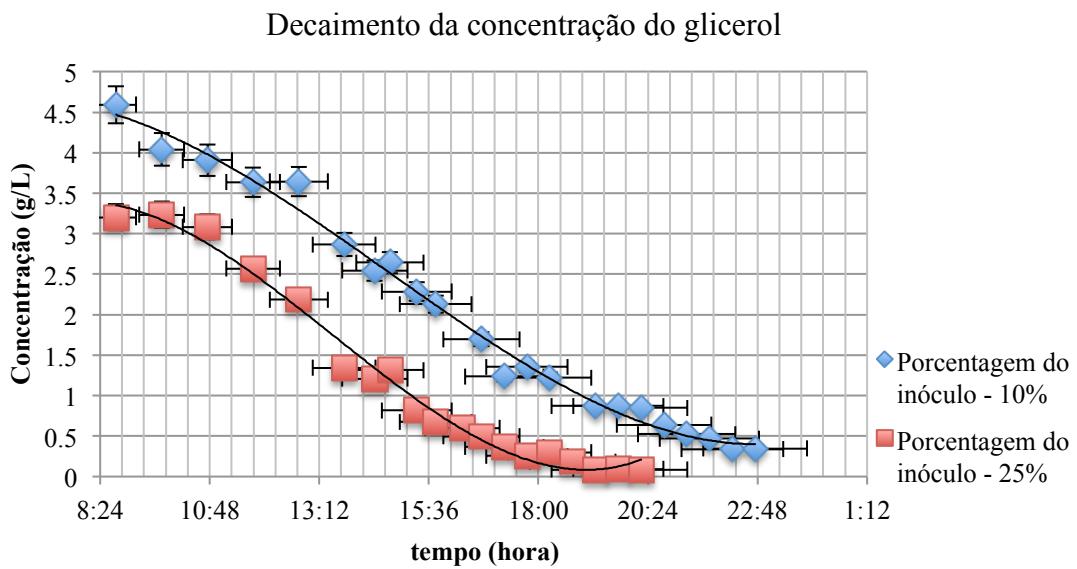


Figura 13: Comportamento do decaimento de glicerol

Concluída a etapa de testes e verificação da capacidade de fermentação do glicerol pelo lodo acidogênico mesofílico selecionado, iniciaram-se os estudos da fermentação do glicerol com diferentes concentrações iniciais.

### 5.2. Consumo de glicerol

Os primeiros ensaios foram realizados com o pH inicial igual a 7,0, aproximadamente. Para o pH inicial de 7,0 não eram necessárias correções adicionais; o meio macronutrientes e o glicerol adicionado nas concentrações propostas de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> resultavam em pH em torno de 7. Os ensaios buscavam a montagem de reatores em frascos Duran de 500 mL, sendo que, desse volume, 225 correspondia ao meio reacional adicionado, enquanto 25 mL compreendiam o volume do inóculo enriquecido e previamente reativado. Após o período de adaptação, realizou-se, então, um ensaio em batelada para a concentração de glicerol inicial igual a 5 g.L<sup>-1</sup> e concentração de biomassa de 0,22 g.L<sup>-1</sup>.

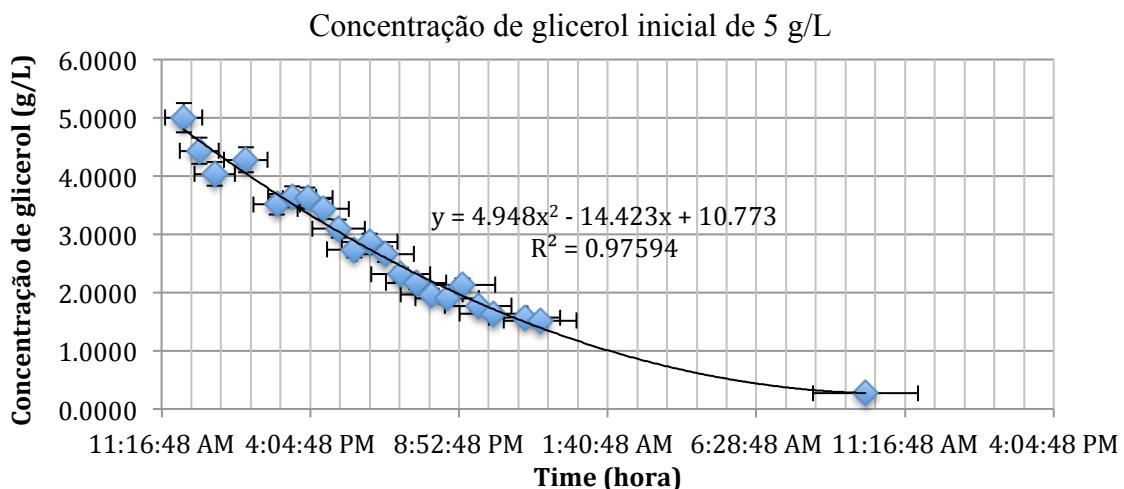


Figura 14: Decaimento do glicerol, sendo a concentração inicial de 5g/L

O decaimento de glicerol inicialmente adicionado na concentração de 5 g.L<sup>-1</sup> pode ser descrito pela equação presente na Figura 14. A degradação do substrato glicerol para as condições iniciais de pH 7 e concentração de 5g.L<sup>-1</sup> de glicerol foi de 98,4%, chegando a 80 mg.L<sup>-1</sup>, em 24 horas de incubação.

Após analisar o decaimento para concentração inicial de 5g.L<sup>-1</sup>, foi realizado ensaio para as concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 g.L<sup>-1</sup>. Para este ensaio, a concentração de biomassa em SSV inserida, bem como a concentração de meio macronutrientes, foram mantidas, variando-se apenas a concentração de glicerol em cada uma das bateladas. A temperatura da câmara foi de 31°C, a rotação de 120 rpm e pH inicial foi fixado em 7,0. O decaimento do glicerol foi monitorado pelo método enzimático anteriormente descrito. A variação das concentrações em relação ao tempo do ensaio pode ser observado pelo gráfico a seguir, Figura 15.

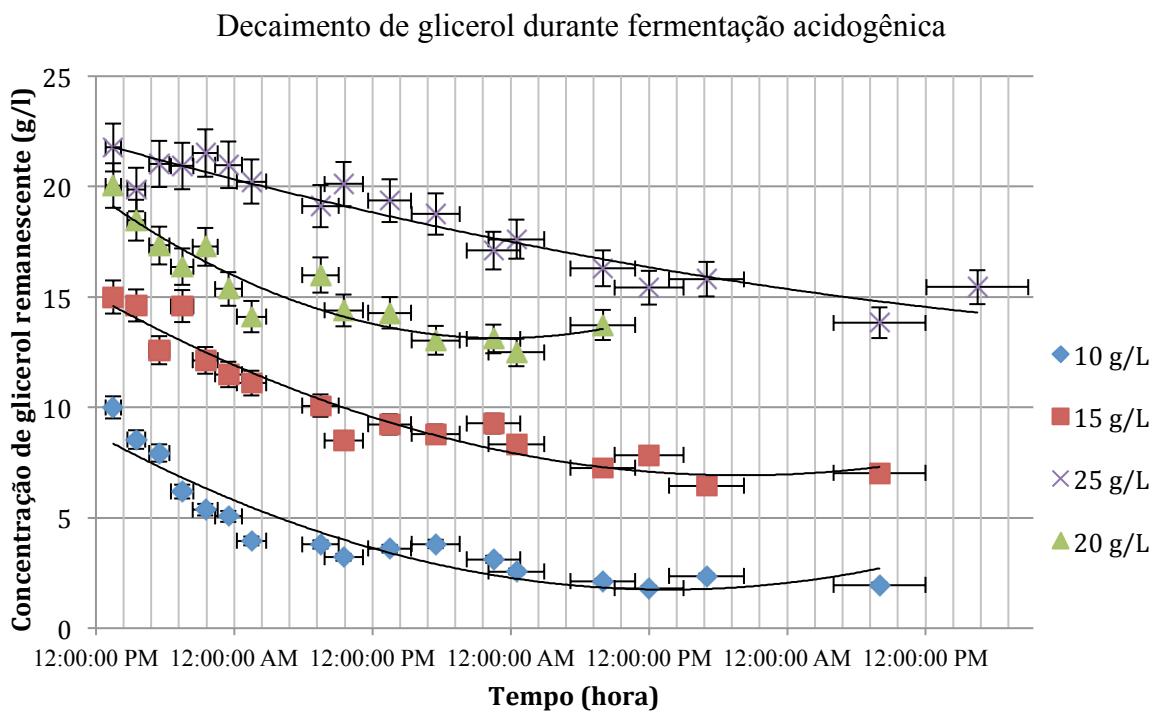


Figura 15: Decaimento de glicerol em ensaios com a concentração variando de 5 a 25 g.L<sup>-1</sup>

O ensaio foi interrompido no terceiro dia, pois observou-se que, em todos os reatores em batelada, houve um comportamento semelhante marcado pela degradação de aproximadamente 7 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, sendo que o remanescente permaneceu no sistema em torno de dois dias sem apresentar tendência para o decaimento. Tal ensaio não indicou, inibição pelo substrato. Observou-se, porém, que a produção de ácidos, os quais não são consumidos no sistema, estava alterando o pH para uma faixa em torno de 4,5, o que impossibilitava a continuidade do processo fermentativo do glicerol.

Com o intuito de corrigir o pH no sistema ainda no processo de conversão do glicerol em ácidos graxos passíveis de serem empregados na remoção de nutrientes na etapa 2 da pesquisa, titulou-se o sobrenadante restante das bateladas anteriores com solução de 0,5M de bicarbonato de sódio. Observou-se a necessidade de adicionar 1,4 g.L<sup>-1</sup> de bicarbonato para cada 7 g.L<sup>-1</sup> de glicerol degradado, que resultava na elevação do pH de 4,5 para 6,6 a 7,0.

Os ensaios seguintes foram realizados utilizando-se bicarbonato logo no início da fermentação, resultando no aumento do pH inicial de 7,0 para aproximadamente 7,5. Os primeiros ensaios foram realizados de modo a monitorar a adaptação do lodo acidogênico à nova condição de pH inicial.

A Figura 16 é referente à adaptação da biomassa à nova condição inicial de pH. Observa-se que o decaimento começou efetivamente após uma fase de lag de aproximadamente 14 horas.

### Decaimento de glicerol durante fermentação acidogênica

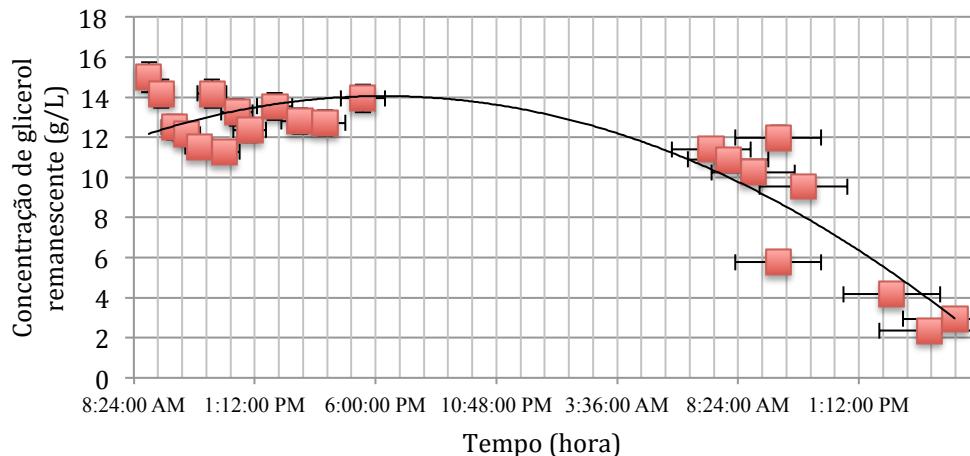


Figura 16: Decaimento da concentração de glicerol, sendo concentração inicial de 15 g.L<sup>-1</sup>

Após esse ensaio inicial, seguiram-se mais três ensaios a fim de observar a taxa de decaimento do glicerol. Foi obtido que a taxa empregada de biomassa (aproximadamente 0,6 g.L<sup>-1</sup> de sólidos suspensos voláteis) apresentava tempo de degradação de 24 horas para glicerol para a concentração inicial de 15 g.L<sup>-1</sup>. Baseado nessa taxa, foram inoculados mais dois reatores em bateladas, com o dobro de biomassa usada para inocular as bateladas de adaptação. O resultado pode ser melhor visualizado na Figura 17.

### Decaimento de glicerol durante fermentação acidogênica

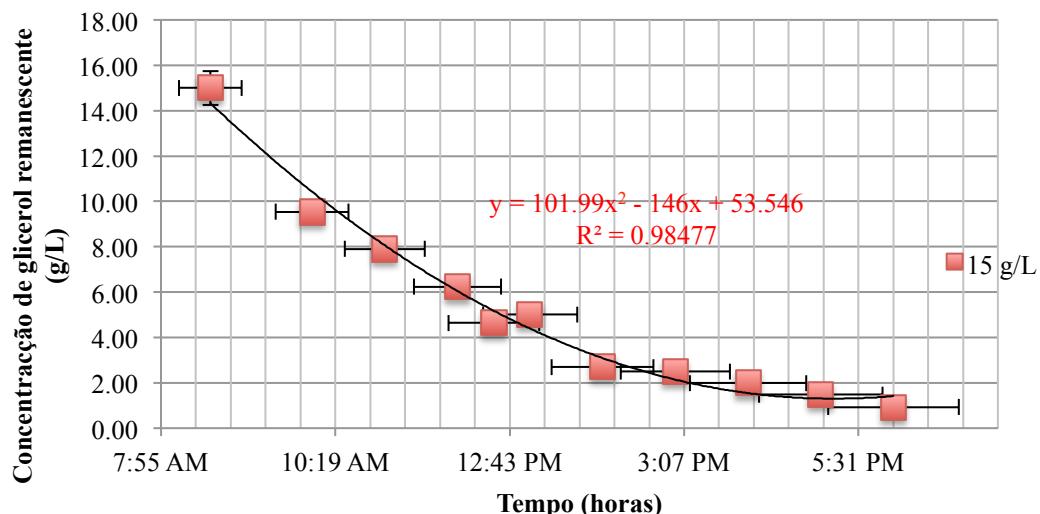


Figura 17: Decaimento do glicerol, sendo concentração inicial de 15 g/L – concentração de 1,24 gSSV.L<sup>-1</sup>.

O decaimento de glicerol inicialmente adicionado na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> pode ser descrita pela equação presente na Figura 18. A degradação do substrato glicerol para as condições iniciais de pH 7,5 e concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol foi de 94%, chegando a 900 mg.L<sup>-1</sup> em menos de 12 horas de incubação.

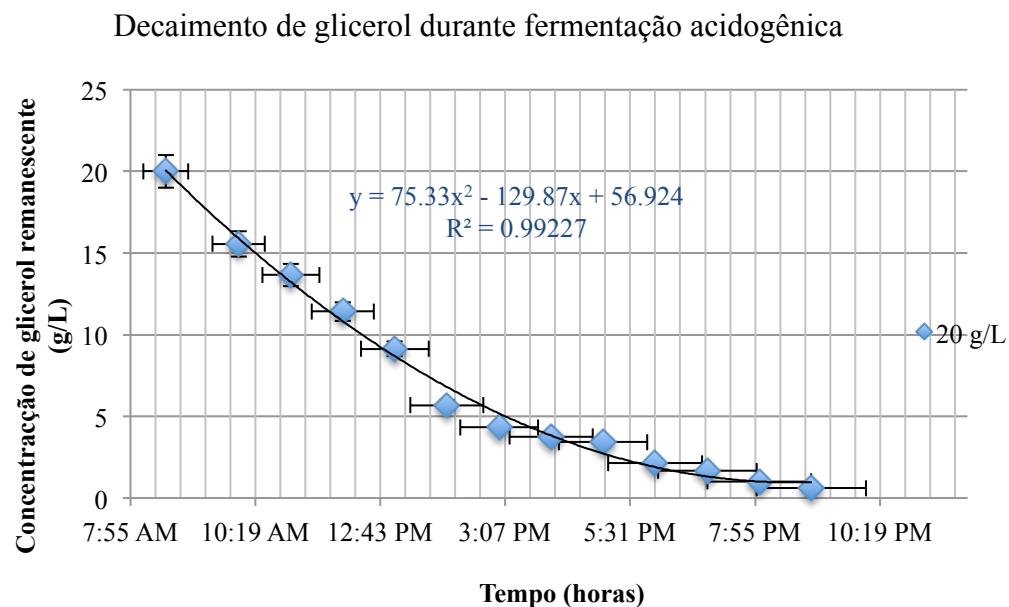


Figura 18: Decaimento do glicerol, sendo concentração inicial de 20 g/L – concentração de 1,24 gSSV.L<sup>-1</sup>

O decaimento de glicerol inicialmente adicionado na concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> pode ser descrita pela equação presente na Figura 14. A degradação do substrato glicerol para as condições iniciais de pH 7,5 e concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol foi de 97%, chegando a 600 mg.L<sup>-1</sup> em menos de 12 horas de incubação.

Os ensaios foram feitos aproximadamente com a mesma concentração de sólidos suspensos voláteis de 1,24g/L. As concentração de glicerol de 15 g.L<sup>-1</sup> e 20 g.L<sup>-1</sup> não apresentaram inibição pelo substrato, sendo que a parte inicial da curva de degradação indica que o decaimento seguiu o mesmo padrão, como na Figura 19.

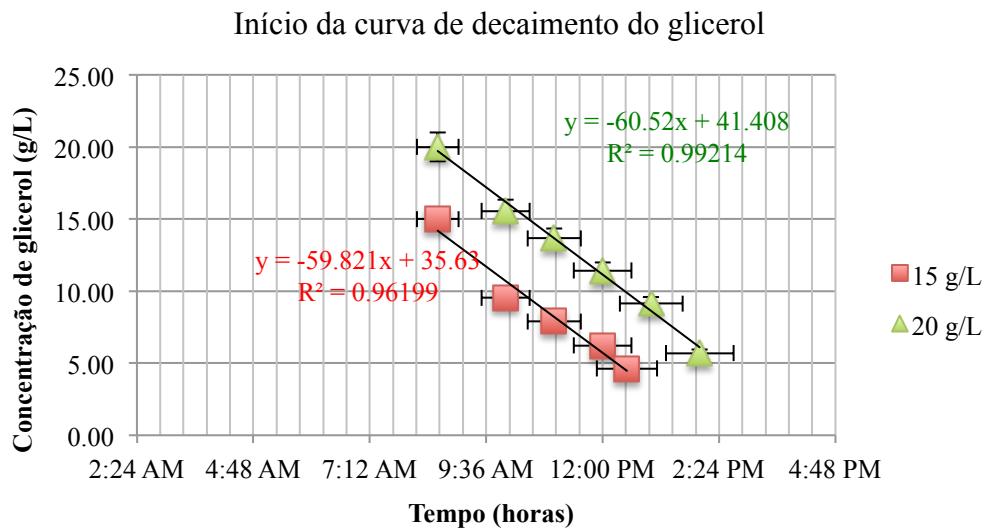


Figura 19: Decaimento do glicerol, sendo concentração inicial de 15 g/L (vermelho) e 20 g/L (verde) – concentração de  $1,24 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa

O decaimento de glicerol inicialmente adicionado na concentração de  $25 \text{ g.L}^{-1}$  pode ser descrita pela equação presente na Figura 20. A degradação do substrato glicerol para as condições iniciais de pH 7,5 e concentração de  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol foi de 99,64%, chegando a  $86 \text{ mg.L}^{-1}$  em menos de 10 horas de incubação. O ensaio foi feito aproximadamente com a mesma concentração de sólidos suspensos voláteis de 3,69 g/L.

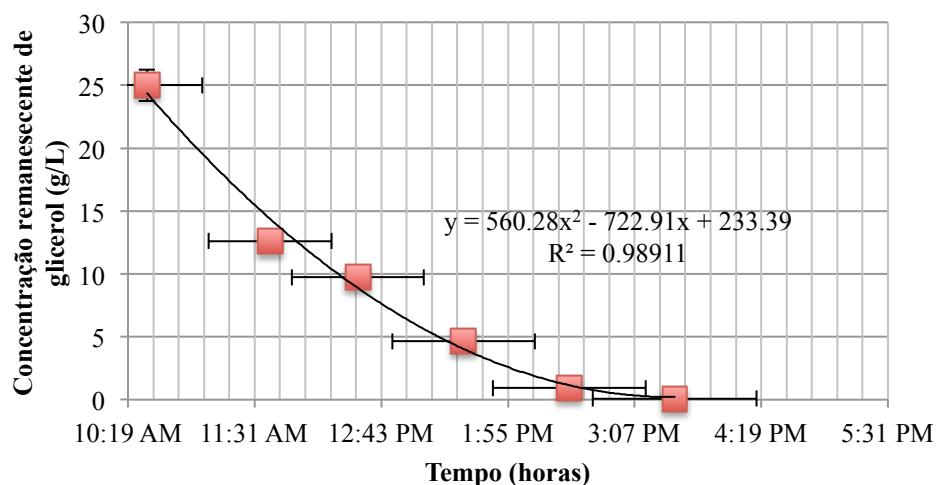
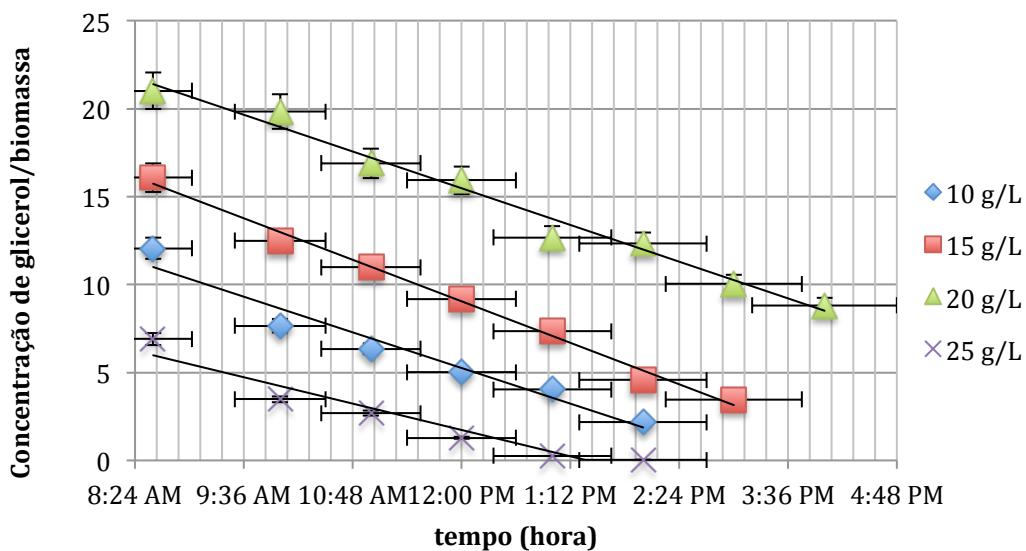


Figura 20: Ensaio fermentação de concentração inicial de glicerol de 25g/L

Outra forma de analisar os resultados para as bateladas de 5, 15 e 20 g.L<sup>-1</sup> é por meio do gráfico que apresenta a relação entre a concentração de glicerol e a concentração da biomassa dada por SSV, tal relação pode ser observada no gráfico abaixo, Figura 21.

Concentração de glicerol em relação a concentração de biomassa

Figura 21: Concentração de glicerol em relação a concentração de biomassa das bateladas de 5, 15, 20 e 25 g.L<sup>-1</sup>

O decaimento de glicerol em relação à concentração de biomassa apresentou linhas de tendências de inclinações semelhantes, sendo o ângulo de inclinação de 149°, 151°, 152° e 149° para os ensaios de 5, 15, 20 e 25 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. As linhas de tendências para decaimento de glicerol em relação à concentração de biomassa ao apresentarem inclinações paralelas umas as outras são indicativos de que não houve inibição pelo substrato e que, os ensaios nas mesmas configurações de temperatura, rotação e meio macronutrientes e pH inicial na faixa de 7,0 e 7,5 resultaram em decaimento de configurações semelhantes para diferentes concentrações iniciais de glicerol.

### 5.3. Verificação da Composição do Meio Nutricional de Macronutrientes - *Glycerol Anaerobe Medium* - a ser utilizado

O ensaio foi realizado em bateladas em frasco Duran de 500 ml, sendo que a temperatura foi mantida em 31°C e a agitação em 120 rpm. As bateladas realizadas com o meio proposto por Barbirato et al. (1995) para fermentação de glicerol por culturas puras se mostrou eficiente quanto à fermentação do glicerol para os experimentos com lodo acidogênico durante os primeiros ensaios, porém, a cada nova inoculação, compostos secundários insolúveis e coloidais eram inseridos juntamente com a biomassa recuperada de ensaios anteriores. Além deste fato observado, a cinética de degradação começou a se

descaracterizar e apresentar maiores intervalos de tempo para o início da fermentação e irregularidades no decaimento da concentração de glicerol ao longo do tempo.

O crescimento de culturas mistas em reatores anaeróbios pode ser influenciado por fatores negativos, tais como pela inibição ativa, em que o sistema é inibido devido aos agentes tóxicos produzidos ou pela inibição passiva, aquela devido à competição pelo mesmo substrato. O meio utilizado por Barbirato et al. (1995) havia sido aplicado a culturas puras; logo, ao ser utilizado por uma cultura mista, foram obtidos resultados variáveis, dentre eles produção de sulfeto e compostos insolúveis ao final de cada ensaio de batelada.

O intuito da avaliação da resposta à mudança na composição do meio macronutriente proposto por Barbirato et al. (1995) foi o de confirmar a redução da atividade de bactérias redutoras de sulfato, que possuem pH ótimo na faixa de 6-7 (DILLING, CYPIONKA), faixa em que o pH é mantido, que, supostamente, vinha ocorrendo nos ensaios de fermentação de glicerol com lodo acidogênico misto. A redução de sulfato a sulfeto interfere negativamente na fermentação acidogênica voltada à produção de ácidos de cadeia curta. Além da interferência negativa, o ensaio busca redução da formação do composto insolúvel observado, FeS, e redução da toxicidade no meio, também, resultante do sulfeto produzido. A composição dos meios está descrita nas tabelas a seguir, Tabela 3 e Tabela 4.

Tabela 3: Meio utilizado por Barbirato et al. (1995) na fermentação de glicerol a partir de culturas puras. Meio I.

<b>Determinação das quantidades do meio Barbirato et al. (1995) utilizado</b>	
Nutrientes	Conc <sub>pretendida</sub> (mg.L <sup>-1</sup> ) (Barbirato)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	3400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1300
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	20
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5

Tabela 4: Meio utilizado por Barbirato et al. (1995) na fermentação de glicerol modificado para culturas puras. Meio II.

Determinação das quantidades do meio Barbirato et al. (1995) modificado	
Nutrientes	Conc <sub>pretendida</sub> (mg.L <sup>-1</sup> ) (Barbirato modificado)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	3400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1300
(NH <sub>4</sub> )Cl	1,619
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	20
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5

O sulfeto, ao ser formado, pode reagir com diversos metais pesados, tais como: zinco, cobre, estanho, ferro, cobalto e níquel, formando sulfetos insolúveis, quando em solução diluída. Para sulfetos insolúveis (metais de transição, ametais e semimetais), a ligação tende a ser mais covalente, podendo haver um considerável grau de ligação metálica, devido à proximidade dos átomos metálicos no retículo. A redução na adição de sulfato pretendia reduzir a formação de sulfeto e com isso contribuir para diminuição da formação de possíveis compostos secundários insolúveis, que acabam por reduzir a disponibilidade de macronutrientes e, por consequência, reduzir a velocidade da degradação do glicerol, conforme demostrado na Figura 22. Além disso, na ausência de sulfato a ser reduzido, as atividades seriam resumidas à degradação do substrato glicerol, tornando o processo mais fácil de ser caracterizado e compreendido.

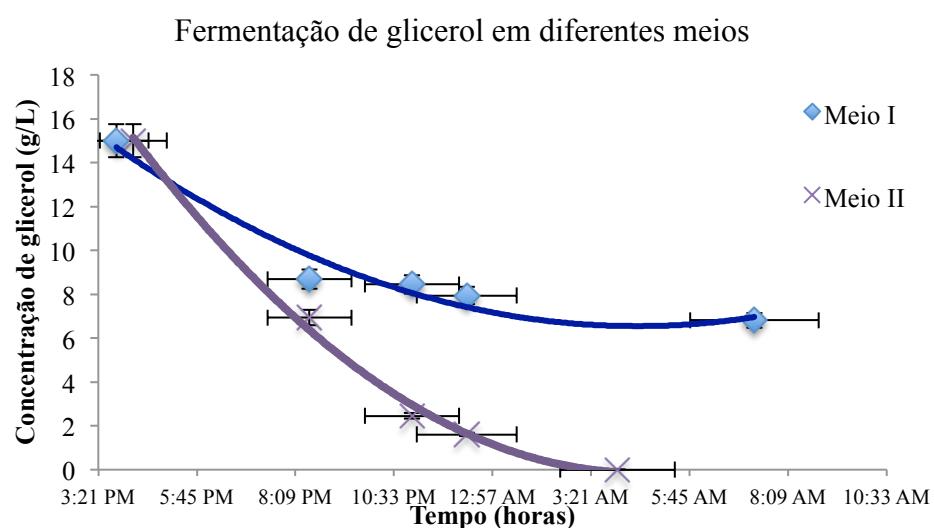


Figura 22: Cinética de fermentação de glicerol para os meios I e II

A redução na adição de sulfato mostrou ser suficiente para estabilizar os ensaios em bateladas e garantir que a fermentação do glicerol inserido ocorresse por completo, sem que glicerol remanescente fosse detectado ao fim da batelada, como pode ser observado pela Figura 18 na curva referente ao “Meio I”. A fermentação do glicerol para as bateladas referentes ao “Meio I” cessou enquanto havia aproximadamente  $7,95 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol para ser degradado.

O glicerol remanescente presente nas bateladas referentes ao “Meio I” pode ser explicado pela falta de macronutrientes suficientes para que a fermentação do glicerol continuasse a ocorrer nas mesmas configurações cinéticas que apresentou no início do ensaio, em que apresentou decaimento da concentração de glicerol de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  para  $8,7 \text{ g.L}^{-1}$  em 4 horas. As bateladas referentes ao “Meio II” não apresentaram glicerol ao final do ensaio e apresentaram decaimento mais eficiente da concentração de glicerol, sendo que as bateladas referentes ao “Meio I” e “Meio II” foram inoculadas com a mesma porcentagem volume/volume de biomassa, 8% ou 20 ml. Pode também ser observado, por meio da Figura 23, a formação de compostos não solúveis que escureceram o sobrenadante fermentado. Um possível composto insolúvel passível de ser formado em tais bateladas, como já anteriormente citado, é o sulfeto de ferro.



Figura 23: Finalização de ensaio em diferentes meios para fornecimento de macronutrientes

#### 5.4. Consumo de glicerol em Meio Nutricional de Macronutrientes modificado, “Meio II”

O ensaio pretendeu observar a degradação de glicerol por meio de fermentação anaeróbia. Para tanto, nova biomassa acidogênica mesofílica foi utilizada como inóculo. O meio utilizado foi o descrito anteriormente como Meio II, reduzindo a concentração de sulfato

adicionado e, por consequência, diminuindo a influencia da redução de sulfato a sulfeto durante os ensaios. Além da mudança no meio e aumento da alcalinidade por meio da adição de bicarbonato de sódio, foi injetado nitrogênio durante a inoculação das bateladas de modo a torná-las anaeróbias. Foram mantidas as condições de temperatura e agitação, 30°C e 120 rpm, respectivamente. O ensaio teve duração de três dias e as medições foram feitas em períodos constantes em intervalos de 4 a 6 horas.

Por meio do gráfico a seguir, Figura 24, é possível observar que o decaimento da concentração de glicerina não apresentou comportamento regular e mesmo que a concentração apresente decaimento, este não apresenta semelhança ou relação entre as diferentes concentrações iniciais analisadas. Ao fim deste ensaio, a biomassa foi acondicionada a 4°C para ser utilizada posteriormente.

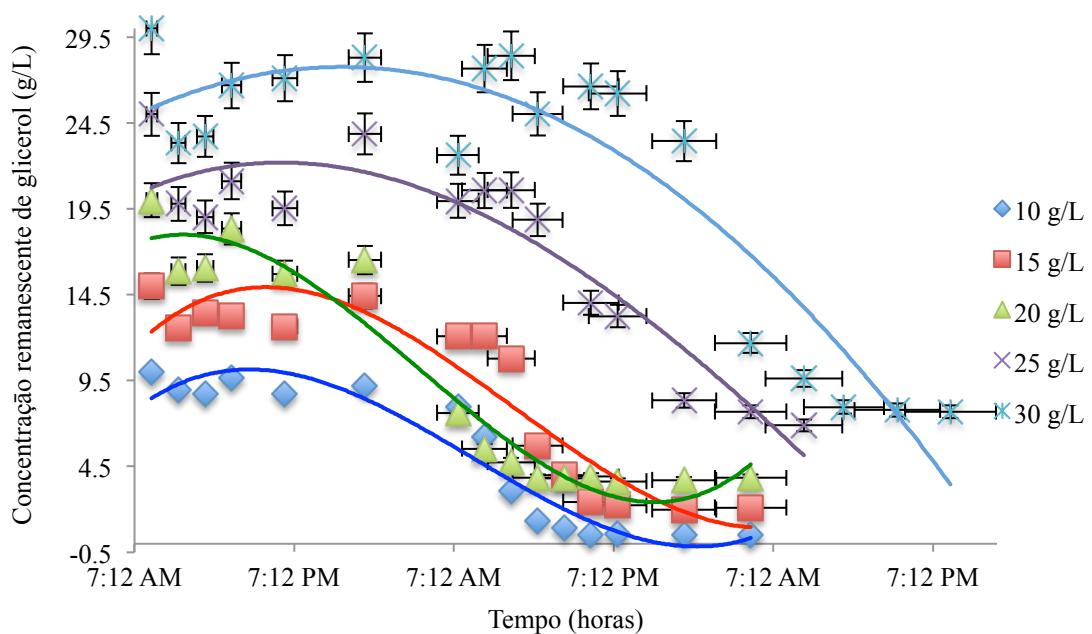


Figura 24: Ensaio A em batelada para diferentes concentrações iniciais de glicerina

Table 5: Dados de monitoramento das bateladas para ensaio A

Concentração inicial de glicerina PA					
	10 g.L <sup>-1</sup>	15 g.L <sup>-1</sup>	20 g.L <sup>-1</sup>	25 g.L <sup>-1</sup>	30 g.L <sup>-1</sup>
pH inicial	7,14	7,4	7,56	7,45	7,34
Sulfato inicial	0,205 mg/L				
Sulfeto inicial	0	0	0	0	0
pH final	5,96	5,94	6	5,29	5,49
Sulfeto final	0.016 mg/L	0.032 mg/L	0.008 mg/L	0.006 mg/L	0.032 mg/L
SSV	1,38	1,33	1,45	1,29	1,66

Para as concentrações iniciais de glicerina entre 10 – 30 g.L<sup>-1</sup>, notou-se decaimento de pH maior que o observado anteriormente em ensaios realizados com a configuração de meio macronutrientes não modificado (meio I). O decaimento do pH para valores entre 5 – 6, sendo a adição de bicarbonato de sódio tenha sido mantida, pode ser explicado pela redução da sulfetogênese no sistema, responsável pelo aumento do pH, de acordo com resultados apresentados pela Tabela 5.

O lodo acidogênico obtido pós ensaio A utilizado como inóculo para os reatores em bateladas relativas ao ensaio B. O ensaio tinha o intuito de obter relações de decaimento para o glicerol que pudessem ser relacionadas às concentrações iniciais do substrato glicerina. As curvas que descrevem a degradação anaeróbia de glicerol apresentaram conformação correspondente entre as diferentes concentrações iniciais aplicadas, sendo o volume de biomassa o mesmo para todas as bateladas de 4,8% em volume (12 mL de biomassa em concentração de 1,8 gSSV/L), e podem ser observadas pela Figura 25.

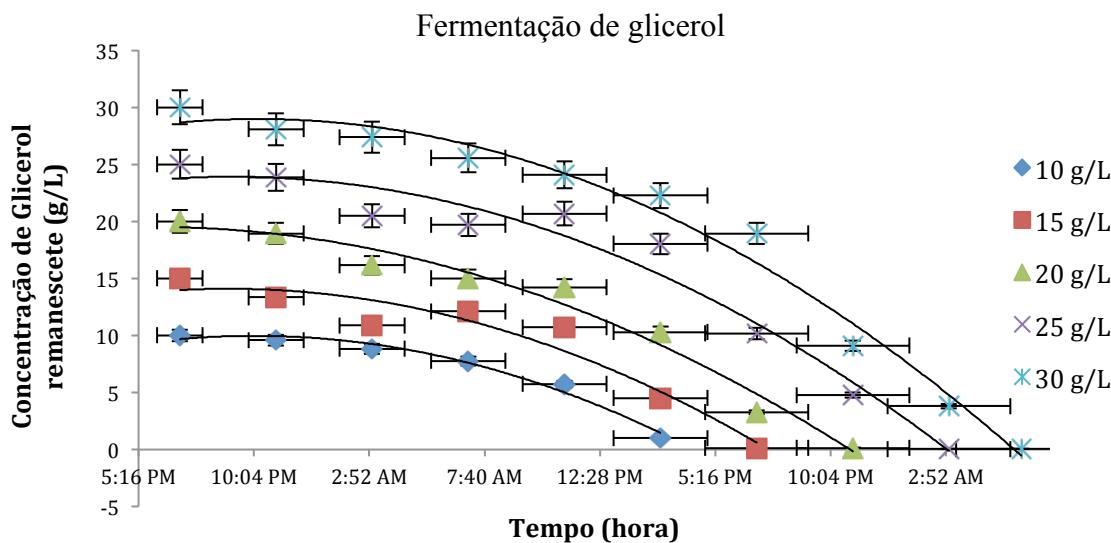


Figura 25: Ensaio B em batelada com diferentes concentrações iniciais de glicerina

O decaimento de glicerol em relação à concentração de biomassa apresentou curvas de inclinações semelhantes. As inclinações semelhantes indicam que não houve inibição pelo substrato e que, os ensaios nas mesmas condições de temperatura, rotação, meio macronutrientes e pH inicial na faixa de 7,0 e 7,5 resultaram em decaimento de configuração semelhante ao encontrado em ensaios posteriores. Dados acerca do monitoramento das bateladas realizadas em ensaio B estão apresentados em Tabela 6.

Tabela 6: Dados de monitoramento das bateladas para ensaio do dia 02 de abril

Concentração inicial de glicerina PA					
	10 g.L <sup>-1</sup>	15 g.L <sup>-1</sup>	20 g.L <sup>-1</sup>	25 g.L <sup>-1</sup>	30 g.L <sup>-1</sup>
Ph inicial	7,45	7,48	7,56	7,54	7,64
Sulfato inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	0,205	0,205	0,205	0,205	0,205
Sulfeto inicial	0	0	0	0	0
Ph final	6,74	6,65	6,45	6,38	6,32
Sulfeto final (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-
SSV	1,24	1,36	1,28	1,18	1,32

Devido ao decaimento de pH observado em ensaio A, para as concentrações iniciais de glicerina entre 10 – 30 g.L<sup>-1</sup>, aumentou-se a quantidade de alcalinidade adicionada no início das bateladas. A necessidade de um aumento na adição de alcalinidade pode ser atribuída

à redução da sulfetogênese, responsável por certo aumento de pH em ensaios anteriores. O valor do pH observado ao final das bateladas, então, variou entre 6 – 6,5, dependendo das concentrações iniciais de glicerol de sódio aplicadas. A variação de 7 – 7,5 para 6 – 6,5 foi observada em ensaios anteriores, tornando a comparação entre os ensaios mais fácil e reduzindo as variáveis a serem analisadas nos sistemas.

### 5.5. Produção de Ácidos Graxos Voláteis

Quanto aos resultados observados para a produção de ácidos de cadeia curta, é possível observar que, em todas os ensaios de concentrações iniciais de glicerina variando entre 10 e 30 g.L<sup>-1</sup>, houve aumento considerável na concentração final de ácido acético resultante do processo fermentativo em relação aos ensaios anteriormente realizados com “Meio I”, em que apresentavam concentrações para ácido acético de 100 – 150 mg.L<sup>-1</sup> (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Resultado de ácidos lidos em HPLC para ensaios de fermentação de glicerol, concentrações iniciais variantes (10 – 30 g.L<sup>-1</sup>) em meio II e mesmo SSV aplicado

Ácidos em HPLC	Concentração inicial de glicerina PA				
	10 g.L <sup>-1</sup>	15 g.L <sup>-1</sup>	20 g.L <sup>-1</sup>	25 g.L <sup>-1</sup>	30 g.L <sup>-1</sup>
Ácido cítrico (mg.L <sup>-1</sup> )	33,82	28,00	3,8	35,16	4,03
Ácido málico (mg.L <sup>-1</sup> )	26,06	24,43	28,5	26,78	28,56
Ácido succínico (mg.L <sup>-1</sup> )	207,43	166,70	315,06	266,60	303,59
Ácido lático (mg.L <sup>-1</sup> )	1174,63	905,32	1305,24	1159,30	1265,48
Ácido fórmico (mg.L <sup>-1</sup> )	382,4	297,94	1159,77	638,97	1129,21
<b>Ácido acético (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>461,624</b>	<b>418,14</b>	<b>660,82</b>	<b>566,79</b>	<b>642,59</b>
Ácido propiônico (mg.L <sup>-1</sup> )	79,334	51,77	64,18	94,99	53,75
Ácido isobutírico (mg.L <sup>-1</sup> )	86,11	109,08	111,18	125,20	110,09
Ácido isovalérico (mg.L <sup>-1</sup> )	36,81	35,00	76,919	15,68	17,46
Ácido butírico (mg.L <sup>-1</sup> )	46,00	0,00	21,22	56,68	79,45
<b>Total Ácidos (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>2534,21</b>	<b>2036,38</b>	<b>3746,69</b>	<b>2986,16</b>	<b>3634,20</b>

Tabela 8: Resultado de ácidos lidos em HPLC para ensaios de fermentação de glicerol, concentrações iniciais variantes ( $10 - 30 \text{ g.L}^{-1}$ ) em meio I e mesmo SSV aplicado

Ácidos em HPLC	Concentração inicial de glicerina PA				
	$10 \text{ g.L}^{-1}$	$15 \text{ g.L}^{-1}$	$20 \text{ g.L}^{-1}$	$25 \text{ g.L}^{-1}$	$30 \text{ g.L}^{-1}$
Ácido cítrico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0	4,08	4,8	4,69	20,73
Ácido málico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	19,17	179,19	28,75	28,48	37,48
Ácido succínico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	98,35	100,51	259,56	162,82	57,73
Ácido lático ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	456,98	605,90	1484,83	383,22	842,05
Ácido fórmico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0	270,92	924,39	1902,26	1497,98
<b>Ácido acético (<math>\text{mg.L}^{-1}</math>)</b>	<b>138,12</b>	<b>153,23</b>	<b>138,46</b>	<b>255,85</b>	<b>184,89</b>
<b>Ácido propiônico (<math>\text{mg.L}^{-1}</math>)</b>	<b>1,62</b>	<b>32,68</b>	<b>66,14</b>	<b>117,06</b>	<b>145,28</b>
Ácido isobutírico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	24,81	65,09	54,95	87,72	73,58
Ácido isovalérico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	31,29	132,30	391,70	75,72	161,75
Ácido butírico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	435,92	0	0	33,13	61,40
Total Ácidos ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	1206,26	1543,90	3353,57	3050,92	3082,87

As concentrações, ainda que variáveis entre um ensaio fermentativo e outro, realizados nas mesmas condições, apresentaram aumento na produção de ácido acético ao utilizar-se meio modificado, meio II. Em ensaios posteriores realizadas com o meio II, o comportamento favorável à formação de ácido acético e propiônico continuou, conforme mostrado nas figuras seguintes.

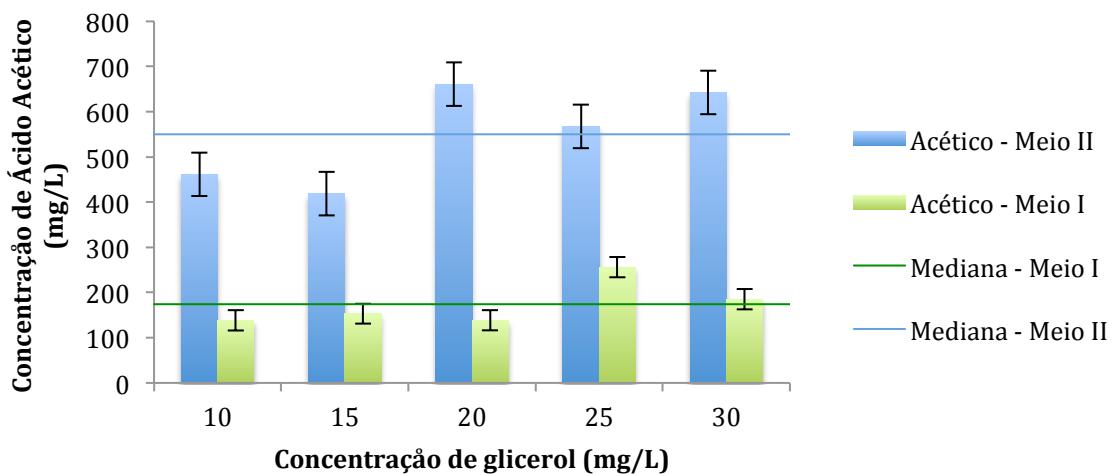


Figura 26: Concentração de Acetato em bateladas voltadas à fermentação em “Meio I” e “Meio II”

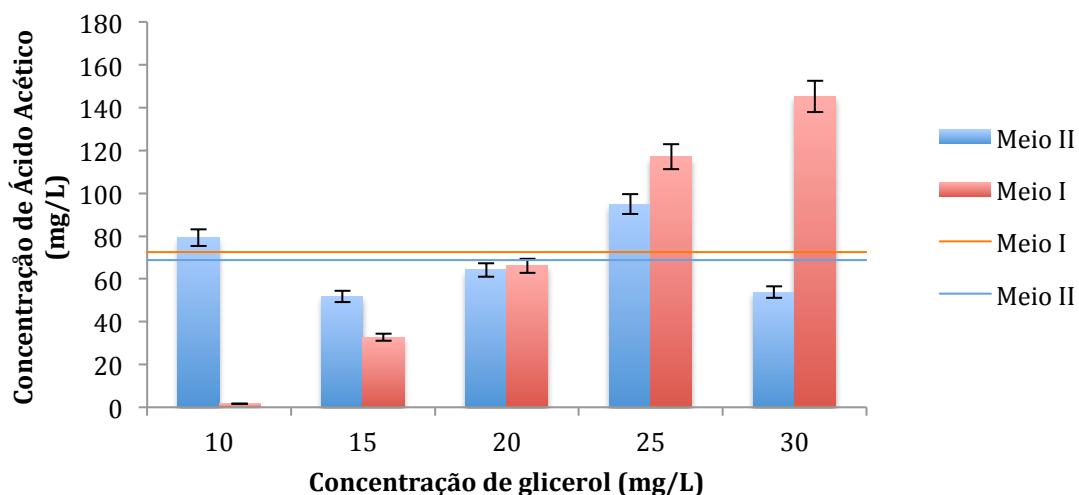


Figura 27: Concentração de Propionato em bateladas voltadas à fermentação em “Meio I” e “Meio II”

Segundo Bock et al.<sup>6</sup> (1995 *apud* GODOI, 2014), as BRS degradam ampla faixa de substâncias, tais como formiato, acetato, metanol, piruvato, propionato, butirato, ácidos graxos de cadeia longa e ramificada, lactato, álcool, fumarato, succinato, malato e compostos aromáticos.

Os resultados expostos na Figura 26 mostram considerável aumento da concentração final de ácido acético pós fermentação utilizando NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio,

<sup>6</sup> BOCK, A.; PRIEGER-KRAFT, A.; SCHÖNHEIT, P. Pyruvate—a novel substrate for growth and methane formation in *Methanosaeca barkeri*. *Archives of microbiology*, 161.1: 33-46, 1994.

anteriormente colocado no meio macronutriente na forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , em uma adaptação do meio utilizado por Barbirato et al. (1995), Tabela 4. Esse resultado pode ser justificado pela redução do uso deste e outros ácidos de cadeia curta e outros compostos de fácil assimilação, tal como o etanol, como doadores de elétrons por bactérias redutoras do íon sulfato (BRS). Resultados obtidos para a produção de propionato, Figura 27, não indicam variações consideráveis em resposta à adaptação realizada no meio macronutrientes voltado à fermentação de glicerol.

### 5.6. pH

Ensaios realizados em pH 7,0, sem adição de alcalinidade, mostrou que a variação de pH devido à formação de ácidos de cadeia curta formados a partir da fermentação de aproximadamente 8 g/L de glicerol reduz o pH do sistema para 4,5, aproximadamente. Em ensaios preliminares, descritos anteriormente, o pH de 4,5, aproximadamente, inibe a fermentação e formação de compostos menos complexos, tais como ácidos graxos voláteis.

Com a adição de alcalinidade, o pH foi acertado para 7,5 por meio do acréscimo de bicarbonato ao meio macronutrientes. A adição de bicarbonato se mostrou eficaz até a concentração de substrato igual a 30 g/L, sendo que, para todas as concentrações testadas, a degradação do substrato glicerol foi total, e não mais parcial como anteriormente ocorria sem adição de alcalinidade. Os resultados para a variação de pH em ensaios com e sem adição de alcalinidade estão presentes resumidamente na Figura 28.

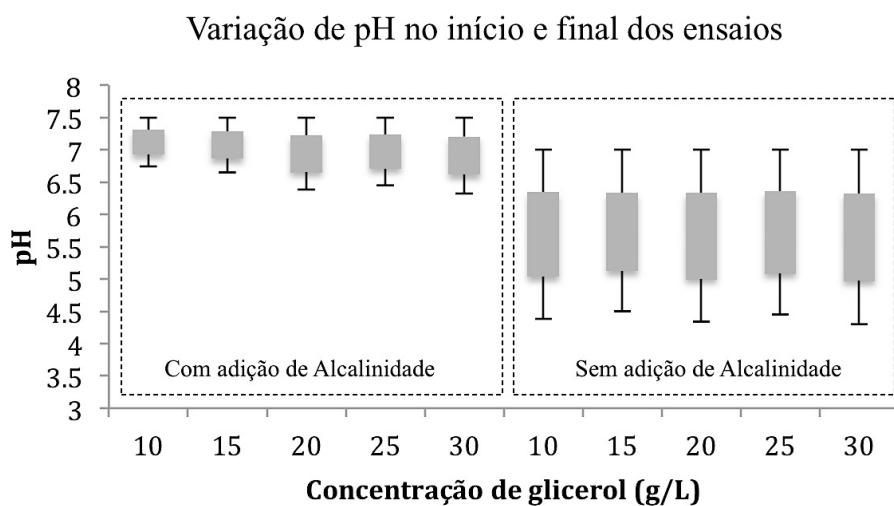


Figura 28: Variação de pH no início e final dos ensaios

### 5.7. Remoção biológica de nitrogênio

A pesquisa foi desenvolvida de modo a estudar o processo de desnitrificação e remoção biológica de fósforo, bem como analisar a eficiência do uso do fermentado de

glicerol, estudado durante a primeira etapa do presente projeto, como fonte exógena de carbono em sistemas de batelada alimentada e aeração intermitente. O afluente à batelada alimentada, esgoto sintético, era constituído por concentrações conhecidas para macronutrientes e micronutrientes. Como já mencionado anteriormente, foram testados volumes diferentes para a adição do fermentado, a aplicação de diferentes volumes de fermentado objetivava diminuir a vazão de doadores de elétrons no reator desnitrificante de modo que a remoção de nutrientes não fosse prejudicada.

Segundo Payne (1973), a natureza da fonte de carbono utilizada tem influência sobre a razão DQO/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> requerida para que haja completa redução do composto nitrato pelas bactérias desnitrificantes. Dentre os estudos realizados tendo glicerol como fonte única de carbono em ensaios voltados a remoção biológica de nutrientes, está a relação DQO/N sugerida por Carneiro (2015) de 5,22 gDQO/gN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Sendo a DQO filtrada média do fermentado produzido igual a 9180 mg DQO para cada litro de fermentado, optou-se, para a primeira sequência de ciclos, pela adição de 40 mL do fermentado durante etapa anóxica do sistema de batelada alimentada voltada à remoção de nutrientes. Por tanto, cada ciclo contava com a adição de 40 mL de fermentado, ou 367,2 mg DQO, resultando em uma relação de aproximadamente 6,12 gDQO para 1 g de nitrato a ser reduzido.

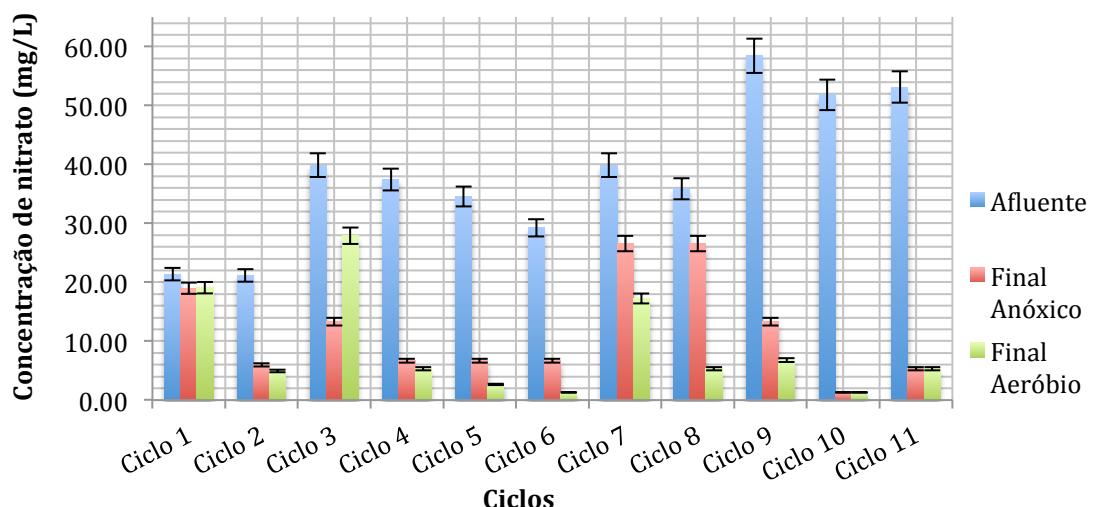


Figura 29: Desnitrificação para ciclos em reator em batelada alimentada e aeração intermitente

Os resultados obtidos para o decaimento da concentração de nitrato durante os ciclos estabelecidos e realizados conforme configuração inicial, adição de 40 ml de fermentado em batelada alimentada (Figura 29), indicaram que a desnitrificação passou a ocorrer de forma

estável a partir do ciclo 8. A eficiência média de remoção de nitrato correspondente aos ciclos de 8 a 11 foi de aproximadamente  $90,25 \pm 4,50\%$ .

A eficiência média de remoção de nitrato ao considerar a totalidade de ciclos operados com a configuração inicial mencionada, foi calculada em aproximadamente  $80,90\% \pm 27,39$ , sendo a remoção média a partir do ciclo 3 igual a  $98,75\% \pm 11,95$ . Mais especificamente, ainda para a totalidade dos ciclos, a remoção biológica de nitrato alcançou uma média de  $70,28\% \pm 22,09$  ao final da etapa anóxica. Os resultados indicaram que o fermentado de glicerol, ao ser aplicado para uma relação de  $6,8 \text{ gDQO/gNO}_3^-$ , mostrou ser adequado e capaz de condicionar o sistema de modo que o lodo misto possa conduzir processos desnitrificantes.

Para a segunda etapa de avaliação da eficiência da aplicação de fermentado de glicerol como fonte exógena de carbono, foi testada a adição de 20 mL de fermentado para cada ciclo iniciado. A vazão possibilitava a entrada de  $3,4 \text{ gDQO/gNO}_3^-$ . Para a maioria das fontes de carbono, uma razão mássica de DQO/N- $\text{NO}_3^-$  de 3 a 6 permite a redução completa de nitrato para nitrogênio elementar (NARCIS; REBHUN; SCHEINDORF, 1979; BHAGAT; SKINDE, 1982). No entanto, devido a complexidade da composição do fermentado e concentração limitada de ácidos de cadeia curta, faz-se necessário análise da resposta do sistema a adição da quantidade reduzida da fonte de carbono, apresentada pela Figura 30.

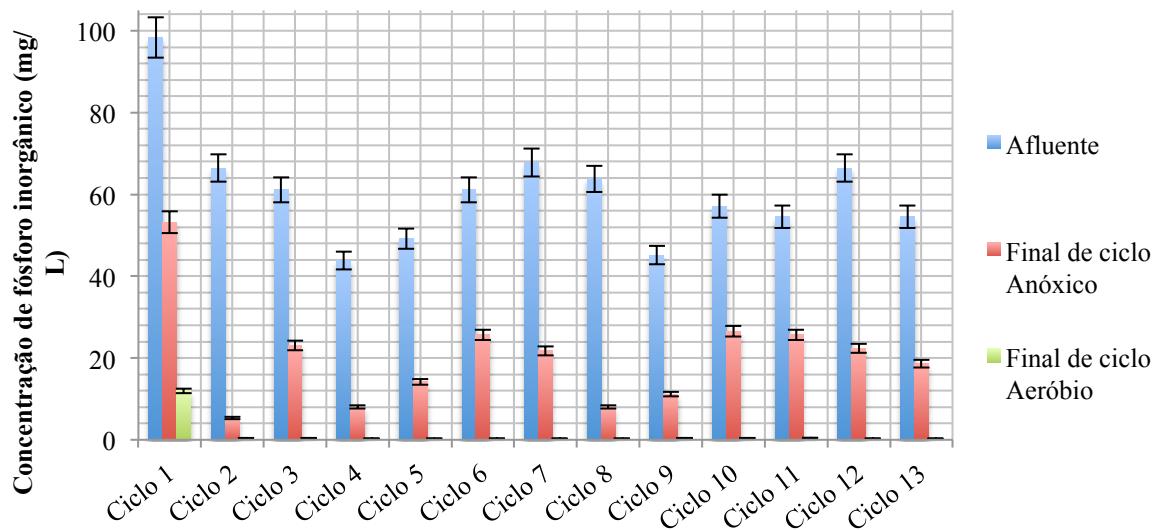


Figura 30: Desnitrificação para ciclos em reator em batelada alimentada e aeração intermitente

Os resultados para a segunda etapa de aplicação de fermentado em etapa anóxica de batelada alimentada indicaram que a desnitrificação completa ocorreu ao final da etapa aeróbia. Por tanto, a adição de 20 mL de fermentado no início da etapa anóxica,  $3,4 \text{ gDQO/gNO}_3^-$ ,

mostrou ser suficiente para a desnitrificação completa, quando esta ocorre em sistema de batelada alimentada, aeração alternada e ciclos simultâneos. Mais especificamente, a remoção de nitrogênio, redução de nitrato, alcançou uma média de  $67,73\% \pm 12,66$  de eficiência ao final da etapa anóxica e  $98,96\% \pm 3,10$  de eficiência ao final da etapa aeróbia.

### 5.8. Remoção biológica de fósforo

O primeiro ensaio em batelada alimentada e aeração intermitente contou com a adição de 40 mL de fermentado de glicerol durante a etapa anóxica, como mencionado. Para cada um dos ciclos, o reator era alimentado com volume de 260 mL de esgoto sintético a ser tratado. Os resultados indicavam que a quantidade de fósforo afluente ao sistema era superior ao que supostamente estava sendo inserido apenas pelo efluente sintético, aproximadamente 10 mg/L. A quantidade de fósforo afluente se mostrava acima do pretendido devido a quantidade de fósforo presente no fermentado. Análises de amostras do fermentado sendo inserido apontaram valores de 630 mgP a 600 mgP para cada litro de fermentado sendo produzido, devido a solução tampão sendo adicionada aos macronutrientes.

A concentração de fósforo elevada no fermentado estava sendo responsável pela adição extra de cerca de 28 mgP ao sistema. O sistema, embora voltado para remoção de nutrientes, não se mostrou eficiente em remover altas concentrações de fósforo durante os ciclos iniciais. A reduzida eficiência durante os primeiros ciclos resultou em acúmulo de fósforo no sistema, o remanescente de fósforo de ciclos anteriores juntava-se às concentrações do novo afluente e, ainda que houvesse remoção, as concentrações iniciais do sistema de batelada alimentada sempre apresentavam valores maiores em relação aos ciclos anteriores.

A remoção de fósforo passou a ser significativa a partir do ciclo 9, em que, durante a fase anóxica, houve liberação de fosfato e, durante a fase aerada, redução de fósforo em relação à concentração medida no inicio do mesmo ciclo. Os resultados demonstraram uma acréscimo de  $13,99\% \pm 12,34$  na concentração de fósforo, enquanto que após a fase aerada houve redução na concentração de fósforo em  $19,73\% \pm 12,30$ . Em relação ao ciclo 10, após a fase anóxica, o valor para a concentração de fósforo medido aumentou em  $11,11\% \pm 1,44$ , sendo que ao final da fase aerada a redução na concentração de fósforo foi de  $22,22\% \pm 1,25$ . Os resultados para o ciclo 11 demonstraram uma acréscimo de  $27,27\% \pm 6,64$  na concentração de fósforo, enquanto que após a fase aerada houve redução na concentração de fósforo em  $36,36\% \pm 8,32$ .

Como anteriormente mencionado, o resultado de fósforo inorgânico para amostras retiradas do fermentado usado nos 8 primeiros ciclos de batelada alimentada e aeração

intermitente mostraram valores de aproximadamente 630 mg de fósforo inorgânico presente para cada litro de fermentado. Ainda que o volume de adição de fermentado fosse pequeno em relação ao volume de controle da batelada, este era o responsável por altas concentrações de fósforo no início de cada um dos ciclos, além de ser responsável por acúmulo parcial de fósforo ao final de cada ciclo que, devido a características intrínsecas do processo de batelada alimentada, era remanescente e passava para ciclos seguintes. No gráfico 31 é possível identificar aumento da concentração inicial de fósforo a ser tradada, indicando que, apesar de cada ciclo trazer uma redução significativa da quantidade de fósforo, a mesma não se mostrava suficiente e parte do fósforo remanescente era passado para ciclos seguintes, diminuindo a eficiência aparente do sistema de tratamento.

Para que o problema da quantidade excedente de fósforo fosse solucionada, foi proposto eliminar a adição dos compostos fosfatados, como macronutrientes na fermentação do glicerol. A fermentação do glicerol sem adição dos compostos fosfatados se deu por completo e não houve aumento significativo do tempo necessário para que todo o glicerol viesse a ser consumido. O fermentado, então, apresentou concentração nula para fósforo e pode ser adicionado sem problemas na sessão de ciclos seguintes, proposta pelo ensaio 2.

No entanto, o período de concentrações altas para fósforo durante os ciclos que ocorreram neste primeiro ensaio ajudou na seleção de organismos acumuladores de grânulos de polifosfato em relação aos organismos acumuladores de glicogênio. Segundo Oehmen et al. (2007), baixas relações de COD/P favorecem crescimento de organismos acumuladores de polifosfato (OAP). A maioria dos estudos relacionados a sistemas BPR estão relacionados a águas residuárias com baixas concentrações iniciais para fósforo, poucos estudos estiveram voltados a efluentes de concentrações superiores a 20 mg/L.

Segundo Sudiana et al.<sup>7</sup> (1999 *apud* MUKERRINS et al., 2003), efluentes de cargas baixas para fósforo restringem o desenvolvimento de organismos acumuladores de polifosfato, favorecendo o estabelecimento de organismos acumuladores de glicogênio. Portanto, em situações como a apresentada pelo primeiro ensaio, em que efluente rico em fósforo foi inserido durante os ciclos de 1 a 11, Figura 31, organismos acumuladores de fósforo foram favorecidos em relação aos acumuladores de glicogênio. O favorecimento de OAP durante o primeiro ensaio ou configuração inicial, Figura 5, foi fundamental para as altas porcentagens de remoção de fósforo no sistema de batelada alimentada tendo como fonte de

---

<sup>7</sup> SUDIANA, I. M., MINO, T., SATOH, H., NAKAMURA, K., & MATSUO, T. Metabolism of enhanced biological phosphorus removal and non-enhanced biological phosphorus removal sludge with acetate and glucose as carbon source. *Water Science and Technology*, 39(6), 29-35, 1999.

carbono o fermentado de glicerol, quando este passou a ser alimentado com esgoto sintético de baixas concentrações iniciais para fósforo, 10 mgP/L.

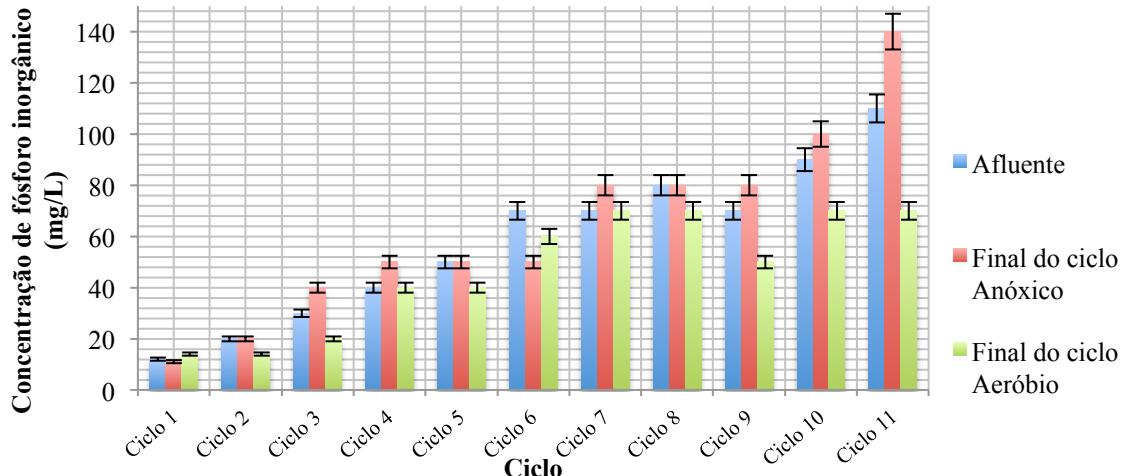


Figura 31: Remoção biológica de fósforo para ciclos em reator em batelada alimentada e aeração intermitente

Muitos estudos relatam uma significante proporção de organismos acumuladores de Poli-P que simultaneamente reduzem nitrato a medida que acumulam fósforo quando na ausência de oxigênio dissolvido utilizando o PHB formado (FREITAS; TEMUDO; REIS, 2005; KERRN-JESPERSEN; HENZES, 1993; KUBA et al., 1993; SMOLDERS et al., 1995). A ocorrência de organismos acumuladores de Poli-P que usam nitrato como elétron acceptor poderia justificar a reduzida liberação de ortofosfato para o meio durante a etapa anóxica, além de parte da remoção de nitrato ocorrer ainda em fase aeróbia. Para tanto, na presença de nitrato durante a etapa anóxica, Poli-P estaria sendo formado por alguns microrganismos, enquanto outra parte dos organismos acumuladores, que utilizam unicamente oxigênio como acceptor de elétron, estariam liberando ortofosfato para o meio.

A Figura 32 associa valores da resposta do sistema com relação a remoção biológica de fósforo, nitrato e DQO para ciclos operados com adição de 40 ml de fermentado durante as etapas anóxicas.

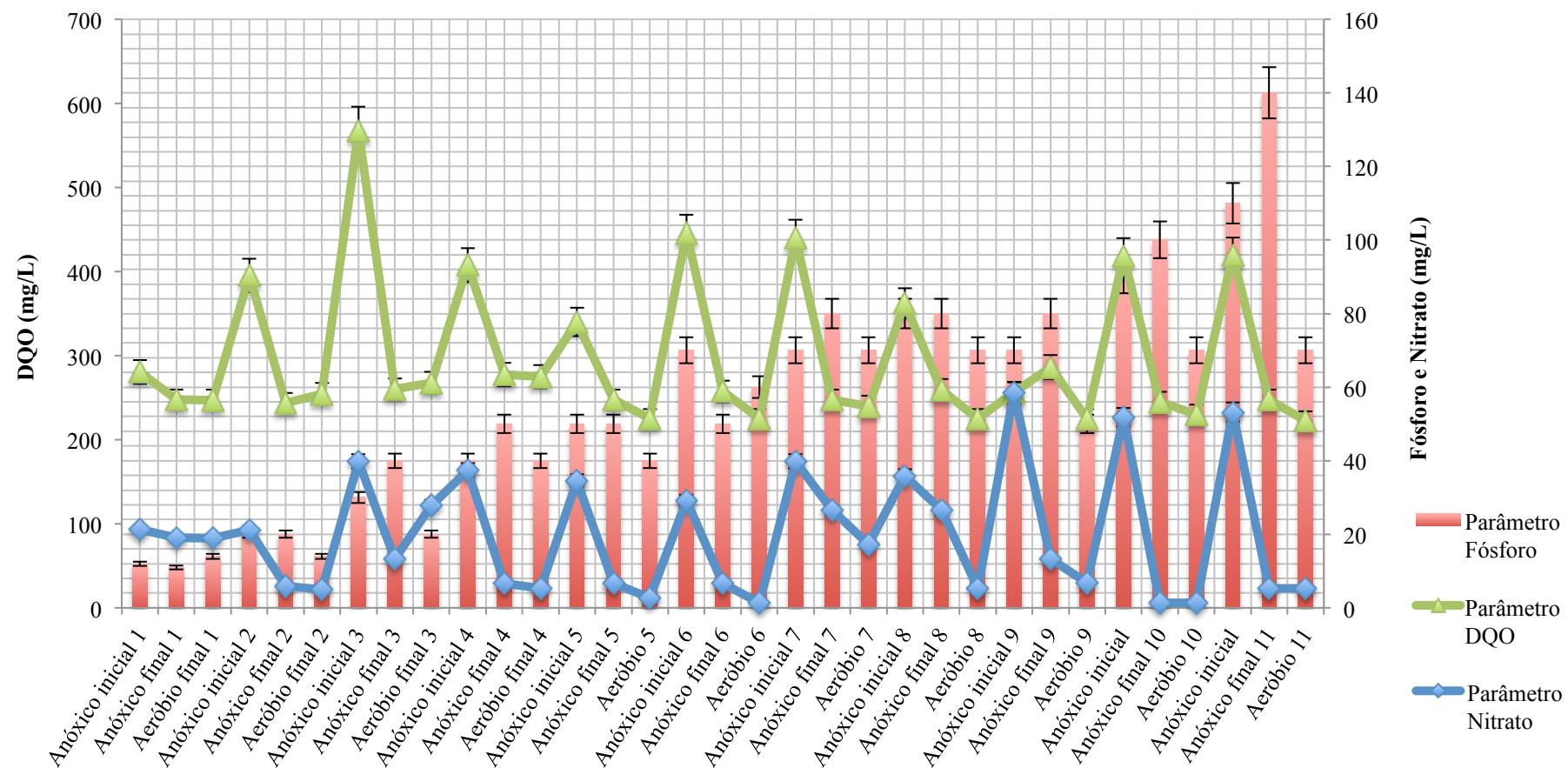
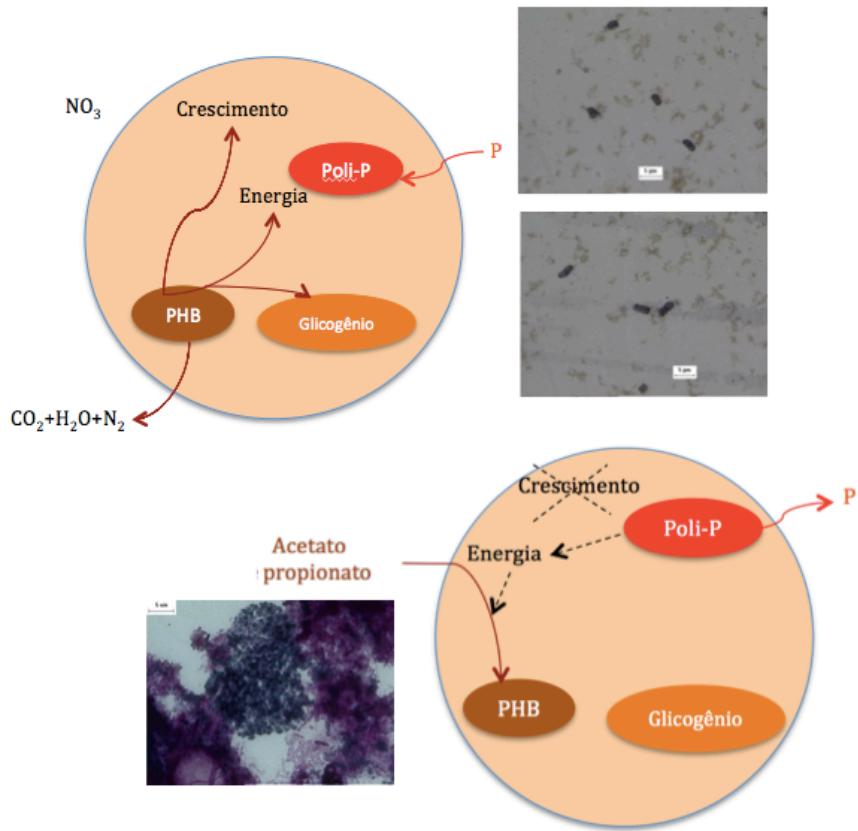


Figura 32: Resposta do sistema de batelada alimentada para segundo ensaio para os parâmetros DQO, fósforo e nitrato em mg/L

Estudos que intencionavam a separação e isolamento de organismos DPAOs ajudaram a identificar as espécies pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Pasteurella*, and *Sphingomonas* (JORGENSEN e PAULI, 1995 apud GEBREMARIAM et al., 2011).

Organismos OAP e DPAO eram pensados como organismos diferentes (BARKER e DOLD, 1996; MEINHOLD et al., 1999). No entanto, segundo Ahn et al. (2002), a presença de organismos acumuladores de polifosfato foi confirmada em sistemas operados para condições anaeróbias/anóxicas. De acordo com estudos realizados por Zeng et al. (2003), organismos OAP e DPAO apresentam-se como o mesmo organismo, para lodo PAO em condições anóxicas durante as primeiras 5 horas, acúmulo de polifosfato e redução de nitrato não foram verificados. A situação se inverteu após as 5 horas, período em que se deu início a desnitrificação e o acúmulo de grânulos de polifosfato.

Segundo Sevivour, Mino e Onuki (2003), se uma amostra de biomassa for retirada de etapa aeróbia de reator em sistema EBPR para análise microscópica, células marcadas pela presença de grânulos de polifosfato serão abundantes, mas PHB intracelular não foi detectado. A situação se inverte para amostras retiradas em etapa anaeróbia, em que células regularmente apresentam PHB e não polifosfato. Esses resultados caracterizam processos EBPR, em que são descritos por liberação de ortofosfato e formação de PHB em etapa sem aeração e formação de grânulos de polifosfato em conjunto com a quebra de PHB em etapa aeróbia.



### Etapa Anóxica

Figura 33: Amostra de biomassa retirada ao final de etapa não aerada. A microscopia de coloração possibilitou o reconhecimento da presença dos grânulos de PHB e de polifosfato

A amostra de biomassa retirada de etapa não aerada apresentou predominância de grânulos PHB nas células. No entanto, ainda que ao final da etapa anóxica, grânulos de polifosfatos foram identificados, como apresentado pela Figura 33. A presença em etapa anóxica de grânulos de PHB, como esperado, e de grânulos de polifosfato foi indicativo de que parte dos organismos acumuladores estariam utilizando nitrato como acceptor final de elétron, portanto, ainda que na ausência de aeração, grânulos de polifosfatos estariam sendo formados a medida que o excesso de ortofosfato era liberado por organismos acumuladores restritos ao oxigênio como acceptor final de elétron.

De acordo com Hascoet e Florentz<sup>8</sup> (1985 *apud* BARAK, 2000), em condições anóxicas e em presença de fonte externa de carbono, foram reportados remoção biológica de fósforo e redução de nitrato ocorrendo simultaneamente. Após redução do ácido acético, organismos acumuladores passam a produzir polifosfato.

<sup>8</sup> HASCOET, M. C., FLORENTZ, M., & GRANGER, P. Biochemical aspects of enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Water science and technology*, 17(11-12), 23-41, 1985.

Além da remoção simultânea de fósforo e nitrogênio em fase anóxica, estudos voltados para liberação de fósforo durante etapa anóxica realizados por Wachtmeister et al. (1997) mostram que o lodo EBPR de sistemas anóxico/aeróbio apresentam comportamento complexo para liberação e acúmulo de fósforo em presença simultânea de elétron acceptor e ácidos de cadeia curta, tal como ácido acético. Desta maneira, a quantidade de fósforo liberada em fase anóxica não deve ser utilizada para quantificar organismos DPAO (HU; WENTZEL; EKAMA, 2002).

Ainda segundo Wachtmeister et al. (1997), para um lodo contendo diferentes espécies de organismos acumuladores de polifosfato, para determinadas condições e parâmetros, PAO capazes de acumularem fósforo em condições anóxicas podem se estabelecer no sistema, ainda que tenham reduzida eficiência quando comparado a remoção aeróbia de fósforo.

A fisiologia de outros organismos tem sido relatados como casos isolados em sistemas voltados à desnitrificação e remoção biológica de fósforo. A título de exemplo, *Paracoccus denitrificans* sintetiza grânulos de polifosfato em presença de nitrato ou oxigênio, porém na presença de fonte de carbono externa. Desta forma grânulos de PHB não são utilizados anoxicamente para produção de grânulos de polifosfatos. Além disso, a remoção simultânea de fósforo e nitrogênio aconteceu na ausência de uma fase anaeróbia, considerada um requisito para qualquer sistema EBPR convencional. Esses resultados, bem como os resultados encontrados nos ensaios que foram conduzidos durante este projeto, indicam que grande variedade de organismos desnitrificantes e acumuladores de fósforo podem ser melhor estudados e investigados (BARAK, VAN RIJN, 2000a; 2000b).

A maioria dos estudos relacionados a remoção de fósforo é conduzida a partir de lodos obtidos de sistemas EBPR. Dentre as principais característica para sistemas EBPR estão o requerimento de aeração alternada, que proporciona etapa aeróbia/anóxica ou aeróbia/anaeróbia, a habilidade de produzir PHB e a capacidade de obtenção de energia para o crescimento celular na ausência de fonte externa de carbono por meio do uso do PHB armazenado intracelularmente.

Segundo Barak (2000), em contraste com organismos acumuladores convencionais, determinados organismos, tais como o *P. denitrificans*, sintetizam grânulos de polifosfatos apenas na presença de fonte externa de carbono durante as etapas anóxicas ou aeróbias. Diferentemente de organismos acumuladores de polifosfato (PAO), *P. denitrificans* não utiliza PHB como fonte de energia para síntese de Poli-P, a energia proveniente do PHB intracelarmente armazenado é suficiente para redução do nitrato. Contudo, a respiração por meio da redução de nitrato não resulta em crescimento perceptível.

Portanto, outra possível explicação para a síntese de grânulos de polifosfato ainda que em etapa sem aeração, etapa anóxica, seria a presença desses organismos heterotróficos desnitrificantes capazes de sintetizar Poli-P, tal como apresentado por Barak (2000), ao isolar em laboratório organismos desnitrificantes e sintetizadores de Poli-P em presença de fonte externa de carbono, tal como *P. denitrificans*.

Como mencionado, o período de concentrações altas para fósforo que ocorreram durante os ciclos relativos ao ensaio de configuração inicial, 40 ml de fermentado contendo alta concentração de fósforo sendo adicionado, ajudou na seleção de organismos acumuladores de grânulos de polifosfato em relação aos organismos acumuladores de glicogênio. A Figura 34 a seguir apresenta valores da resposta do sistema com relação a remoção biológica de fósforo para ciclos operados com adição de apenas 20 ml de fermentado durante as etapas anóxicas.

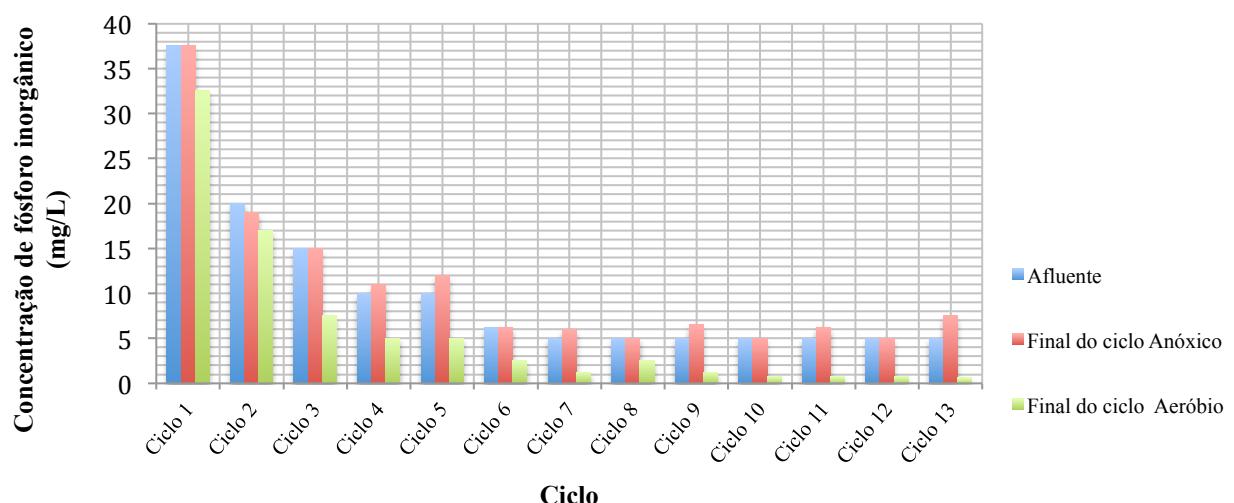


Figura 34: Remoção biológica de fósforo para ciclos em reator em batelada alimentada e aeração intermitente

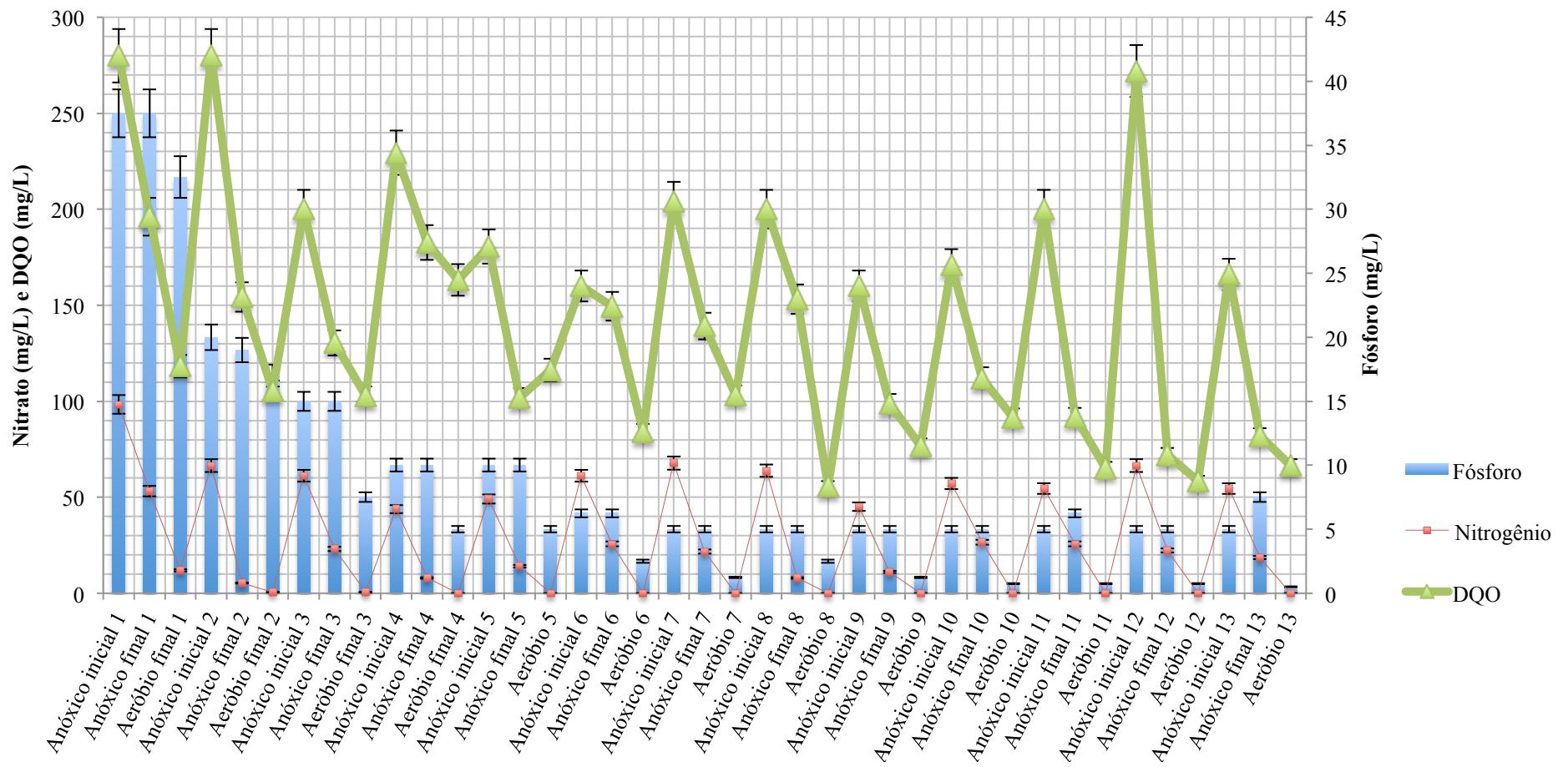
Os resultados para o ciclo 11 demonstraram uma acréscimo de 50% na concentração de fósforo ao final da etapa anóxica, enquanto que, após a fase aerada, houve redução na concentração de fósforo em  $90\% \pm 10,68$ , chegando ao valor de 0,5 mgP/L em efluente tratado. A média de remoção de fósforo para os ciclos completos durante o segundo ensaio foi de  $60,26\% \pm 24,54$  ou  $68,64\% \pm 15,97$ , excluindo os dois primeiros ciclos. A Figura 35 associa valores da resposta do sistema com relação a remoção biológica de fósforo, nitrato e DQO para ciclos operados com adição de apenas 20 ml de fermentado durante as etapas anóxicas.

Em condições anóxicas, DPAO são capazes de gerar aproximadamente 40% menos energia quando comparados a organismos acumuladores de polifosfatos restritos ao oxigênio

como elétron acceptor (ZENG et al., 2003). A geração inferior de energia é responsável por crescimento celular cerca de 20 a 30% menor em relação à OAP (KUBA et al., 1996). Os organismos DPAOs são considerados, de acordo com Kuba et al. (1994), menos eficientes que organismos OAPs com relação a produção de energia, resultando em reduzido crescimento celular e, consequentemente, reduzida produção de lodo.

Resultados para sólidos suspensos voláteis realizados ao longo dos ciclos pela batelada alimentada apresentam crescimento celular reduzido, de 1,22 gSSV/L (após inocular) para 1,82 gSSV/L (final do ciclo 13), o que respalda a ocorrência de organismos capazes de armazenar grânulos de polifosfato, ainda que utilizando nitrato como acceptor final de elétrons.

Outra análise que confirma a remoção biológica de fósforo obtida pelo segundo ensaio foi realizada por meio da digestão de alíquota contendo parte da biomassa ao final dos ciclos 12 e 13, o resultado para análise de fósforo da amostra após digestão resultou nos valores 100 mgP/L para o ciclo 12 e 105 mg/L para o ciclo 13. O resultado aponta que entre um ciclo e outro foi acumulado e permaneceu no sistema o 5 mgP/L inserido



## 5.9. Microscopia

### 5.9.1. Coloração de Neisser

A Coloração de Neisser é comumente aplicada na necessidade de coloração de tricoma e dos grânulos intracelulares. A coloração pode ser classificada em dois grupos, os grupos são denominados Neisser positivo e Neisser negativo. A coloração de Neisser utiliza como corante principal o azul-de-metileno (catiônico), como descrito anteriamente.

A aplicação do tratamento com o corante azul-de-metileno resulta, então, em duas colorações possíveis, coloração azul-violeta, indicando que o organismo identificado é Neisser positivo e, por tanto, acumulador de grânulos de polifosfato ou coloração amarelo-castanha, para Neisser negativo (Figura 36). A lâmina preparada foi analisada e resultou em imagens como as apresentadas pela Figura 37, pelas imagens obtidas é possível identificar as células de organismos responsáveis pela acumulação de polifosfato, mais precisamente são observados pontos mais escuros intracelulares que podem ser descritos como sendo os grânulos de polifosfato acumulados.

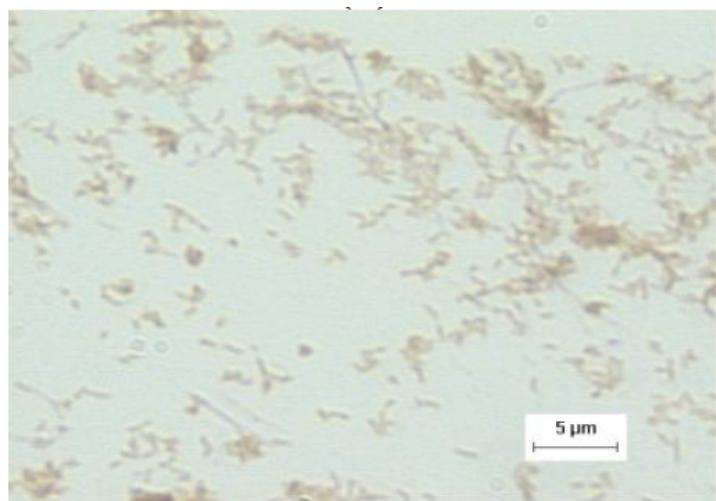


Figura 36: Coloração Neisser negativa  
Fonte: Miqueleto (2006)

Segundo Sevivour, Mino e Onuki (2003), células representantes da etapa anaeróbia de um sistema de aeração intermitente, que apresentam coloração positiva para PHA, não respondem como positivo para a coloração de Neisser. O observado é que células que respondem como Neisser positivo apresentam-se como cocobacilos organizados em pares, como apresentado em Figura 37. A amostra representativa da etapa não aerada (anóxica) do sistema em bateladas de aeração intermitente apresentou coloração Neisser positivo e células com configuração e forma semelhante a descrição feita por Sevivour, Mino e Onuki (2003). O

resultado indica que, ainda que a amostra tenha sido retirada para análise ao final da etapa não aerada, grânulos de poli-P estavam sendo formados.

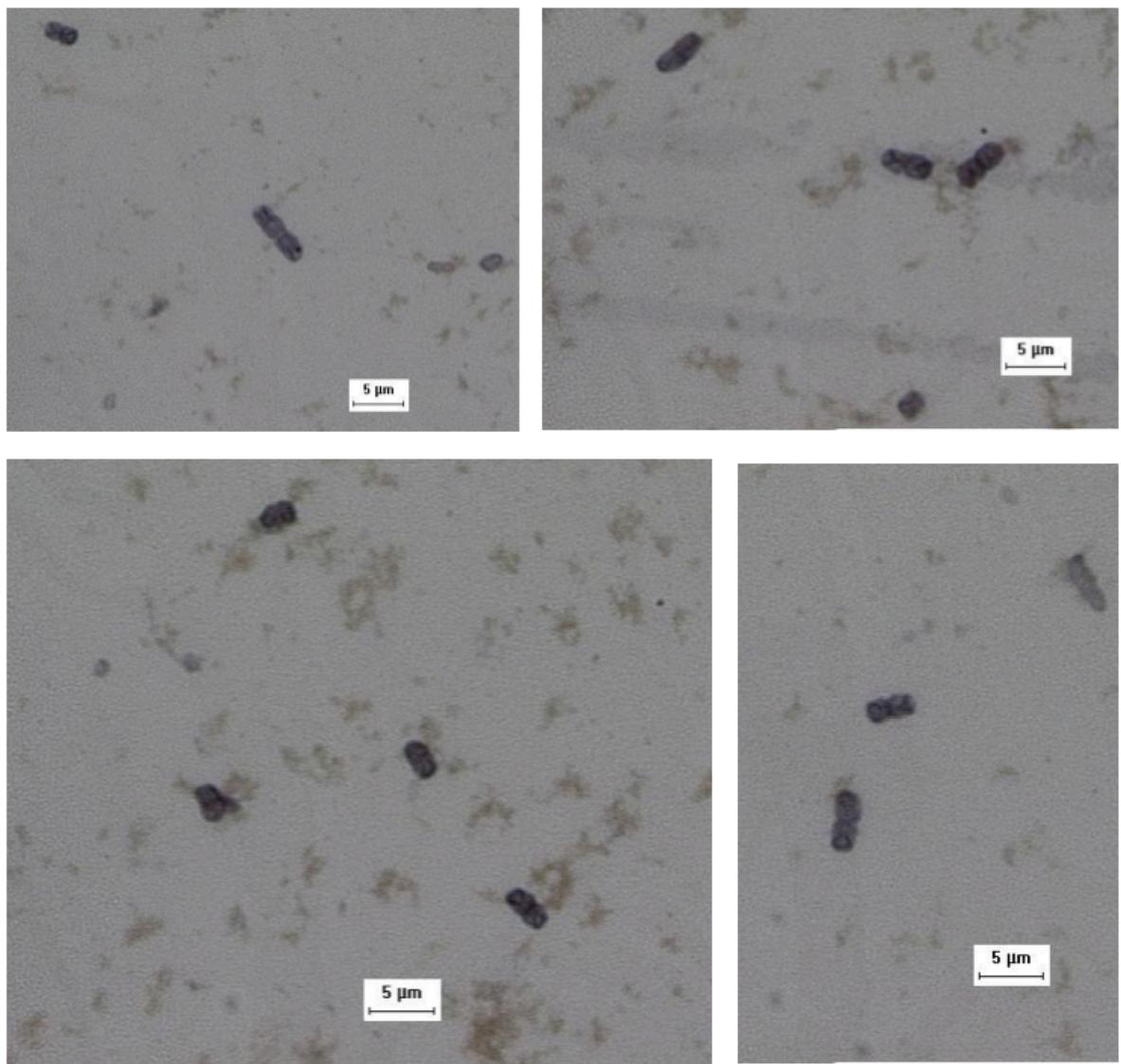


Figura 37: Microscopia e Coloração de Neisser aplicada na identificacao dos grânulos intracelulares de polifosfatos. Cocobacilos em pares, diplococos

#### 5.9.2. Coloração de Polihidroxialcanoato

Após a aplicação dos corantes, a lâmina foi examinada em óleo de imersão, em iluminação direta e aumento de 1000 vezes. Para casos em que PHB está presente, as células tornam-se escuras, enquanto que na ausência intracelular de PHB o citoplasma apresenta-se em uma coloração magenta. Como pode ser verificado pela Figura 38, a coloração se apresentou positiva para presença de grânulos de PHB em amostras retiradas em etapa não aerada do sistema. O contraste entre Coloração Polihidroxialcanoato positiva, Figura 38, e negativa, Figura 39, pode ser melhor representado pelo contraste entre as figuras a seguir.

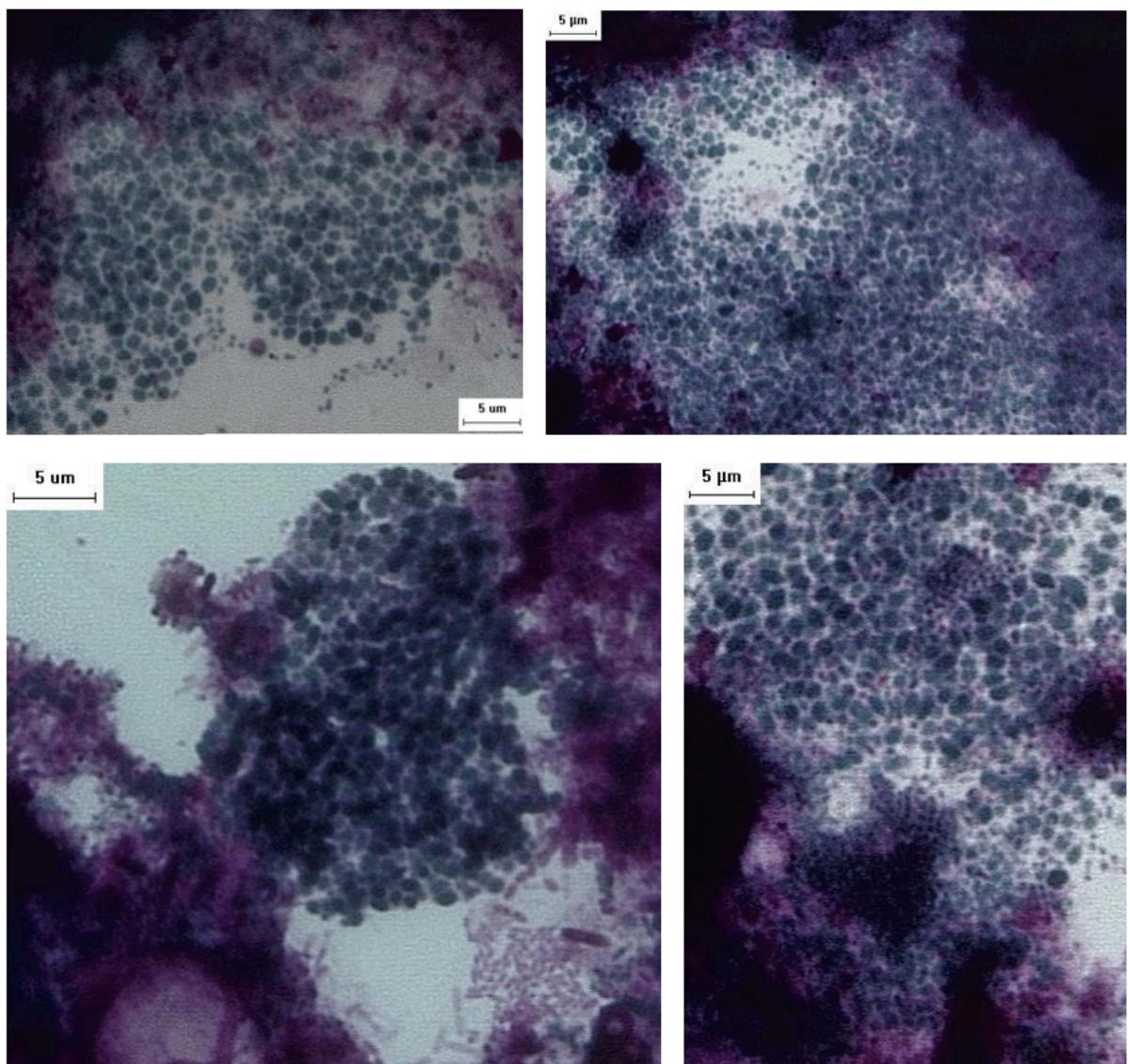


Figura 38: Microscopia para identificação dos grânulos de PHB, mostrando a típica associação entre as células marcadas como coloração positiva para Polihidroxialcanoato em grandes conjuntos

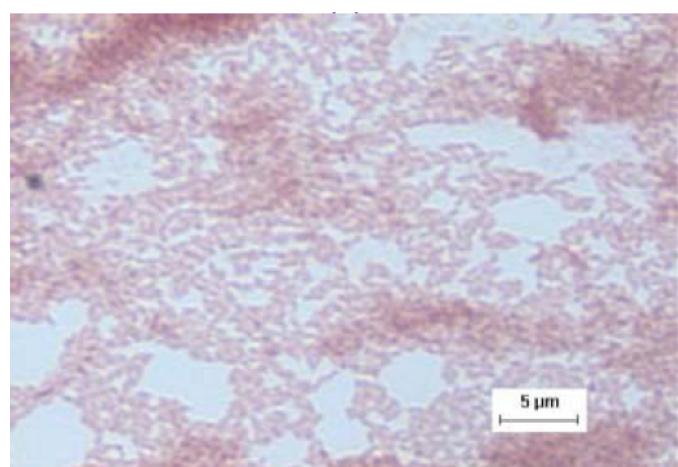


Figura 39: Coloração Polihidroxialcanoato negativa  
Fonte: Miqueleto (2006)

De acordo com Sevivour, Mino e Onuki (2003), como uma das características comuns de plantas EBPR, as células que aparecem como cocobacilos em pares ou diplococos, aparentes e marcadas por microscopia de coloração Neisser ou Coloração de Polihidroxialcanoato, são geralmente organizadas em conjuntos associados. Embora possam por vezes se apresentarem como células fracamente dispersas ao longo da biomassa, supõe-se que tal disposição distinta seja implementação relacionadas aos organismos PAO. A consequência da organização do grupo de células de PAO em EBPR não é clara, embora bom desempenho EBPR é frequentemente associada ao aparecimento de biomassa aglomerada, como na Figura 38.

### 5.9.3. Contraste de fase

O contraste de fase permitiu melhor observação da diversidade de organismos presente no lodo após operação dos ciclos em batelada alimentada e aeração intermitente. Sem aplicação de corante, a microscopia de contraste de fase permite identificação de espécimes por meio da conversão de diferentes índices de refração para cada constituinte celular, que são representados cada qual por determinada intensidade luminosa.

Para avaliação microscópica da alíquota de biomassa retirada da fase anóxica do último ciclo da batelada alimentada, foi utilizado microscópio óptico de contraste de fase Olympus BX60, acoplado à câmara habilitada com captura de imagem Evolution QE e software Image-Pro Plus 4.5. A amostra era preparada de modo que uma gota era sobreposta a uma camada fina de Ágar na concentração 2%, ainda sobre a camada Ágar e amostra posicionou-se uma lamínula e esperou-se cerca de 30 minutos para realização da leitura. A metodologia foi aplicada de modo a reduzir o movimento dos organismos celulares na amostra, a fim de obter imagens nítidas.

Na Figura 39 foi identificado a presença de possíveis compostos de enxofre intercelularmente armazenados e representados como pontos brancos e claros. Também foi possível observar a presença de flagelados, além de cistos de protozoários e ciliados livres.

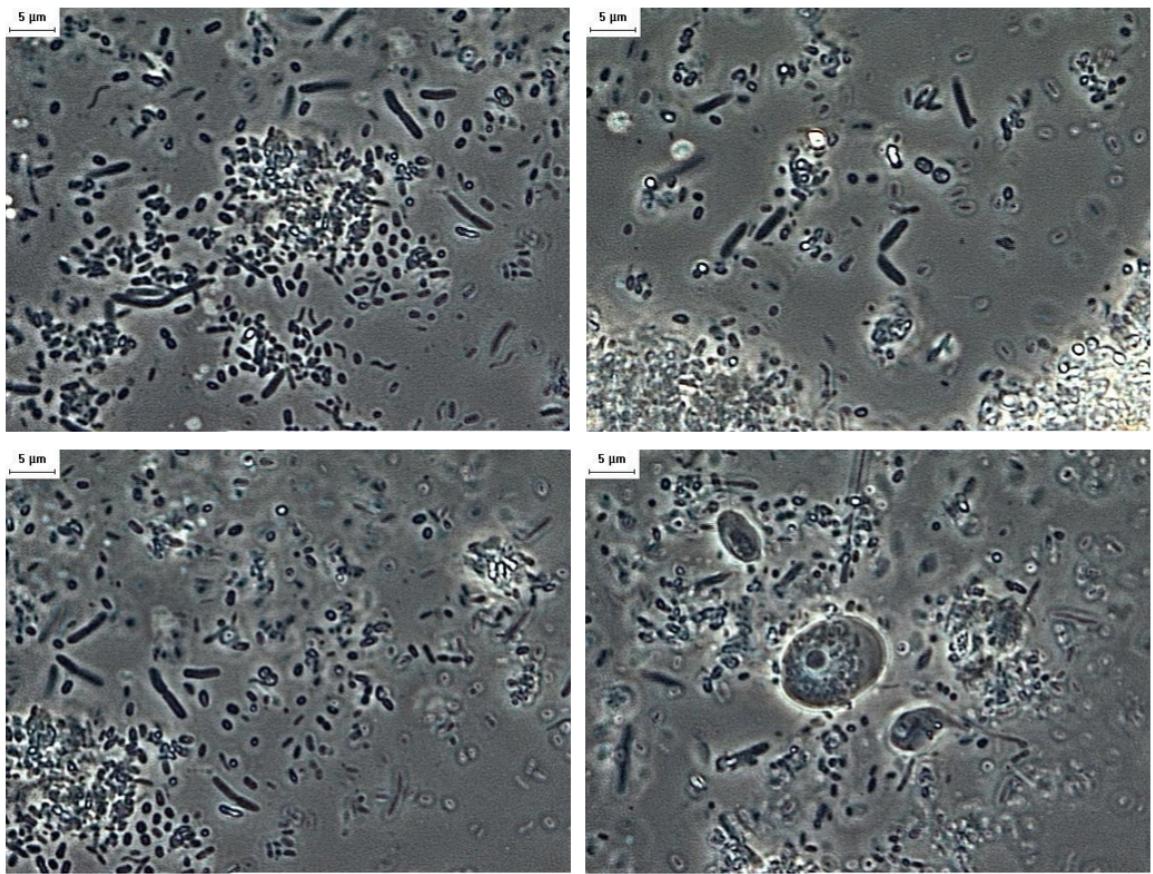


Figure 36: Contraste de fase. Possivelmente, pontos claros e brancos representam grânulos de polifosfato intracelular



## **6. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO CIENTÍFICO NA XIII SEMANA DA ENGENHARIA AMBIENTAL**

A primeira etapa do projeto referente à fermentação de concentrações iniciais de glicerol variáveis, bem como as modificações realizadas para que o meio de macronutrientes sugerido por Barbirato et al. (1995) pudesse ser aplicado à fermentação de glicerol por cultura mista de forma a não comprometer a produção de ácidos de cadeia curta, principalmente acetato e propionato, foi apresentada no dia 20 de maio de 2016 em XIII Semana da Engenharia Ambiental, na Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), que teve como coordenador o Professor Dr. Luiz Antônio Daniel.

A produção científica relativa às apresentações realizadas na XIII Semana da Engenharia Ambiental (ISBN-ISBN:978-85-8023-037-6) encontra-se cadastrada no Dedalus e os anais eletrônicos estão disponíveis no Portal de Eventos Científicos da EESC, acesso ao portal: <http://soac.eesc.usp.br/index.php/SEAMB/seamb>.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As atividades científicas da primeira etapa do projeto de pesquisa teve foco na fermentação do glicerol e na seleção de condições e parâmetros adequados para obtenção de ácidos graxos voláteis e demais compostos de fácil assimilação. Observou-se que a concentração de biomassa de 0,6 gSSV/L apresentou, para as condições aplicadas, fermentação constante do substrato glicerol, bem como apresentou retenção celular também adequada para que a biomassa enriquecida se renovasse e pudesse ser aplicada em ensaios seguintes.

Os dados de ensaios cinéticos realizados para diferentes concentrações iniciais de glicerol apontaram a concentração de 20 g/L como sendo a concentração inicial de substrato que resultou na obtenção de concentrações significativas de ácidos de cadeia curta, principalmente ácido acético. Mais especificamente, para a concentração de 20 g/L a produção de acetato foi cerca de  $20,26 \pm 12,79\%$  superior à média de produção alcançadas pelas demais concentrações iniciais de glicerol empregadas.

Observou-se que a aplicação do fermentado de glicerol em concentrações limitadas e configuração de aeração intermitente em sistema de batelada alimentada, em casos de ciclos constituídos por etapas anóxica e aeróbia, favoreceu o aparecimento de organismos acumuladores de fósforo e redutores de nitrato.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o fermentado de glicerol é adequado e pode ser aplicado como doador de elétrons na remoção de nutrientes em batelada alimentada de aeração intermitente e tempo de ciclo de 4 horas e 20 minutos, quando em configuração e modo de operação correspondentes ao segundo ensaio, em que foram adicionados 20 ml de fermentado em ciclos sucessivos.

A resposta do sistema de batelada alimentada e aeração intermitente seguindo as relações decretas anteriormente com relação à remoção biológica de fósforo e tempo de ciclo de 4 horas e 20 minutos apresentaram resultados eficientes, sendo o último ciclo responsável pela remoção de  $90 \pm 10,68\%$  do fósforo afluente ao sistema. Além da remoção ter atingido porcentagens satisfatórias para fósforo em efluente tratado, foi constatado que após o sexto ciclo houve estabilização da performance atingida pelo sistema em batelada.

O sistema apresentou remoção com relação ao nitrato afluente ao sistema de tratamento. Mais especificamente, a remoção durante a etapa anóxica ou não aerada alcançou uma média de  $67,73 \pm 12,66\%$ ; enquanto que ao final da etapa aeróbia a média de remoção foi de  $98,48 \pm 3,10\%$ .

Ensaios de microscopia evidenciaram que, ainda que ao final de fase não aerada, grânulos de PHB e grânulos de polifosfato foram simultaneamente identificados. A presença em etapa anóxica de grânulos de polifosfato foi indicativo de que parte dos organismos acumuladores de grânulos de polifosfato estariam utilizando nitrato como acceptor final de elétron, resultando na remoção biológica simultânea de fósforo e nitrogênio em fase anóxica.



## 8. DIFICULDADES ENCONTRADAS

- Seleção da melhor rotação e temperatura que possibilitou decaimento constante de glicerol, aproximando os ensaios de uma configuração previsível, dependendo do SSV aplicado.
- Obtenção de Curva de Calibração para o método de detecção de glicerol considerando a faixa de concentração estudada por este projeto, cujos valores são muito superiores quando comparados a faixa de concentrações passíveis de serem detectados pelo método enzimático.
- Adaptação do Meio Macronutrientes sugerido por Barbirato et al. (1995) voltado à fermentação por culturas puras para, no caso deste projeto, fermentação a partir de lodo acidogênico mesofílico composto por culturas mistas.
- Determinação da melhor taxa de aplicação de SSV para que o uso da biomassa enriquecida em ensaios sucessivos não fosse prejudicado pelo tempo de retenção celular de cada ensaio.
- Ensaios reduzindo tempo de aeração trabalhando etapa anaeróbia e anóxica, com intuito de observar a eficiência da remoção de nutrientes.
- Operação da batelada alimentada de modo manual apresentou dificuldades quando preciso extender o experimento de modo a alcançar número maior de ciclos, até obter certo padrão de remoção constante.
- Dificuldade em operar o sistema manualmente, retirar amostras a cada duas horas e realizar as análises simultaneamente. Deste modo, amostras foram congeladas e os ciclos foram parados seguindo padrão pré estabelecido, não devido a observação e resposta dos parâmetros. Sendo assim, os parâmetros foram analisados apenas após parada do sistema. Tal condição conduziu a repetições de ensaios em batelada alimentada até que resultados fossem satisfatórios e o número de ciclos suficientes.



## 9. ESTUDOS SUGERIDOS

Durante os ensaios voltados à fermentação de glicerol para a concentração de 20 g/L deste substrato, foi passada uma amostra da composição gasosa do *headspace* em Cromatógrafo Gasoso (GC 2010 Shimadzu) com detector de condutividade térmica (TCD) e gás argônio como carregador. As temperaturas de operação do injetor, detector e coluna foram 30° C, 200° C e 230° C, respectivamente. O resultado para a análise da composição gasosa do *headspace* resultou na produção de aproximadamente 2.46 mmol de H<sub>2</sub> /SSV após 12 horas de incubação. O resultado sugere que o estudo da produção de biogás durante a etapa de fermentação do glicerol é passível de ser estudado.



## REFERÊNCIAS

- ABAD, S; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology advances*, 30.3: 733-741, 2012.
- Ahn, J.A., Daidou, T., Tsuneda, S. and Hirata, A. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Res.* 36, 403-412, 2002.
- ALMEIDA, J.R.M. *Microrganismos para produção de químicos a partir da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel*. Brasília: Embrapa, 2011. (Circular Técnica, 7).
- APHA, Awwa. WEF, 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21: 258-259, 2005.
- BARAK, Y.; VAN RIJN, J. Atypical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.3, p.1209-1212, 2000a.
- BARAK, Y; VAN RIJN, J. Relationship between Nitrite Reduction and Active Phosphate Uptake in the Phosphate-Accumulating Denitrifier *Pseudomonas* sp. Strain JR 12. *Applied and environmental microbiology*, 66.12: 5236-5240, 2000b.
- \_\_\_\_\_. Relationship between nitrite reduction and active phosphate uptake in the phosphate-accumulating denitrifier *Pseudomonas* sp. Strain JR 12. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.12, p.5236-5240, 2000b.
- BARBIRATO, F. et al. Glycerol fermentation by a new 1, 3-propanediol-producing microorganism: *enterobacter agglomerans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.43, n.5, p.786-793, 1995.
- BARKER, P. S.; DOLD, P. L. Denitrification behaviour in biological excess phosphorus removal activated sludge systems. *Water Research*, 30.4: 769-780, 1996.
- BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y.J.K.; LIMA, D.P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Química Nova*, v.34, n.2, p.306-319, 2011.
- BLACKALL, L.L. et al. A Review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.81, n.1/4, p.681-691, 2002.
- BOND, P.L.; REES, G.N. Microbiological aspects of phosphorus removal in activated sludge systems. In: SEVIOUR, R.J.; BLACKALL, L. (Ed.). *The Microbiology of activated sludge*. Netherlands: Springer, p.227-256, 1988.
- BUCHAN, L. The Location and nature of accumulated phosphorus in seven sludges from activated sludge plants which exhibited enhanced phosphorus removal. *Water S.A.*, v.7, n.1, p.1-7, Jan. 1981.

BUENO, R. F. Nitrificação e desnitrificação simultânea em reator com biomassa em suspensão e fluxo contínuo de esgoto. PhD Thesis. Universidade de São Paulo, 2011.

CALLADO, N. H.; FORESTI, E. Removal of organic carbon, nitrogen and phosphorus in sequential batch reactors integrating the aerobic/anaerobic processes. *Water Science and Technology*, 44.4: 263-270, 2011

CARNEIRO, R.B. *Utilização de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo em reator submetido à aeração intermitente*. 2015. 106p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

CHEN, Y.; RANDALL, A.A.; MCCUE, T. The Efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid. *Water Research*, v.38, n.1, p.27-36, 2004.

CHERNICHARO, C.A.L. et al. Tratamento de esgotos e produção de efluentes adequados a diversas modalidades de reúso da água. In: FLORENCIO, L.; BASTOS, R.K.X.; AISSE, M.M. (Coord.). *Tratamento e utilização de esgotos sanitários*. Rio de Janeiro: ABEAS., p.63-110, 2006.

CONLEY, D.J. et al. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, v.323, n.5917, p.1014-1015, 2009.

DILLING, Waltraud; CYPIONKA, Heribet. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 71.1-2: 123-127, 1990.

Fang, X. e Li, J. Uplift of the Tibetan Plateau and environmental changes. *Chinese Science Bulletin*, 44(23), 2117-2124, 1999.

FERRARO, S.M. et al. In vitro gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Animal Feed Science and Technology*, v.154, n.1, p.112-118, 2009.

FERREIRA, E. S. I-121-CINÉTICA QUÍMICA E FUNDAMENTOS DOS PROCESSOS DE NITRIFICAÇÃO E DENITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA, 2000.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; VALLERO, M. Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v.5, n.1, p.3-19, 2006.

FREITAS, F., TEMUDO, M., REIS, M.A.M. Microbial population response to changes of the operating conditions in a dynamic nutrient-removal sequencing batch reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28 (3), 2005.

GEBREMARIAM, S.Y.; BEUTEL, M. W., CHRISTIAN, D., & HESS, T. F.. Research advances and challenges in the microbiology of enhanced biological phosphorus removal - a critical review. *Water Environment Research*, v.83, n.3, p.195-219, 2011.

GODOI, L.A.G. *Interferência da sulfetogênese na produção de metano a partir de águas residuárias ricas em carboidratos*. 2014. 98p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

GREENHILL, S. Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel. U.S. Patent Application No 10/744,272, 2003.

GU, A. Z.; SAUDERS, A.; NEETHLING, J. B.; STENSEL, H. D.; BLACKALL, L. L. (2005). Investigation of PAOs and OAGs and their effects on EBPR performance at full-scale wastewater treatment plants in US. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2005(14), 1985-1998.

GUERRERO, J.; TAYÀ, C.; GUISASOLA, A.; BAEZA, J. A. (2012). Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal. *Water research*, 46(9), 2983-2991.

HENZE, M. *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*. London: IWA, 2008.

HENZE, M. et al. *Wastewater treatment: biological and chemical processes*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2001.

\_\_\_\_\_. *Wastewater treatment: biological and chemical process*. 3<sup>th</sup>ed. Berlin: Springer-Verlag, 2002.

HIMMI, E.H. et al. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *propionibacterium acidipropionici* and *propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.53, n.4, p.435-440, 2000.

HU, Z.R.; WENTZEL, M.C.; EKAMA, G.A. Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. *Water Research*, v.36, n.19, p.4927-4937, 2002.

JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGER, G. T. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. New York: Lewis Publishers, 1993.

JONSSON, K.; JOHANSSON, P.; CHRISTENSSON, M.; LEE, N.; LIE, E.; WELANDER, T. Operational factors affecting enhanced biological phosphorus removal at the wastewater treatment plant in Helsingborg, Sweden. *Water Sci Technol*; 34(1-2):67–74, 1996.

JØRGENSEN, K. S.; PAULI, A. S. L. Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge. *Anaerobe*, 1.3: 161-168, 1995.

KERRN-JESPERSEN, J. P.; HENZE, M. Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Research*, 27.4: 617-624, 1993.

KUBA, T.; G. SMOLDERS, M. C. M.; VAN LOOSDRECHT M.; HEIJNEN J.J. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* 27:241–252, 1993.

KUBA, T.; G. SMOLDERS, A; WACHTMEISTER, M. C. M.; VAN LOOSDRECHT M.; HEIJNEN J.J. Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal system. *Water Sci. Technol.* 30:263–269, 1994.

KUBA T.; MURNLEITNER E.; VAN LOOSDRECHT M.; HEIJNEN J.J. A metabolic model for biological phosphorus removal of denitrifying organisms. *Biotechnol Bioeng* 1996;52:685–95, 1996.

LEE, N. et al. Population dynamics in wastewater treatment plants with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. *Water Science and Technology*, v.46, n.1-2, p.163-170, 2002.

LOPEZ-VAZQUEZ, C.M. et al. Modeling the PAO–OAG competition: effects of carbon source, pH and temperature. *Water Research*, v.43, n.2, p.450-462, 2009.

MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Brock biology of microorganisms*. 8<sup>th</sup>ed. New York: Prentice Hall, 1997.

MASCARENHAS, L.C.A.; VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C.A.L. Avaliação do desempenho de lagoas de polimento rasa, em série, para o pós-tratamento de efluentes de reator UASB. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.9, n.1, p.45-54, 2004.

MATURAMA CORDOBA, A.Y. *Estudo da combustão direta da glicerina bruta e loira como alternativa de aproveitamento energético sustentável*. 2011. 270P. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MEINHOLD, Jens; ARNOLD, Eva; ISAACS, Steven. Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Research*, 1999, 33.8: 1871-1883.

METCALF, L; EDDY, H. P.; TCHOBANOGLOUS, G. *Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse*. McGraw-Hill, New York, 1991.

METCALF & EDDY. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. 4<sup>th</sup>ed. New York: McGraw-Hill International, 2003.

MIQUELETO, A.P. Polímeros extracelulares insolúveis ESP nos reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais: caracterização e fatores que favorecem a produção. 2006. 120p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

MULKERRINS, D.; DOBSON, A.D.W.; COLLERAN, E. Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environment International*, v.30, n.2, p.249-259, 2004.

NARCIS, N.; REBHUN, M.; SCHEINDORF, C. “Denitrification at various carbon to nitrogen ratios”, *Water Research*, v. 13, pp. 93-98, 1979.

OEHMEN, A. et al. Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, v.91, n.2, p.162-168, 2005.

\_\_\_\_\_. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Research*, v.41, n.11, p.2271-2300, 2007.

Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., ... & Aggelis, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1, 3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 32(1), 60-71, 2008.

PATTARKINE, V. M., & RANDALL, C. W. The requirement of metal cations for enhanced biological phosphorus removal by activated sludge. *Water science and technology*, 40(2), 159-165, 1999.

PAYNE, W. J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriological Reviews*, 37(4), 409, 1973.

PIJUAN, M. et al. Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, v.85, n.1, p.56-67, 2004.

RANDALL, A.; BENEFIELD, L.; HILL, W. The Effect of fermentation products on enhanced biological phosphorus removal, polyphosphate storage, and microbial population dynamics. *Water Science and Technology*, v.30, n.6, p.213-219, 1994.

ROSSO, D.; STENSTROM, M.K. Comparative economic analysis of the impacts of mean cell retention time and denitrification on aeration systems. *Water Research*, v.39, n.16, p.3773-3780, 2015.

SCHINDLER, D.W. Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *Limnology and Oceanography*, v.51, n.1, part 2, p.356-363, 2006.

SELEMBO, P.A. et al. Enhanced hydrogen and 1, 3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v.104, n.6, p.1098-1106, 2009.

SEVIOUR, R.J.; MINO, T.; ONUKI, M. The Microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Reviews*, v.27, n.1, p.99-127, 2003.

SILVA, M.E.R.D.; AQUINO, M.D.D.; SANTOS, A.B.D. Pós-tratamento de efluentes provenientes de reatores anaeróbios tratando esgotos sanitários por coagulantes naturais e não-naturais. *Revista Tecnologia*, v.28, n.2, p.178-190, dez. 2007.

SKINDE, J.R.; BHAGAT, S.K. "Industrial wastes as carbon sources in biological denitrification", *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 54, pp. 370-377, 1982

SLIEKERS, A. O; DERWORT, N.; CAMPOS-GOMES, J. L.; STROUS, M.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res*;36(10):2475–82, 2002.

SMOLDERS, G.J.F, VAN DE MEJI, J; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. A structured metabolic model for the anaerobic and aerobic stoichiometry and kinetics of the biological phosphorus removal process. *Biotech Bioeng*;47:277–87, 1995.

SOUSA, J.T.; FORESTI, E. Utilização de lodo anaeróbio como fonte de carbono no processo de desnitrificação de águas residuárias. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.3, n.1, p.69-73, 1999.

STENSEL, H.D.; SEDLAK, R. Principles of biological phosphorus removal. In: SEDLAK, R. (Ed.). *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice*. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: Lewis. p.141-166, 1991.

TEMUDO, M.F. et al. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.80, n.6, p.1121-1130, 2008.

TORRES, P.; FORESTI, E. Domestic sewage treatment in a pilot system composed of UASB and SBR reactors. *Water Science & Technology*, v.44, n.4, p.247, 2001.

TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G. Isolation and characterization of *methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letter*, v.16, p.241-245, 1983.

THAMDRUP, B., & DALSGAARD, T. Production of N<sub>2</sub> through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), 1312-1318, 2002.

VALDEZ, H.C. et al. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. *Química Nova*, v.35, n.3, p.601-607, dez. 2011.

VON SPERLING, M; DE LEMOS CHERNICHARO, C. A. Biological wastewater treatment in warm climate regions. IWA publishing, 2005.

WACHTMEISTER, A. et al. A Sludge characterization assay for aerobic and denitrifying phosphorus removing sludge. *Water Research*, v.31, n.3, p.471-478, 1997.

WANG, H.; WANG, H. Mitigation of lake eutrophication: loosen nitrogen control and focus on phosphorus abatement. *Progress in Natural Science*, v.19, n.10, p.1445-1451, 2009.

ZENG, R. J.; LEMAIRE, R.; YUAN, Z.; KELLER, J. Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab scale sequencing batch reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 84(2), 170-178, 2003.

ZENG, R. J.; SAUNDERS, A. M.; YUAN, Z.; BLACKALL, L. L.; KELLER, J. Identification and Comparison of Aerobic and Denitrifying PolyPAccumulating Organisms. *Biotechnol. Bioeng.*, 83, 140–148, 2003.

ZENG, A. P.; BIEBL, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*; 74:239–59, 2002

ZHANG, A.; YANG, S.T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *propionibacterium acidipropionici*. *Process Biochemistry*, v.44, n.12, p.1346-1351, 2009.

ZHOU, Y.; PIJUAN, M.; ZENG, R. J.; LU, H.; YUAN, Z. Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (OAGs)?. *Water Research*, 42(10), 2361-2368, 2008.