

FORMAÇÃO DE BIOMASSA GRANULAR VISANDO A REMOÇÃO
COMBINADA DE MATÉRIA ORGÂNICA E NUTRIENTES EM ALTAS
TEMPERATURAS

Doralice Chagas Tavares

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador (es): João Paulo Bassin

Márcia Walquíria de Carvalho
Dezotti

Rio de Janeiro
Setembro de 2017

FORMAÇÃO DE BIOMASSA GRANULAR VISANDO A REMOÇÃO
COMBINADA DE MATÉRIA ORGÂNICA E NUTRIENTES EM ALTAS
TEMPERATURAS

Doralice Chagas Tavares

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA

Examinada por:

Prof. João Paulo Bassin, D.Sc.

Prof^a. Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Roque Passos Piveli, D.Sc.

Dr^a Ana Cláudia Figueiras Pedreira de Cerqueira, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
SETEMBRO DE 2017

Tavares, Doralice Chagas

Formação de biomassa granular visando a remoção combinada de matéria orgânica e nutrientes em altas temperaturas/Doralice Chagas Tavares. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XXI, 158 p.: il.; 29, 7cm.

Orientadores: João Paulo Bassin

Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 136 – 158.

1. Lodo granular aeróbio. 2. Remoção de matéria orgânica e nutrientes. 3. Altas temperaturas. I. Bassin, João Paulo *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Cada pessoa
É aquilo que crê;
Fala do que gosta;
Retém o que procura;
Ensina o que aprende;
Tem o que dá
E vale o que faz.
Sempre fácil, portanto,
Para cada um de nós
Reconhecer
Os esquemas de vivência
Em que nos colocamos.
Emmanuel

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta Tese, foi utilizar apenas duas paginas para agradecer as pessoas que fizeram parte dessa minha trajetória de 5 anos no Programa de Engenharia Química (PEQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro/COPPE. O meu Doutorado foi programado para ser feito em 4 anos e uma parte da pesquisa deveria ser realizada na Espanha/Barcelona. Não foi a mesma programação de Deus, nesses anos me tornei professora substituta do CEFET/RJ, logo depois passei no concurso para DE da mesma instituição, me casei, tranquei o doutorado, me separei e voltei como doutorado parcial. Isso foi apenas um resumo dos meus rápidos/longos anos vivenciados no doutorado. Muitas coisas aconteceram, muitas escolhas foram feitas, muitas marcas se fizeram presentes e em meio a tantas incertezas, a única certeza que tinha era que queria concluí-lo.

Início os agradecimentos por meus pais e familiares, que são minha base e minha inspiração para continuar no caminho certo, eles sempre primaram pela minha Educação. Obrigada a todos que além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estiveram presentes e sou muito Feliz por isso.

Obrigada queridos orientadores, Márcia Dezotti e João Paulo Bassin. Agradeço a Márcia pelas conversas e discussões no início da caminhada, que me permitiram delinear o andamento do trabalho. O que falar do João Bassin? Uma das pessoas mais inteligentes que conheço, se dedica ao trabalho e aos orientados como um verdadeiro orientador. Com ele aprendi a não desistir e acreditar que tudo iria se encaixar. Empregamos uma tecnologia pioneira na COPPE, sabíamos das dificuldades, enfretamos a crise financeira e nos dedicamos para que tudo fosse bem feito. Obrigada João, pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade. Obrigada pelo exemplo. Estendo meus agradecimentos aos funcionários do PEQ/COPPE/UFRJ, bem como aos companheiros de Laboratório. Obrigado pela prontidão e ensinamentos.

Obrigada ao CEFET/RJ e aos colegas de trabalho que sempre compreenderam a importância dessa caminhada na vida de um professor. Obrigada pelas frases de incentivo e abraços de carinho. “Tudo vai dar certo, tenha Fé!”

Costumo dizer que o mais difícil do Doutorado é o tempo que passamos tentando buscar o melhor caminho para termos uma tese perfeita. No entanto descobrimos que a imperfeição também é uma boa resposta. Porém, até entender isso, os traumas e as angústias nos limitam a um clima nada agradável para nossa mente. Por isso, optei em seguir uma famosa citação latina, derivada da Sátira X do poeta romano Juvenal, *Mens sana in corpore sano* ("uma mente sã em um corpo sã"). Por isso quero agradecer a família BlackFutevôlei, por me proporcionar manhãs de muito treino físico, suor, dedicação e bem estar mental.

Depois de tantos caminhos percorridos, eis que surge e ressurgem os amigos. Nunca perdido, sempre reencontrado. É bom sentá-lo novamente ao lado. Com olhos que contêm o olhar antigo, sempre comigo um pouco atribulado e como sempre singular comigo. Um bicho igual a mim, simples e humano. Sabendo se mover e comover. E a

disfarçar com o meu próprio engano. O amigo: um ser que a vida não explica. Que só se vai ao ver outro nascer. É o espelho de minha alma... É com o soneto do amigo de Vinicius de Moraes que dedico um parágrafo da minha dedicatória aos meus eternos amigos (não irei citá-los porque nossa memória falha e nesse momento não quero falhar com nenhum deles).

Quero agradecer ao meu par, meu anjo enviado na Terra, Papito, o cachorro mais amoroso que tive e veio no momento de maior aprendizagem. Ele não fala, mas seus olhos me diz coisas que muitas vezes gostaria de ouvir de alguém.

Agradeço a DEUS por me enviar todos esses seres neste momento tão importante. Obrigado por colocá-las tão caprichosamente em minha vida. Te agradeço: Pela coragem de facear as dificuldades criadas por nós mesmos, pelas provas que nos aperfeiçoam o raciocínio e nos abrandam o coração, pela fé na imortalidade, pelo privilégio de servir, pelo dom de saber que somos responsáveis pelas próprias ações, pelos recursos nutrientes e curativos que trazemos em nós próprios, pelo conforto de reconhecer que a nossa felicidade tem o tamanho da felicidade que fizemos para os outros, pelo discernimento que nos permite diferenciar aquilo que nos é útil daquilo que não nos serve, pelo amparo da afeição no qual as nossas vidas se alimentam em permuta constante, pela bênção da oração que nos faculta apoio interior para a necessária solução de nossos problemas, pela tranquilidade de consciência que ninguém consegue subtrair-nos... Por tudo isso, e por todos os demais tesouros, de esperança e de amor, de alegria e de paz, de que nos enriquece a existência, Sê bendito, Senhor!... ao mesmo tempo te louvo a Infinita Misericórdia, hoje e para sempre. (Emmanuel, psicografia de Chico Xavier)

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

FORMAÇÃO DE BIOMASSA GRANULAR VISANDO A REMOÇÃO
COMBINADA DE MATÉRIA ORGÂNICA E NUTRIENTES EM ALTAS
TEMPERATURAS

Doralice Chagas Tavares

Setembro/2017

Orientadores: João Paulo Bassin

Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Programa: Engenharia Química

O lodo granular aeróbio é uma tecnologia promissora para o tratamento de águas residuárias. No entanto, a efetividade do processo depende da formação de biomassa granular estável, associada aos aspectos microbiológicos do lodo e às condições de operação do reator. O objetivo desse trabalho foi investigar o desenvolvimento de grânulos aeróbios em altas temperaturas ($28 \pm 4^\circ\text{C}$), em reator em batelada sequencial (RBS). Os experimentos foram divididos em Fase I e Fase II. Na primeira, a seleção de grânulos pelo arraste de flocos ocorreu logo após a inoculação do reator, os grânulos formados mostraram-se instáveis. Em pouco tempo, ocorreu a desgranulação. Baixa eficiência de nitrificação e remoção biológica de fósforo desprezível foram observadas na Fase I. A implementação de uma nova estratégia operacional incorporando uma adaptação do inóculo antes do estágio de seleção de grânulos na Fase II permitiu o desenvolvimento de bactérias de crescimento lento, tais como organismos acumuladores de polifosfato (PAO) e nitrificantes, e suprimindo a presença de filamentos. Grânulos se mantiveram estáveis a longo prazo enquanto que alta remoção de amônio (>95%) e nitrogênio (>90%) foram obtidas. Contudo, a remoção de fósforo foi instável, possivelmente devido à competição entre PAO e organismos acumuladores de glicogênio (GAO), conforme evidenciado por pirosequenciamento.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

GRANULAR BIOMASS FORMATION FOR THE COMBINED REMOVAL
OF NUTRIENTS AND CARBONACEOUS COMPOUNDS UNDER AT HIGH
TEMPERATURES

Doralice Chagas Tavares

September/2017

Advisors: João Paulo Bassin João

Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Department: Chemical Engineering

Aerobic granular sludge (AGS) is a promising technology for wastewater treatment. However, the success of the process depends on the formation of stable granular biomass, which is associated with the microbiological aspects of the sludge and reactor operating conditions. The aim of this work was to investigate the development of aerobic granules at high temperatures ($28 \pm 4^\circ\text{C}$) in a sequencing batch reactor (SBR). The experiments were divided in Phase I and Phase II. In the first, the formed granules were unstable. In a short time, degranulation occurred. Low nitrification efficiency and negligible biological phosphorus removal were observed in Phase I. The implementation of a new operational strategy incorporating an adaptation of the inoculum prior to the granule selection stage in Phase II allowed most favoring the development of slow-growing bacteria, such as polyphosphate accumulating organisms (PAO) and nitrifiers, and suppressing the presence of filaments. Granules regular form remained stable in the long term while high ammonium (>95%) and nitrogen (>90%) removal were obtained. However, phosphorus removal was unstable, possibly due to the competition between PAO and glycogen accumulating organisms (GAO), as evidenced by pyrosequencing.

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO	1
2-	OBJETIVOS	5
3-	REVISÃO DA LITERATURA	6
	3.1 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	6
	3.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS: ASPECTOS FUNDAMENTAIS	7
	3.3 REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA	8
	3.3.1 <i>Remoção de matéria orgânica em condições aeróbias</i>	9
	3.3.2 <i>Remoção de matéria orgânica em condições anóxicas</i>	11
	3.3.3 <i>Remoção de matéria orgânica em condições anaeróbias</i>	11
	3.4 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	12
	3.4.1 <i>Nitrificação</i>	14
	3.4.2 <i>Desnitrificação</i>	19
	3.5 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE FÓSFORO	23
	3.6 TECNOLOGIAS EMPREGADAS PARA REMOÇÃO COMBINADA DE MATÉRIA ORGÂNICA, NITROGÊNIO E FÓSFORO.	29
	3.6.1 <i>Sistema Bardenpho (4 e 5 estágios)</i>	30
	3.6.2 <i>Sistema UCT (University of Cape Town)</i>	31
	3.6.3 <i>Sistema UCT modificado</i>	31
	3.6.4 <i>Reatores em Bateladas Sequenciais (RBS)</i>	32
	3.7 TECNOLOGIA DE GRANULAÇÃO AERÓBIA (LODO GRANULAR AERÓBIO)	35
	3.7.1 <i>Processo de Formação dos Grânulos Aeróbios</i>	38
	3.7.2 <i>Fatores que afetam a granulação aeróbia</i>	41
	3.7.3 <i>Estudos específicos acerca da formação e estabilidade dos grânulos aeróbios</i>	46
	3.7.4 <i>Remoção de matéria carbonácea e nutrientes em reatores de lodo granular: mecanismo e aplicação</i>	49
4-	MATERIAIS E MÉTODOS	55

4.1	SISTEMA EXPERIMENTAL	55
4.2	INOCULAÇÃO DO REATOR E ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS	58
4.3	MONITORAMENTO DO REATOR	60
	<i>Nitrogênio Amoniacal, Nitrito, Nitrato, Fósforo, Demanda Química de Oxigênio, Oxigênio dissolvido, pH e T.....</i>	<i>60</i>
	<i>Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos voláteis, Índice volumétrico de lodo (IVL), Densidade dos grânulos, Diâmetro médio das partículas e Velocidade de sedimentação.</i>	<i>60</i>
	<i>Determinação de Polihidroxibutirato (PHB), Testes complementares à operação contínua do sistema RBS e Coleta de amostras para extração de DNA e Sequenciamento do gene.</i>	<i>60</i>
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	61
4.4.1	<i>Nitrogênio Amoniacal, fósforo e demanda química de oxigênio ...</i>	<i>61</i>
4.4.2	<i>Nitrito</i>	<i>61</i>
4.4.3	<i>Nitrato.....</i>	<i>61</i>
4.4.4	<i>Oxigênio dissolvido, pH e T</i>	<i>61</i>
4.5	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	62
4.5.1	<i>Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos voláteis (SSV).....</i>	<i>62</i>
4.5.2	<i>Índice volumétrico de lodo (IVL)</i>	<i>62</i>
4.5.3	<i>Densidade dos grânulos</i>	<i>62</i>
4.5.4	<i>Diâmetro médio das partículas</i>	<i>63</i>
4.5.5	<i>Velocidade de sedimentação</i>	<i>63</i>
4.5.6	<i>Idade do lodo.....</i>	<i>64</i>
4.5.7	<i>Determinação de Polihidroxibutirato (PHB).....</i>	<i>65</i>
4.5.8	<i>Testes complementares à operação contínua do sistema RBS.....</i>	<i>66</i>
4.5.9	<i>Extração de DNA e sequenciamento do gene.....</i>	<i>66</i>
5-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	FASE I.....	68
5.1.1	<i>Inóculo.....</i>	<i>68</i>
5.1.2	<i>Processo de granulação aeróbia e características dos grânulos formados.....</i>	<i>69</i>

5.1.3	<i>Remoção de matéria orgânica e nutrientes</i>	78
5.2	FASE II	81
5.2.1	<i>Inóculo e fase de aclimação</i>	81
5.2.2	<i>Processo de granulação aeróbia e características dos grânulos formados</i>	82
5.2.3	<i>Remoção de matéria orgânica e nutrientes</i>	89
5.2.4	<i>Testes de ciclo</i>	92
5.3	DESAFIOS ENFRENTADOS DURANTE O PROCESSO DE GRANULAÇÃO AERÓBIA: RELACIONANDO ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS ÀS CARACTERÍSTICAS DA BIOMASSA GRANULAR FORMADA	96
5.4	REMOÇÃO DE NUTRIENTES POR BIOMASSA GRANULAR EM CONDIÇÕES DE CLIMA TROPICAL: DESAFIOS E VANTAGENS	103
5.5	ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA	105
5.5.1	<i>Caracterização dos perfis bacterianos das Fases I e II</i>	105
5.5.2	<i>Perfis bacterianos em nível do filo</i>	107
5.5.3	<i>Perfis bacterianos em nível de classe</i>	109
5.5.4	<i>Perfis bacterianos das amostras de inóculo em nível do gênero</i> .	111
5.5.5	<i>Perfis bacterianos da biomassa granular em nível de gênero: Fase I</i>	113
5.5.6	<i>Perfis bacterianos gerais de biomassa granular em nível de gênero: Fase II</i>	114
5.5.7	<i>Análise de PAO, GAO e bactérias nitrificantes nas Fases I e II.</i>	117
5.5.8	<i>Avaliando a riqueza e a diversidade bacteriana e outras características dos flocos de lodo ativado e da biomassa granular nas Fases I e II</i>	120
5.5.9	<i>Compreendendo o processo de granulação nas Fases I e II com base nos perfis bacterianos</i>	121
5.5.10	<i>Avaliando os PAO e GAO dominantes</i>	127
5.5.11	<i>Distribuição PAO-GAO e desempenho de remoção de fosfato na Fase II</i>	128
5.5.12	<i>Relacionando o desempenho de nitrificação e a comunidade bacteriana nitrificante</i>	130
6-	CONCLUSÃO	133

7-	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	135
8-	REFERÊNCIAS	136

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1: Transformações do nitrogênio em processos biológicos de tratamento (Fonte: Adaptado de Sedlak, 1991). 13
- Figura 3.2: Metabolismo de organismos acumuladores de polifosfato em condições anaeróbias ou aeróbias (anóxicas) (adaptado de VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1997). Os PHA estão representados por PHB no esquema, e o metabolismo aeróbio (anóxico) mostrado no esquema representa a situação na qual o substrato externo não está disponível. 26
- Figura 3.3: Representação esquemática do Sistema Bardenpho de 4 estágios. Fonte adaptada: Metcalf e Eddy (2003) 30
- Figura 3.4: Representação esquemática do Sistema Bardenpho de 5 estágios. Fonte adaptada: Metcalf e Eddy (2003) 30
- Figura 3.5: Representação esquemática do sistema UCT. Fonte adaptada: Metcalf e Eddy (2003)..... 31
- Figura 3.6: Representação esquemática do Sistema UCT modificado. Fonte adaptada: Metcalf e Eddy (2003). 32
- Figura 3.7: Representação esquemática dos volumes característicos de um reator em batelada sequencial. 32
- Figura 3.8: Sequência operacional de um reator em bateladas..... 33
- Figura 3.9: Mecanismo de formação dos grânulos (adaptado de BEUN *et al.*, 1999)... 40
- Figura 3.10: a) Representação da concentração de substrato (DQO) e oxigênio dissolvido (OD) durante a operação de um RBS granular, mostrando as fases com presença e ausência de substrato. b) Grânulos aeróbios formados com um curto período de presença de substrato. Fonte: Adaptado de Morales (2009). 43
- Figura 3.11: a) Representação da concentração de substrato (DQO) e oxigênio dissolvido (OD) durante a operação do RBS, mostrando as fases com presença e

ausência de substrato. b) Grânulos aeróbios formados com um longo período de presença de substrato. Fonte: Adaptado de Morales (2009).....	43
Figura 3.12: Combinação de processos no interior dos grânulos. Fonte: Adaptado de Campos <i>et al.</i> (2009).	50
Figura 3.13: Esquema das principais conversões ocorrendo em paralelo na estrutura dos grânulos aeróbios. AOB: bactérias oxidadoras de amônio; NOB: bactérias oxidadoras de nitrito; PAO: organismos acumuladores de polifosfato; DPAO: organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes; GAO: organismos acumuladores de glicogênio; DQO: demanda química de oxigênio; PP: polifosfato. Os organismos desnitrificantes são exemplificados pelos DPAO e organismos acumuladores de glicogênio desnitrificantes (DGAO). Fonte: Adaptado de Bassin (2012).....	52
Figura 4.1: Ilustração do sistema experimental.....	57
Figura 4.2: Sistema experimental composto pelo reator em bateladas sequenciais de grânulos aeróbios (RBSG) durante o período de partida para seleção de grânulos.	57
Figura 4.3: Perfis do ciclo SBR em (a) Fase I e (b) Fase II.	59
Figura 5.1: Morfologia do lodo de inóculo observadas em microscopia óptica de contraste de fase. Aumento de 40x.....	68
Figura 5.2: Imagens da biomassa obtidas em estereoscópio durante operação na Fase I (sem prévia aclimação do lodo de inóculo): a) fase de seleção com 20 min de decantação; b) fase de seleção com 12 min de decantação; c) fase de seleção com 3 min de decantação d) fase de granulação completa. A barra de escala indica 50 μm em (a) enquanto em (b), (c) and (d) a barra de escala indica 500 μm	69
Figura 5.3: Grânulos formados dentro do reator após 40 dias de operação do reator. ...	70
Figura 5.4: Índice volumétrico de lodo (IVL ₃₀) ao longo da operação do reator na Fase I.	72
Figura 5.5: Diâmetro médio das partículas de biomassa ao longo da operação na Fase I.	72

Figura 5.6: Densidade do grânulo da Fase I.	72
Figura 5.7: Sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) durante a Fase I.	74
Figura 5.8: Velocidade de sedimentação das partículas ao longo da operação do reator em batelada sequencial: método experimental utilizando proveta (■) e cálculo teórico pela Lei de Stokes (●).....	75
Figura 5.9: Biomassa com consistência pastosa retida na parede do reator após a desgranulação.	76
Figura 5.10: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da biomassa no final das diferentes fases: (a) inóculo; (b) e (c) granulação completa; (d) e (e) desgranulação.	77
Figura 5.11: DQO no afluente (t ₀) (●), após a alimentação em regime anaeróbio (t ₆₀) (■) e no efluente (t ₁₈₀) (Δ) durante a operação do reator na Fase I.	80
Figura 5.12: Concentrações de PO ₄ ³⁻ (mgPO ₄ ³⁻ -P/L) no t ₀ (●), t ₆₀ (■) e t ₁₈₀ (Δ) durante a operação do reator na Fase I.	80
Figura 5.13: Concentrações de NH ₄ ⁺ -N no t ₀ (●), t ₆₀ (■) e t ₁₈₀ (Δ) durante a operação do reator na Fase I.	80
Figura 5.14: Morfologia do lodo de inóculo observada em microscopia óptica de contraste de fase. Aumento de 40x.....	82
Figura 5.15: a) Lodo de inóculo; b) Aspecto do lodo após a etapa de aclimação. A barra de escala indica 500 μm.	82
Figura 5.16: Imagens da biomassa em diferentes dias de operação: a) fase de seleção em 30 min de decantação b) fase de seleção em 20 min de decantação c) fase de seleção em 3 min de decantação d) fase de granulação completa. A barra de escala indica 500 μm.	83
Figura 5.17: Índice volumétrico de lodo (IVL) ao longo da Fase II: IVL ₅ (■) IVL ₃₀ (●).	84

Figura 5.18: Diâmetro médio de partícula ao longo da Fase II.	85
Figura 5.19: Densidade da biomassa ao longo da Fase II.	85
Figura 5.20: Velocidade de sedimentação das partículas ao longo da operação do reator em batelada sequencial: método da proveta (■) e Lei de Stokes (●).	85
Figura 5.21: Sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) durante a operação do reator da Fase II.	87
Figura 5.22: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da biomassa ao longo das diferentes fases de operação do reator: (a) e (b) inóculo usado para obtenção de grânulos; (c) aspecto exterior e (d) interior da biomassa granular formada (fase de granulação completa e estável).	88
Figura 5.23: DQO no efluente (t0) (●), após a alimentação (t60) (■) e no efluente (t180) (Δ) durante a operação do reator na Fase II.	89
Figura 5.24: Concentrações de PO ₄ ³⁻ -P no afluente (t0) (●), após regime anaeróbio (t60) (■) e no efluente (t180) (Δ) durante a operação do reator na Fase II.	90
Figura 5.25: Concentrações de amônio no afluente (t0) (●), após o regime anaeróbio de alimentação (t60) (■) e no efluente (t180) (Δ), nitrato (◇) e nitrito (✕) durante a operação do reator na Fase II.	91
Figura 5.26: Relação entre o diâmetro médio da biomassa granular (mm) e a eficiência de remoção de nitrogênio (%). Os dados apresentados referem-se à fase de seleção (20, 12 e 8 minutos de tempo de assentamento) e durante o estágio de granulação (dias 80 a 90 e dias 100-170).	92
Figura 5.27: Testes de ciclo referentes à operação do reator na Fase II.	94
Figura 5.28: Evolução da estrutura granular ao longo da operação do reator: a) Fase I e b) Fase II.	101
Figura 5.29: Morfologia dos grânulos aeróbios e sua relação com o perfil de consumo de substrato (matéria orgânica) na fase anaeróbia/aeróbia.	102

Figura 5.30: Curvas de rarefação para todas as amostras analisadas.	106
Figura 5.31: Abundância relativa dos filos bacterianos nas amostras coletadas em diferentes estágios da operação do reator ao longo das Fases I e II.	109
Figura 5.32: Estrutura da comunidade microbiana em nível da classe das amostras coletadas em vários estágios ao longo das Fases I e II.	110
Figura 5.33: Grânulos de coloração clara e escura da Fase II.	111
Figura 5.34: Abundância relativa dos 30 gêneros mais abundantes nas amostras IN_I e IN_II. Os gêneros detectados em proporções menores foram agrupados separadamente na categoria "Outros".	112
Figura 5.35: Diagrama de Venn ilustrando o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) compartilhadas pelas amostras de inóculo das duas fases e exclusivamente encontradas em cada uma.	113
Figura 5.36: Abundância relativa dos 20 gêneros classificados mais abundantes nas amostras GR_I e UG_I. Os gêneros restantes (347) foram detectados em proporções menores e foram agrupados na categoria 'Outros'.	114
Figura 5.37: Abundância relativa dos 30 gêneros classificados mais relevantes nas amostras na Fase II (FG_II, MG_II, LG_II, DG_II).	115
Figura 5.38: Diagrama de Venn mostrando o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) compartilhadas pelas amostras MG_II, LG_II e DG_II e exclusivamente encontradas em cada uma.	116
Figura 5.39: <i>Heatmap</i> ilustrando a proporção relativa dos 20 gêneros mais abundantes da comunidade bacteriana dos grânulos. Para esta análise, foram consideradas todas as amostras de lodo granular da Fase II (FG_II, MG_II, LG_II e DG_II).	117
Figura 5.40: Mapa de calor mostrando os percentuais relativos de diferentes grupos funcionais importantes envolvidos nas transformações de fósforo e nitrogênio no reator.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Aceptores de elétrons típicos das reações de oxidação no tratamento de esgoto.....	9
Tabela 4.1: Composição da solução A.	56
Tabela 4.2: Composição da solução B.	56
Tabela 4.3: Composição da solução de micronutrientes suplementada ao efluente sintético.....	56
Tabela 4.4: Frequência de análises dos parâmetros analisados.	60
Tabela 4.5: Amostras coletadas ao longo das Fases I e II para a análise de diversidade microbiana.	67
Tabela 5.1: Índices de diversidade α das amostras do reator em diferentes estágios da operação.....	106

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A/D	Razão altura/diâmetro
AGV	Ácidos graxos voláteis
ATP	Adenosina trifosfato
AUSB	<i>Aerobic Upflow Sludge Blanket</i>
BOA ou AOB	Bactérias oxidadoras de amônio
BON ou NOB	Bactérias oxidadoras de nitrito
CLP	Controlador lógico programável
DGAO	Organismos acumuladores de glicogênio desnitrificantes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPAO	Organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes
DQO	Demanda química de oxigênio
DQO/N	Razão demanda química de oxigênio/nitrogênio
EBPR	<i>Enhanced biological phosphorus removal</i>
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
GAO	Organismos acumuladores de glicogênio
m/v	Razão massa/volume
NH_4^+	Amônio
$\text{NH}_4^+ \text{-N}$	Nitrogênio amoniacal
$\text{NO}_2^- \text{-N}$	Nitrogênio nitrito
NO_2^-	Nitrito

NO ₃ ⁻	Nitrato
NO ₃ ⁻ -N	Nitrogênio nitrato
OD	Oxigênio dissolvido
OH	Hidroxila
PAO	Organismos acumuladores de polifosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
PP	Polifosfato
RBS	Reator em batelada sequencial
RBSG	Reator em batelada sequencial de grânulos aeróbios
SBR	<i>Sequencing Batch Reactor</i>
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
ST	Sólidos totais
TRH	Tempo de retenção hidráulica
TRS	Tempo de retenção de sólidos
UCT	<i>University of Cape Tow</i>
UTOs	Unidades taxonômicas operacionais

1- INTRODUÇÃO

A água está diretamente ligada aos aspectos da civilização humana, desde o desenvolvimento agrícola e industrial aos valores culturais e religiosos fixados na sociedade. Devido às limitações das reservas de água doce no planeta e com o aumento de sua demanda, faz-se necessária a adoção de estratégias que visem racionalizar a utilização dos recursos hídricos e mitigar os impactos negativos gerados pelas águas residuárias poluidoras (SILVA, 2011).

O controle ambiental de efluentes líquidos tem se tornado uma grande preocupação dos centros de pesquisa que estudam e desenvolvem tecnologias adequadas para minimizar os processos de degradação dos ambientes naturais. Esses estudos levaram ao desenvolvimento de sistemas de tratamento que almejam sempre obter o mais alto rendimento (eficiência de remoção de poluentes) e baixos custos de construção e operação. Atualmente, os novos processos visam a aplicação de cargas orgânicas mais elevadas, redução das áreas necessárias para implantação da unidade de tratamento e menor produção de lodo excedente.

Os processos de tratamento que utilizam micro-organismos para a decomposição de matéria orgânica e nutrientes em geral, possuem inúmeras vantagens de caráter econômico o que leva ao desenvolvimento de inovações no intuito de aperfeiçoar o tratamento como um todo.

A seleção do tipo e do grau de tratamento de um efluente a ser lançado em um curso d'água considera o padrão de qualidade do corpo receptor e a sua capacidade de autodepuração. Esses parâmetros estão relacionados às exigências da Legislação Ambiental (Resolução nº 433 de junho de 2011) (BRASIL, 2011).

Sistemas convencionais de tratamento de águas residuárias são projetados visando, principalmente, a remoção de matéria orgânica, dificultando o atendimento às exigências da legislação ambiental, uma vez que os efluentes desses sistemas apresentam concentrações de nitrogênio e fósforo próximas às do esgoto bruto (MOTA e VON SPERLING, 2009). De forma a minimizar os impactos ambientais relacionados ao lançamento indevido de esgotos domésticos e atender às legislações vigentes, a busca de alternativas eficientes para o tratamento de efluentes é de suma importância. A remoção de poluentes orgânicos em efluentes pode ser obtida utilizando tecnologias avançadas de tratamento, tais como os processos oxidativos, processos que empregam

membranas de micro, ultra e nanofiltração, osmose inversa e eletrodialise, processos de adsorção em carvão ativado e os processos biotecnológicos. Esses últimos são considerados como o meio mais sustentável para a remoção de poluentes, uma vez que usam micro-organismos presentes no meio ambiente. A biodegradação ocorre em reatores nos quais a atividade microbiana é intensificada por meio do controle de parâmetros importantes, como oxigênio dissolvido e concentração de biomassa ativa. Essa última, por sinal, é bastante superior àquela encontrada em sistemas naturais, permitindo a obtenção de maiores taxas de remoção de poluentes.

O processo de lodo ativados é a tecnologia mais empregada para o tratamento biológico. Nele, o afluente e o lodo ativado são intensamente misturados, agitados e aerados em unidades chamadas tanques de aeração para, em seguida, o lodo ativado ser separado do efluente tratado por sedimentação em decantadores. Geralmente, parte do lodo ativado decantado retorna ao processo e parte é retirado para um tratamento adequado e feita a sua disposição final (JORDÃO e PESSÔA, 1995). Os micro-organismos no tanque de aeração tendem a se organizar na forma de flocos biológicos. A floculação é resultado do metabolismo microbiano e ela tende a ocorrer quando a disponibilidade de alimento é limitada ou a comunidade microbiana é submetida a algum outro tipo de estresse (VON SPERLING, 2002).

Estudos mostram que, em determinadas condições, essa comunidade microbiana pode se organizar na forma de grânulos. A morfologia dos biogrânulos aeróbios é completamente diferente dos flocos biológicos presentes no lodo ativado. De formato esférico ou arredondado, esse aglomerados microbianos possuem um importante papel na adsorção de substâncias tóxicas devido à sua elevada área superficial e porosidade (ADAV *et al.* 2009). Em comparação com o sistema convencional de lodos ativados, o lodo granular propicia elevada retenção de biomassa, apresenta boa capacidade de sedimentação, caracteriza-se por uma ampla diversidade de espécies microbianas e permite remoção simultânea de matéria orgânica e nutrientes em um único reator. Portanto, a tecnologia de granulação aeróbia é considerada uma alternativa eficiente e inovadora para o processo de tratamento de águas residuárias. Apesar das vantagens inerentes ao processo de lodo granular, os grânulos podem perder a estabilidade devido ao crescimento de micro-organismos filamentosos, ocorrência de hidrólise responsável pela quebra do grânulo, e perda da capacidade de produzir substâncias poliméricas extracelulares (EPS) quando mantidos por períodos prolongados (ZHANG *et al.*, 2015).

A formação de grânulos aeróbios é fundamental para a sua aplicação em sistemas de tratamento de águas residuárias, e o processo de granulação pode demorar semanas para ter início partindo de um inóculo de um sistema de lodos ativados convencional. Diversos fatores podem interferir na formação dos grânulos, tais como: tipo de substrato, carga orgânica, forças de cisalhamento, velocidade de sedimentação e, sobretudo, as culturas microbianas envolvidas (IVANOV *et al.*, 2006; RICKARD *et al.*, 2004).

Do mesmo modo que em outros sistemas de tratamento, a formação de grânulos pode ser obtida pela seleção de culturas microbianas. Quando micro-organismos diversos são incorporados ao lodo, eles podem permanecer no agregado microbiano por um longo período, contribuindo para a sua formação e mantendo a sua capacidade de degradação (IVANOV *et al.*, 2006). A adição de linhagens selecionadas ou o enriquecimento de culturas com uma função específica pode ser vantajoso a um sistema de tratamento. Ivanov *et al.* (2006) citam diversos trabalhos que mostraram uma diminuição significativa do tempo de formação dos grânulos e a formação de grânulos densos com baixos valores de índice volumétrico do lodo (IVL) devido à adição de algumas linhagens. No entanto, bactérias específicas nem sempre estão disponíveis, o que torna essa metodologia menos empregada na realidade. Desse modo, a seleção de micro-organismos desejados a partir de um determinado inóculo geralmente é realizada por meio da mudança das condições de operação do reator.

Na maioria dos estudos com lodo granular desenvolvidos na Europa, a biomassa utilizada para dar a partida em sistemas granulares é proveniente de sistemas de tratamento que contemplam a remoção combinada de material orgânico, nitrogênio e fósforo (DE KREUK *et al.*, 2005c, ZENG *et al.*, 2003, YILMAZ *et al.*, 2008, KISHIDA *et al.*, 2009). Diante disso, tais sistemas são dotados dos principais grupos microbianos atuantes nesses processos. Conforme reportado na literatura em alguns estudos (DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004), a formação de lodo granular estável está condicionada à presença de alguns organismos específicos, notadamente os que apresentam taxas de crescimento reduzidas. Como exemplo desses micro-organismos, pode-se mencionar as bactérias nitrificantes e os organismos acumuladores de polifosfato (doravante designados por PAO, do inglês *polyphosphate-accumulating organisms*). Além disso, as temperaturas de operação dos reatores granulares na maioria dos estudos da literatura situam-se na faixa entre 15 e 20°C (BEUR *et al.*, 2002, BEUR

et al., 2002a, BEUR *et al.*, 2002b, DE KREUR *et al.*, 2004, DE KREUR *et al.*, 2005a, DE KREUR *et al.*, 2005b, DE KREUR *et al.*, 2005c, BASSIN, 2011b; BASSIN *et al.*, 2012), enquanto no Brasil essa se encontra majoritariamente entre 20 e 30°C (COLLINS *et al.*, 2009).

Ainda há várias lacunas a serem preenchidas no que diz respeito à formação do lodo granular e à remoção combinada de matéria orgânica e nutrientes, sobretudo em condições climáticas de países tropicais. De fato, são poucos os trabalhos que investigam a importância do inóculo e de sua comunidade microbiana associada no processo de formação dos grânulos (WINKLER *et al.*, 2011a; EBRAHIMI *et al.*, 2010).

No caso desse trabalho, em particular, uma das metas é avaliar a formação e estabilização dos grânulos aeróbios em condições de clima tropical utilizando como inóculo lodo proveniente de uma planta de tratamento de esgoto municipal, projetada apenas para remoção de matéria orgânica. Compreender o processo de formação de lodo granular nessas condições possui grande relevância. O modo como a biomassa granular é formada afeta diretamente a estabilidade do grânulo (TAY *et al.*, 2002; DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004; WANG *et al.*, 2005; ZHENG *et al.* 2006; LEMAIRE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011; ZHANG e ZHANG, 2013; TOH *et al.*, 2013; LOCHMATTER *et al.*, 2013 e ZHANG *et al.*, 2015), bem como a distribuição das diversas zonas aeróbias/anóxicas/anaeróbias ao longo da estrutura granular, o que por sua vez influencia o desempenho do processo de remoção combinada dos diversos poluentes. Além disso, para que a tecnologia se espalhe por todos os continentes e seja estabelecida com sucesso, é fundamental adequar as condições de operação a cada caso específico.

Durante toda a pesquisa, os esforços foram concentrados no intuito de estabelecer as condições de operação que favorecem a remoção combinada de matéria orgânica e nutrientes em sistemas de lodo granular operados em alta temperatura e inoculados com lodo oriundo de sistema de lodos ativados convencional sem remoção de nutrientes.

2- OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi investigar alguns aspectos acerca do desenvolvimento de grânulos aeróbios em altas temperaturas, características de clima tropical. O trabalho foi dividido em duas fases (I e II), sendo que na Fase I os grânulos foram formados sem prévia aclimação do lodo de inóculo, enquanto que na Fase II a formação dos grânulos foi obtida após a aclimação do mesmo.

Os objetivos específicos são apresentados a seguir:

- Aprofundar os conhecimentos relativos à formação do lodo granular a partir do inóculo obtido em um sistema de tratamento de uma região tropical sem remoção de nutrientes;
- Investigar o processo de granulação aeróbia e características dos grânulos formados;
- Entender o efeito das condições operacionais na estabilidade da biomassa granular;
- Avaliar a remoção de matéria orgânica e de nutrientes;
- Entender a dinâmica de remoção de DQO, nitrogênio e fósforo, por meio de testes cinéticos aos longo das diferentes fases de operação;
- Avaliar a comunidade microbiana e relacioná-la com o processo de granulação e conversões biológicas ao longo das Fases I e II.

3- REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo tem o propósito de ilustrar os aspectos teóricos mais importantes para a compreensão do processo de lodo granular aeróbio. Inicialmente será feita uma introdução acerca do tratamento de águas residuárias, focando na remoção biológica de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo.

3.1 Tratamento de águas residuárias

O processo de tratamento de efluentes é dividido em níveis, de acordo com o grau de remoção de poluentes que se deseja atingir. Essas etapas podem ser classificadas como: tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário ou avançado.

De acordo com VON SPERLING (1996), as etapas do tratamento podem ser subdivididas em:

- ✓ Tratamento preliminar: No tratamento preliminar utiliza-se processos físico-químicos. Nesse estágio do tratamento é realizada a remoção dos materiais em suspensão do efluente, por intermédio de grades que removem os materiais com maiores dimensões. Já a separação da água residuária da areia é realizada por meio de canais de desarenação.
- ✓ Tratamento primário: Consiste na separação de partículas sólidas de menor dimensão por meio de processos de floculação e/ou sedimentação, e sedimentação primária. Parte da matéria orgânica é removida nessa etapa.
- ✓ Tratamento secundário: No tratamento secundário ocorre a remoção da matéria orgânica e inorgânica por meio de reações bioquímicas. Essa etapa do tratamento também é conhecida como fase biológica, na qual a matéria orgânica ou inorgânica é degradada por micro-organismos.
- ✓ Tratamento terciário: A etapa do tratamento terciário (também chamado de avançado) consiste em uma série de processos destinados a melhorar a qualidade do efluente proveniente do tratamento primário e secundário. Geralmente, o tratamento terciário pode ser utilizado para efetuar a desinfecção da água residuária para a redução de micropoluentes, carga orgânica residual, cor, sais minerais e metais tóxicos, de maneira a permitir a sua reutilização (GONÇALVES *et al*, 2003). Caso não haja tratamento terciário, o efluente do

decantador secundário pode vir a ser lançado diretamente nos corpos hídricos. Como nesse trabalho o foco está voltado ao tratamento biológico, maiores detalhes acerca desse processo estão descritos na seção 3.2.

3.2 Tratamento biológico de águas residuárias: aspectos fundamentais

O tratamento biológico de esgotos ocorre primordialmente por meio de mecanismos biológicos. Desta forma, a compreensão da microbiologia dos sistemas de tratamento é de fundamental importância para a sua operação e controle.

Uma grande variedade de micro-organismos é encontrada no esgoto, sendo que os principais são bactérias, protozoários, fungos e vermes. As bactérias constituem o grupo de micro-organismos mais numeroso e, sem dúvida, o mais importante na estabilização da matéria orgânica. Além da degradação da matéria carbonácea, o tratamento de esgotos, dependendo das condições ambientais do meio, pode incorporar ainda processos de remoção de outros substratos, que por sua vez também dependem da atividade bacteriana. Entre estes, pode-se citar os processos de nitrificação e desnitrificação, para a remoção de nitrogênio, e o processo de remoção biológica de fósforo, os quais serão discutidos no decorrer desse capítulo.

Aproximadamente 80% da célula bacteriana é composta de água e 20% de matéria seca. Desta matéria seca, em torno de 90% é orgânica e 10% é inorgânica. A fração orgânica das células bacterianas pode ser representada pelas seguintes fórmulas empíricas (VON SPERLING, 1996):

- ✓ $C_5H_7O_2N$, quando o fósforo não é incluído na composição;
- ✓ $C_{60}H_{87}O_{23}N_{12}P$, considerando-se o fósforo na composição.

Além desses nutrientes (ou macronutrientes), a biomassa também necessita de uma série de elementos traço (ou micronutrientes) em quantidades bem menores para realizar seus processos metabólicos. Alguns micronutrientes são: manganês, cobre, zinco, molibdênio, selênio, magnésio, cobalto, cálcio, sódio, potássio e ferro (ECKENFELDER e MUSTERMAN, 1995). Cabe ressaltar que esses macros e micronutrientes devem ser obtidos do meio, ou seja, o esgoto afluente ao sistema de tratamento deve suprir essas necessidades, sendo que a eventual falta de algum deles pode limitar o crescimento bacteriano. Em algumas situações, especialmente no âmbito

industrial, é comum a adição de elementos traço ou até mesmo de macronutrientes para o bom desempenho do sistema.

3.3 Remoção de matéria orgânica

Segundo von Sperling (1996) os sistemas biológicos de tratamento promovem a remoção de constituintes orgânicos e inorgânicos das águas residuárias por meio de ação de micro-organismos, os quais permitem certa reprodução dos processos que ocorrem naturalmente no meio ambiente. Esses organismos consomem os substratos presentes nos efluentes, formando produtos inertes e com baixo potencial poluidor (VON SPERLING, 1996).

Face à enorme variedade de substâncias orgânicas presentes na maioria das águas residuárias, é totalmente impraticável determiná-las individualmente. Para quantificar a massa de material orgânico presente no esgoto, utiliza-se a propriedade das substâncias orgânicas de serem oxidadas. Existem dois testes diferentes baseados nesse princípio que são utilizados para quantificar a matéria orgânica total: o teste de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e o teste de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO).

A remoção da matéria orgânica presente no esgoto ocorre por intermédio de processos físicos ou bioquímicos, dependendo fundamentalmente do tamanho da partícula. O material particulado pode ser removido em decantadores, por meio de simples processos físicos de sedimentação. A remoção e estabilização da matéria orgânica coloidal e solúvel, presente no esgoto, depende de processos, conjuntos ou não, de adsorção, absorção, síntese e respiração, cuja ocorrência está relacionada com a facilidade de degradação da partícula orgânica. Nos primeiros estágios do tratamento, as impurezas orgânicas são adsorvidas na superfície dos flocos ou grânulos biológicos, nos quais são sequencialmente hidrolisadas por enzimas extracelulares, gerando moléculas menores que podem atravessar a parede celular bacteriana. Compostos orgânicos complexos que não são hidrolisados aderem-se à fração lipídica da membrana citoplasmática, sendo então absorvidos para dentro da célula bacteriana (IWPC, 1987).

Os substratos imediatamente disponíveis (rapidamente biodegradáveis) presentes no esgoto ou ainda os produtos dos processos de adsorção e absorção são utilizados pelos micro-organismos para a geração de energia e síntese celular, por meio de um processo conjunto denominado de metabolismo. A transformação química do substrato

em produtos estáveis e energia é chamada de catabolismo ou dissimilação. Já no processo denominado anabolismo, ocorrem reações que conduzem à formação de material celular com a energia produzida no catabolismo. Por este motivo, diz-se que esses dois processos (catabolismo e anabolismo) são interdependentes e sempre ocorrem simultaneamente (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999).

Segundo Von Sperling (1996), o catabolismo oxidativo é uma reação na qual a matéria orgânica é oxidada por um agente oxidante presente no meio líquido (oxigênio, nitrato ou nitrito), enquanto que o fermentativo é aquele que ocorre na ausência de oxidante. Nesse último caso, não ocorre a decomposição completa dos compostos orgânicos, apenas uma conversão entre eles.

O tratamento biológico de esgotos aproveita, portanto, um conjunto de micro-organismos com características diferentes para a degradação da matéria orgânica, podendo ser distinguidos quatro grupos de tratamento: aeróbios, anóxicos, anaeróbios e combinados. Os aceptores de elétrons mais importantes na oxidação da matéria orgânica em tratamento biológico de esgoto em ordem decrescente de liberação de energia estão representados na Tabela 3.1 (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994).

Tabela 3.1: Aceptores de elétrons típicos das reações de oxidação no tratamento de esgoto.

CONDIÇÕES	ACCEPTOR DE ELÉTRONS	FORMA DO ACCEPTOR APÓS A REAÇÃO
Aeróbias	Oxigênio (O ₂)	Água (H ₂ O)
Anóxicas	Nitrato (NO ₃ ⁻)	Nitrogênio gasoso (N ₂)
Anaeróbias	Sulfato (SO ₄ ⁻)	Sulfeto (H ₂ S)
	Dióxido de carbono (CO ₂)	Metano (CH ₄)

3.3.1 Remoção de matéria orgânica em condições aeróbias

Pela ação bacteriana, a oxidação biológica é a conversão de componentes orgânicos a formas inorgânicas, sendo que na oxidação aeróbia, as bactérias utilizam o oxigênio molecular comoceptor final de elétrons (METCALF e EDDY, 1991).

A matéria orgânica do esgoto é oxidada por meio da respiração aeróbia dos organismos que formam os flocos. Segundo Sant'Anna (2010), os flocos são

constituídos por um grupo de bactérias denominadas “formadoras de flocos” e outro grupo de bactérias que formam filamentos, sendo o equilíbrio entre estes grupos muito importante para assegurar a formação de flocos relativamente densos e fortes.

O oxigênio necessário para essa respiração deve estar no próprio esgoto (constituindo o oxigênio dissolvido), podendo ser enriquecido pela atividade de micro-organismos fotossintetizantes, por contato direto com o ar ambiente ou por introdução mecânica de difusores de ar (HIGA, 2005).

As etapas do processo de biodegradação, consistem na adsorção dos poluentes presentes na fase aquosa nas superfícies dos filmes, flocos e grânulos microbianos. Essa adsorção é rápida para material orgânico particulado e para moléculas orgânicas de elevada massa molar. Até mesmo moléculas orgânicas menores são rapidamente adsorvidas nos aglomerados microbianos (SCHMIDELL *et al.*, 2007). A seguir, as moléculas menores são transportadas no interior da matriz exopolimérica até atingir as superfícies das células microbianas. A última etapa do processo consiste da assimilação das substâncias (poluentes) pelos micro-organismos. Uma vez transportadas para o interior das células, essas substâncias seguirão rotas metabólicas específicas, características dos processos aeróbios de degradação. No interior das células, as moléculas absorvidas podem se inserir nas rotas de catabolismo, que geram energia para síntese de novas moléculas e para as demais atividades celulares, ou nas rotas de anabolismo, responsáveis pela biossíntese das moléculas essenciais ao funcionamento da célula. De modo simplificado, pode-se pensar que um átomo de carbono de uma dada molécula assimilada pela célula tem dois destinos preponderantes: pode ser constituinte de substâncias produzidas pelas células para a sua manutenção e, principalmente, reprodução, ou pode ser oxidado a CO₂, gerando energia para a atividade de síntese e outras atividades celulares (SCHMIDELL *et al.*, 2007).

A glicose é, quantitativamente, o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos, sendo por isso frequentemente utilizada para ilustrar a sequência de vias metabólicas utilizadas na degradação da matéria orgânica por via aeróbia. A glicólise e o Ciclo de Krebs, juntamente com a cadeia respiratória, podem realizar a oxidação completa da glicose, levando-a a dióxido de carbono e água (PICKBRENNER, 2002).

Cabe ressaltar ainda que, em condições de ausência de matéria orgânica no meio líquido, a própria massa celular, que contém material biodegradável, pode ser oxidada,

ainda que parcialmente, a compostos inorgânicos. Essa auto-oxidação do material celular chamada de respiração endógena (TCHOBANOGLIOUS e BURTON, 1991).

3.3.2 Remoção de matéria orgânica em condições anóxicas

O catabolismo anóxico é uma reação redox na qual a matéria orgânica é oxidada por um agente oxidante presente no meio líquido. Quando vários aceptores de elétrons encontram-se no meio, o sistema utiliza aquele que produz a maior quantidade de energia. Isto explica por que o oxigênio é utilizado primeiramente e, após sua exaustão, o sistema deixa de ser aeróbio (HORAN, 1990). Desta forma, a respiração é dita aeróbia se o oxidante for o oxigênio molecular e anóxica se o oxidante for o nitrato ou nitrito, havendo formação de nitrogênio gasoso, sulfeto, dióxido de carbono e água (METCALF e EDDY, 1991).

Nos processos de desnitrificação e redução de sulfatos, os nitratos e sulfatos, respectivamente, da mesma maneira que o oxigênio, na respiração aeróbia, agem como aceptores finais de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Estes compostos servem como substitutos do oxigênio, levando à pequenas modificações do sistema metabólico das bactérias. Utilizando nitrato no lugar de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons, ocorre a formação de uma menor quantidade de energia (ATP). Similarmente, mais energia é gerada quando se utiliza nitrato como acceptor, comparando-se com o sulfato (EPA, 1993).

3.3.3 Remoção de matéria orgânica em condições anaeróbias

A digestão anaeróbia é um processo biológico em que, na ausência de oxigênio, bactérias facultativas ou estritamente anaeróbias degradam compostos orgânicos complexos, convertendo-os em gases como metano (60 a 70%), dióxido de carbono (40 a 30%) e outros subprodutos mineralizados (SOUZA, 2001).

A degradação da matéria orgânica pela via anaeróbia apresenta maior complexidade comparando com o que ocorre no processo aeróbio, pois demanda a participação de diferentes grupos microbianos com funções diferenciadas (SANT'ANNA, 2010).

Aquino e Chernicharo (2005) também afirmam que o tratamento anaeróbio envolve processos metabólicos complexos, que ocorrem em etapas sequenciais e que dependem da atividade de no mínimo três grupos de micro-organismos distintos:

- ✓ Bactérias fermentativas ou acidogênicas, que fermentam açúcares, aminoácidos e ácidos graxos resultantes da hidrólise da matéria orgânica complexa, e produzem ácidos orgânicos, álcoois, cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio. Como os micro-organismos fermentativos não dispõem, em condições anaeróbias, de um aceptor final de elétrons (como o oxigênio nos processos aeróbios), o substrato orgânico é ao mesmo tempo utilizado como aceptor e doador de elétrons, ou seja, uma parte do composto orgânico poluente é oxidada enquanto outra parte é reduzida;
- ✓ Bactérias acetogênicas, que convertem compostos orgânicos intermediários como propionato e butirato, em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono;
- ✓ Arqueas metanogênicas, que são as mais importantes, pois a remoção completa da matéria orgânica da fase líquida depende da conversão de acetato em gás metano.

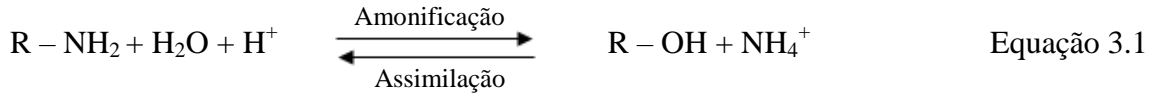
3.4 Remoção biológica de nitrogênio

O esgoto sanitário contém nitrogênio na forma de amônia e na forma orgânica, sendo que no esgoto fresco cerca de 60% do nitrogênio apresenta-se na forma orgânica (ureia, aminoácidos e outras substâncias orgânicas com o grupo amina) e 40% na forma de nitrogênio amoniacal (na forma de amônia livre (NH_3), ou na forma iônica (NH_4^+)). Ocasionalmente, podem ocorrer traços de formas oxidadas do nitrogênio, tal como nitrito (NO_2^-) ou nitrato (NO_3^-). Para quantificar a quantidade de material nitrogenado presente no esgoto, determinam-se as concentrações de nitrogênio em suas diferentes formas. Para tanto, é comum a determinação do teor de nitrogênio total Kjeldahl (que fornece a soma das formas de nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico). Nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato são geralmente determinados por meio de testes espectrofotométricos e cromatografias iônicas (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999).

O nitrogênio que entra num sistema biológico de tratamento pode ser removido ou transformado em outras formas, de acordo com as condições ambientais do meio. As transformações dos compostos de nitrogênio podem ocorrer por intermédio de diversos mecanismos, sendo que os principais, são: amonificação, síntese (ou assimilação), nitrificação e desnitrificação (Figura 3.1).

Por meio da atividade endógena, o nitrogênio orgânico é transformado em nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$), envolvendo reações bioquímicas catalisadas por

enzimas. Esse processo é denominado amonificação (Equação 3.1) devido à formação de amônia como produto da reação. Observa-se pela reação que, além da formação de amônia, a amonificação também produz hidroxila (OH), o que pode ajudar no processo de nitrificação, visto que a esta última etapa tende a consumir alcalinidade e reduzir o pH (METCALF e EDDY, 2003).



Metcalf e Eddy (2003) afirmam que quando se trata de esgotos sanitários, a amonificação é sempre uma das etapas limitantes do processo de nitrificação. Nesse tipo de água residuária, a ureia é a principal fonte de nitrogênio orgânico, e sua transformação para nitrogênio amoniacal pode ser facilmente efetuada pela enzima urease, quando a mesma se encontra presente. Porém, na sua ausência, o processo de amonificação fica comprometido e muitas vezes não é executado, o que compromete significativamente a taxa da nitrificação.

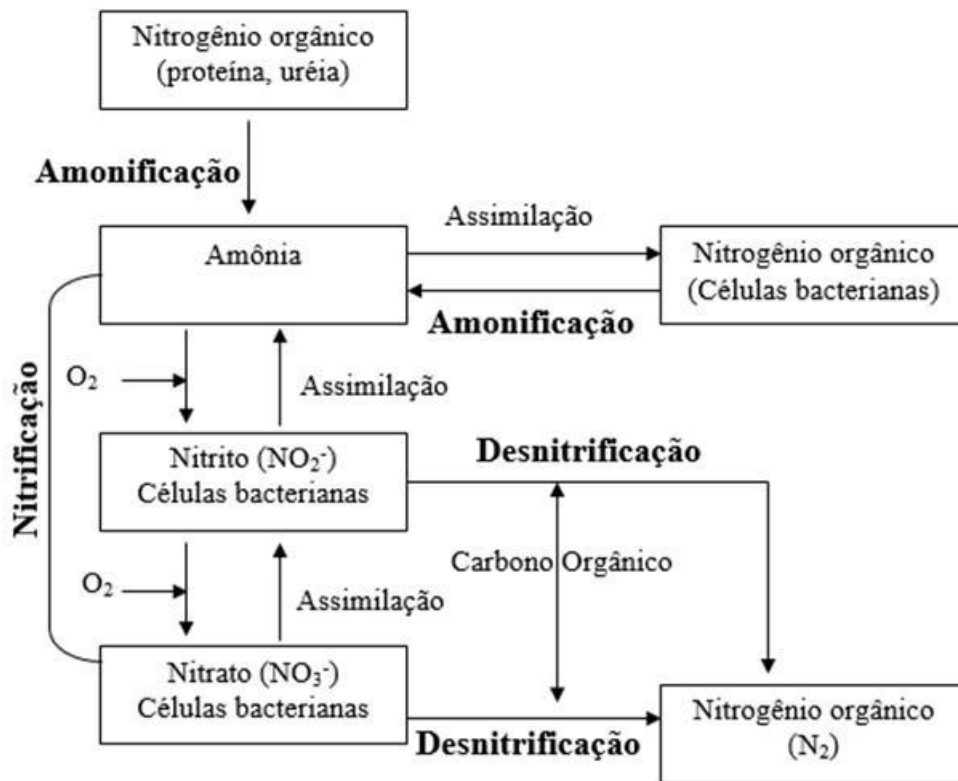


Figura 3.1: Transformações do nitrogênio em processos biológicos de tratamento (Fonte: Adaptado de Sedlak, 1991).

A amonificação pode ocorrer na própria rede coletora de esgoto, em sistemas de tratamento primário, ou em reatores anaeróbios, nos quais a grande maioria dos compostos orgânicos nitrogenados presentes no esgoto é convertida a nitrogênio amoniacal.

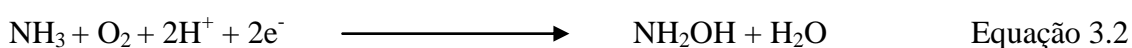
A eliminação de nitrogênio de uma água residuária é tradicionalmente realizada por um processo que envolve duas etapas distintas. Na primeira etapa, designada por nitrificação, o amônio passa a nitrato em condições aeróbias, tendo o oxigênio como acceptor de elétrons na cadeia respiratória, permitindo a reoxidação das coenzimas e a geração de ATP. Na segunda etapa, designada por desnitrificação, o nitrato é convertido a nitrogênio gasoso (N₂), tendo como possíveis intermediários gasosos o óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N₂O), igualmente lançados na atmosfera. A desnitrificação é realizada em condições anóxicas, tendo o nitrato como acceptor de elétrons (MADIGAN *et al.*, 1997, UEMOTO e SAIKI, 2000). As etapas de nitrificação e desnitrificação estão detalhadas a seguir, nos itens 3.4.1 e 3.4.2, respectivamente.

3.4.1 Nitrificação

- **Descrição do processo**

O processo de nitrificação é realizado pela ação de um conjunto de diversos micro-organismos, principalmente bactérias, sendo grande parte delas pertencentes a determinados gêneros mais frequentes, o gênero *Nitrosomonas*, responsável pela conversão da amônia a nitrito (ou seja, bactérias oxidadores de amônio - AOB), e os gêneros *Nitrobacter* e *Nitrospira*, responsável pela conversão de nitrito a nitrato (ou seja, as bactérias oxidadoras de nitrito - NOB).

A reação de nitrificação (efetuada pelas BOA) é realizada em duas etapas. A primeira ocorre no interior da membrana citoplasmática na qual a amônia é oxidada a hidroxilamina (NH₂OH), por meio da ação da enzima amônia mono-oxigenase, contanto que os requisitos de oxigênio molecular e energia para promover a reação estejam disponíveis (Equação 3.2).



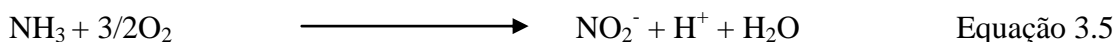
Na segunda etapa, a hidroxilamina é transportada para o periplasma e convertida a nitrito, por meio da ação da enzima hidroxilamina oxidoreductase, liberando dois pares de elétrons (Equação 3.3).



Um par é utilizado na primeira etapa de oxidação da amônia enquanto o segundo par é utilizado para a produção de energia e redução do oxigênio molecular em água (Equação 3.4) (HAGOPIAN e RILLEY, 1998; COLLIVER e STEPHENSON, 2000).



A Equação 3.5 representa a reação global de nitritação.



A reação de nitratação (efetuada pelas BON) é realizada pela enzima nitrito oxidoreductase com o oxigênio molecular podendo ser suprido pela água (Equação 3.6).



A reação libera um par de elétrons que também é utilizado na produção de energia e redução do oxigênio molecular em água (Equação 3.7) (HAGOPIAN e RILLEY, 1998; COLLIVER e STEPHENSON, 2000).



A Equação 3.8 representa a reação global de nitratação.



Sistemas biológicos de tratamento de esgoto com nitrificação tendem a demandar grandes quantidades de oxigênio, pois o oxigênio dissolvido disponível é

utilizado concomitantemente pelos organismos heterótrofos responsáveis pela remoção da matéria carbonácea em ambientes aeróbios, e pelos organismos autotróficos nitrificantes. Ao se considerar a quantidade de bactérias nitrificantes presentes no sistema em relação às bactérias heterotróficas, na maioria dos casos as bactérias heterotróficas predominam, competindo assim pelo oxigênio disponível (NOGUEIRA *et al.*, 1998).

Quando se utiliza processos combinados anaeróbio/aeróbio, grande parte da matéria orgânica é removida no estágio anaeróbio. Nessas circunstâncias, a nitrificação é favorecida devido à pouca quantidade de matéria orgânica presente no reator aeróbio, o que reduz a quantidade de bactérias heterotróficas no reator aeróbio. Com isso, o consumo de oxigênio para a remoção de matéria orgânica é diminuído. Porém, ao se considerar a remoção de nitrogênio e não somente o processo de nitrificação, essa situação não é favorável, uma vez que há pouca disponibilidade de matéria orgânica para a desnitrificação, além da possibilidade formação de compostos, que dependendo da sua concentração no meio, são capazes de inibir totalmente a nitrificação (GUIMARÃES, 2002; DERKS, 2007; PORTO, 2007).

O crescimento muito lento é uma característica das bactérias nitrificantes. Outra observação importante é que na nitrificação há a geração de íons H^+ , ou seja, alcalinidade é consumida. De acordo com a reação estequiométrica, esse consumo se dá na proporção de 7,14 $mgCaCO_3/mgN-NH_4$, de forma que pode ocorrer uma diminuição do pH para valores que limitam a nitrificação ($pH < 5,5$). A alcalinidade pode ser fornecida por fontes externas, ou ser obtida por meio da combinação da nitrificação com outros processos biológicos, como a amonificação e a desnitrificação, os quais fornecem alcalinidade ao meio (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999).

- **Fatores ambientais que influenciam a nitrificação**

Os seguintes fatores ambientais influenciam na taxa de crescimento dos organismos nitrificantes e, conseqüentemente, na taxa de oxidação da amônia: temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD) e presença de substâncias tóxicas inibidoras.

- ✓ Temperatura: A temperatura apresenta um efeito pronunciado nas taxas de crescimento das bactérias nitrificantes. Temperaturas mais altas aparecem como sendo favoráveis ao desenvolvimento desse tipo de bactérias, sendo 28°- 36° a faixa considerada ótima para a nitrificação (MARCHETTO, 2001). Segundo von

Sperling (1997) para cada acréscimo de 7° C a taxa de crescimento das bactérias nitrificantes dobra.). Ao contrário de outros parâmetros, como pH e OD, a temperatura, do ponto de vista operacional, é um parâmetro difícil de ser controlado. Conseqüentemente, em regiões de clima frio, há a necessidade de aplicação de maiores tempos de retenção celular para que ocorra a completa nitrificação.

- ✓ pH: A maioria dos pesquisadores refere-se a um valor praticamente constante das taxas de crescimento das nitrificantes na faixa de pH situada entre 7 a 8,5. Uma rápida diminuição das taxas de nitrificação é observada em valores de pH fora desta faixa (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999). Geralmente, as águas residuárias de origem sanitária apresentam um pH entre 7 e 8. No entanto, em sistema de lodos ativados, o pH tende a diminuir devido ao consumo de alcalinidade, causado pela nitrificação e pela oxidação do material orgânico. Desta forma, dificilmente o pH destes sistemas terá valores superiores a 8,5. O limite inferior de pH, que irá depender da alcalinidade do esgoto afluente, portanto, é o fator que acarreta em maiores cuidados. Por fim, o pH pode afetar o equilíbrio químico entre formas ionizadas e não ionizadas de amônia e nitrito, que em determinadas concentrações, podem inibir o processo de nitrificação.
- ✓ Oxigênio dissolvido (OD): O OD é um pré-requisito indispensável para a ocorrência da nitrificação. No entanto, da mesma forma que o pH, existe na literatura uma grande variação das concentrações de OD consideradas ótimas para a nitrificação. Tomando-se por base que o valor da concentração mínima de OD no seio do líquido para manter um ambiente aeróbio dentro do floco microbiano depende de vários fatores, como o tamanho do floco, intensidade da agitação, temperatura e taxa de consumo de OD, é fácil compreender a grande variabilidade dessas concentrações (FERREIRA, 2000; DERKS, 2007).
- ✓ Relação entre material orgânico e nitrogênio (razão C/N): Existem vários estudos apresentados em literatura relatando que a presença de matéria orgânica biodegradável inibe indiretamente a ação das bactérias nitrificantes. Segundo EPA (1993), esta inibição pode ser atribuída à condição autotrófica das bactérias nitrificantes, que, por apresentarem menores taxas de crescimento que as bactérias heterotróficas, acabam sendo arrastadas de sistemas operados com baixas idades de lodo. Já Grady e Lim (1980) sugerem que a nitrificação pode

ocorrer em altas taxas, mesmo na presença de matéria orgânica, desde que fatores ambientais como pH e OD mantenham-se nas faixas ótimas.

- ✓ Substâncias tóxicas inibidoras: Muitas substâncias apresentam concentrações críticas que podem inibir organismos heterotróficos e/ou organismos nitrificantes em processos biológicos. A inibição pode ocorrer como consequência da diminuição da atividade enzimática, que causa uma redução das taxas de consumo de oxigênio e do crescimento celular bacteriano. Os inibidores podem ser agrupados em duas grandes categorias, irreversíveis e reversíveis, segundo a estabilidade de sua ligação com as enzimas (MARZOCCO e TORRES, 1999). Os inibidores irreversíveis reagem quimicamente com as enzimas, levando a uma inativação praticamente definitiva. Este tipo de inibidor é muito tóxico para os organismos, devido não só à irreversibilidade de sua ligação às enzimas, mas também em virtude de sua inespecificidade, sendo, em princípio capazes de inativar qualquer enzima. Como exemplos de inibidores irreversíveis pode-se mencionar o cianeto, a azida, o sulfeto, o cloro e o ozônio. Os inibidores reversíveis são divididos principalmente em dois grupos: os competitivos e os não competitivos. O critério usado para esta divisão é o estabelecimento (ou não) de competição entre o inibidor e o substrato pelo centro ativo da enzima. Certas moléculas, por apresentarem a configuração espacial semelhante à do substrato, são capazes de ligarem-se ao centro ativo da enzima, produzindo um complexo enzima-inibidor, semelhante ao complexo enzima-substrato. Portanto, o inibidor compete com o substrato por um lugar na enzima. São os chamados inibidores competitivos. Neste caso, o complexo enzima-inibidor jamais gera produtos, de maneira que a atividade enzimática estará diminuída de acordo com a fração de enzima que estiver ligada ao inibidor. É importante ressaltar que neste tipo de inibição o efeito inibitório pode ser superado por intermédio de um acréscimo das concentrações de substrato no meio. Já os inibidores pertencentes à classe dos não-competitivos, não apresentam qualquer semelhança estrutural com o substrato da reação que inibem. Seu efeito é provocado por ligações a radicais que não pertencem ao centro ativo enzimático. Estas ligações, no entanto, alteram a estrutura enzimática a tal ponto que inviabiliza a catálise. São exemplos de inibidores não-competitivos os metais pesados, como o mercúrio, o chumbo e a prata.

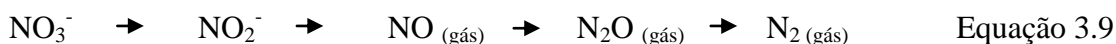
(GRADY e LYM, 1980; GAUDY e GAUDY, 1988 e MARZOCCO e TORRES, 1999).

3.4.2 Desnitrificação

- **Descrição do processo**

Quando o oxigênio torna-se limitante para a respiração aeróbia e há presença de NO_3^- (nitrato) no meio, diz-se que o ambiente tornou-se anóxico. É então neste ambiente anóxico que é promovida a desnitrificação, quando o nitrato passa a ser utilizado como acceptor de elétrons após a ausência do O_2 (VAZOLLER *et al.*, 2001).

A desnitrificação segue a sequência de reações mostrada na Equação 3.9, sendo que em cada etapa atua uma enzima redutase específica que media as transformações.



Como intermediário, o N_2O pode acumular, sob certas condições, e ser subsequentemente liberado para a atmosfera (PAN *et al.*, 2012). Quatro enzimas diferentes, a saber, nitrato redutase, nitrito redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, estão envolvidos no processo de desnitrificação. As equações de 3.10 a 3.13 exemplificam as reações catalisadas por essas quatro enzimas, respectivamente.



A remoção de nitrogênio pelo processo de desnitrificação é consequência de uma reação redox para obtenção de energia de compostos orgânicos. Nessa reação, nitrito e nitrato têm a mesma função que o oxigênio, ou seja, são aceptores de elétrons. Esses compostos de nitrogênio oxidado prontamente substituem o oxigênio porque na desnitrificação o caminho metabólico é bastante similar ao da respiração aeróbia, diferenciando-se somente nas enzimas catalisadoras da transferência final de elétrons

(WRC, 1984). Em comparação com a respiração aeróbia, a cadeia transportadora de elétrons, na desnitrificação, apresenta-se mais curta, acarretando conseqüentemente uma menor quantidade de energia gerada. Portanto, o crescimento por meio da respiração anóxica, em que nitrato e nitrito são os aceptores finais de elétrons, apresenta-se menos eficiente que o crescimento por intermédio da respiração aeróbia (GRADY e LIM, 1980).

Uma grande variedade de bactérias pode realizar o processo de desnitrificação. Devido à habilidade destes micro-organismos em utilizar como aceptores finais de elétrons na oxidação da matéria orgânica tanto as formas oxidadas de nitrogênio (nitrato e nitrito) como o oxigênio, eles são chamados de heterotróficos facultativos (GRADY e LIM, 1980). Em ambiente aeróbio, utilizam preferencialmente o oxigênio comoceptor final de elétrons e, em ambiente anóxico, utilizam o nitrato, sempre consumindo a matéria orgânica e convertendo-a em CO₂ e H₂O. Assim, a desnitrificação pode diminuir o consumo de O₂ requerido para a remoção de matéria orgânica além de devolver parte da alcalinidade do sistema que venha a ser consumida pelo processo de nitrificação (VAN HAANDEL e VAN DER LUBBE, 2007).

Para que a desnitrificação ocorra, além dos aceptores de elétrons, torna-se necessária a presença de doadores de elétrons, representados por compostos de origem orgânica. De acordo com a natureza do material orgânico, as seguintes fontes de carbono podem ser utilizadas no processo de desnitrificação (ABUFAYED e SCHROEDER, 1986, JONES *et al.*, 1990a):

- ✓ Fonte externa de carbono: corresponde a compostos que não estão presentes naturalmente na água residuária afluyente, normalmente suplementados externamente. Os principais compostos utilizados são metanol, metano, etanol, acetona e ácido acético.
- ✓ Fonte interna de carbono: corresponde à matéria orgânica presente na água residuária afluyente. No entanto, uma vez que a matéria orgânica seja totalmente removida da solução, é possível que uma série de reações intermediárias ocorram no sistema, liberando substratos que podem ser utilizados como fonte de carbono na desnitrificação. Substâncias orgânicas intracelulares são um exemplo deste tipo de substrato. Os principais representantes deste grupo são produtos de reserva, como glicogênio e os polihidroxialcanoatos (PHA). Quando estas reservas celulares são exauridas ou simplesmente não foram desenvolvidas

na célula bacteriana, a desnitrificação pode dar-se por produtos do decaimento bacteriano (endogenia). Além disso, produtos presentes na própria planta de tratamento de esgoto, como o lodo de tratamento primário, também são considerados como fonte interna de carbono para a desnitrificação. Neste caso, a capacidade de utilização deste lodo, que se apresenta principalmente na forma particulada, será governada pela hidrólise deste material.

O último passo para a remoção do nitrogênio por via biológica é a desnitrificação e, portanto, em sistemas combinados de remoção de matéria orgânica e nutrientes, esse processo pode ser prejudicado pela ausência de fonte de carbono para as bactérias desnitrificantes, pois a quase totalidade da matéria orgânica afluenta ao sistema pode ter sido removida nas etapas anteriores à desnitrificação.

- **Vantagens da desnitrificação**

Em sistemas de tratamento de águas residuárias no qual ocorre a nitrificação, é sempre interessante que a desnitrificação ocorra. Além obviamente da redução do nível de nitrato no efluente, minimizando as consequências do seu aporte nos corpos d'água (como a eutrofização), outras vantagens advindas com a introdução deste processo são relacionadas a seguir.

- ✓ Economia de alcalinidade: A alcalinidade aumenta com a desnitrificação, revertendo parcialmente o efeito de consumo de alcalinidade produzido pela nitrificação. Conforme observado na reação da desnitrificação, cada 1 mol de nitrato reduzido consome 1 mol de H^+ e durante a nitrificação, cada 1 mol de nitrato produzido implica na formação de 2 moles de H^+ . Desta forma, o processo de desnitrificação resulta em uma redução teórica de 50% no consumo de alcalinidade (VON SPERLING, 1997).
- ✓ Economia de oxigênio: O oxigênio liberado durante a redução de nitratos pode ser imediatamente utilizado para a oxidação biológica da matéria orgânica. Para cada 1 gNO_3^- reduzido são liberados 2,86 gO_2 para o sistema, e a oxidação de 1 g de nitrogênio na forma de amônia implica no consumo de 4,57g de O_2 . Desta forma, um sistema que consegue atingir 100 % de eficiência no processo de desnitrificação pode ter uma economia de 62,5 % ($2,86/4,57$) no consumo de oxigênio usado na nitrificação (WRC, 1984).

- ✓ Melhoria das características de sedimentabilidade: Sob determinadas condições, como altas temperaturas e um tempo de retenção elevado na etapa de sedimentação, passa a ser criada uma situação favorável para a ocorrência de desnitrificação nos decantadores. Nitratos formados na nitrificação são reduzidos a N_2 , que se aderem ao lodo, impedindo-o de sedimentar. A introdução de uma estratégia operacional que garanta a eficiência da desnitrificação, anteriormente à etapa de sedimentação, elimina o risco da ocorrência deste tipo de flotação do lodo, que pode deteriorar o sistema de tratamento de esgotos (VON SPERLING, 1997).

- **Fatores ambientais que influenciam a desnitrificação**

A desnitrificação, quando comparada com a nitrificação, apresenta-se como um processo bastante robusto, sendo menos afetado pelas variações ambientais. Isto ocorre porque as bactérias responsáveis pela desnitrificação são micro-organismos heterotróficos, mais resistentes que as bactérias autotróficas nitrificantes. Os seguintes fatores ambientais influenciam a taxa de desnitrificação: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e substâncias tóxicas inibidoras (GERARDI, 2006).

- ✓ Temperatura: Muitas das bactérias responsáveis pela desnitrificação possuem uma boa capacidade de adaptação às variações de temperatura. EPA (1993), numa síntese de vários trabalhos encontrados em literatura, verificaram que estas bactérias são mais sensíveis a temperaturas abaixo de 20°C. Acima dessa temperatura, as taxas de desnitrificação são relativamente constantes (HALLING-SORENSEN E JORGENSEN, 1993).
- ✓ pH: Como já mencionado, o processo de desnitrificação acarreta o aumento dos valores de pH no meio líquido. A magnitude deste aumento depende do efeito de tamponamento de cada sistema, da quantidade de nitrato/nitrito desnitrificados e dos processos conjuntos de oxidação da matéria carbonácea e de nitrificação, que também como já relatado anteriormente, consomem alcalinidade do meio. Grady e Lym (1980) estudaram a variação da taxa de desnitrificação com o pH. As máximas taxas apresentaram-se na faixa de pH de 6,5 a 7,5, ocorrendo uma brusca queda nessas taxas para valores de pH acima de 8,0 e abaixo de 6,0. Essas faixas de pH conferem com os diversos estudos apresentados em literatura.

- ✓ Oxigênio dissolvido (OD): A ausência de OD é obviamente um pré-requisito fundamental para a ocorrência da desnitrificação. A maioria dos estudos mostram que as taxas de desnitrificação tendem a valores próximo de zero em concentrações de OD acima de 0,2 mg/L (RANDALL *et al.*, 1992). A taxa de desnitrificação em condições aeróbias depende da fração anóxica do floco biológico e da concentração de matéria orgânica disponível no meio, sendo o processo totalmente inibido em concentrações de OD acima de 1 mg/L (SEDLAK, 1991).
- ✓ Relação DQO/N: A mínima razão DQO/N requerida para permitir a completa desnitrificação encontra-se na faixa de 2,9 a 5, variando de acordo com a fonte de carbono utilizada (HALLING-SORENSEN e JORGENSEN, 1993). Na prática, a quantidade de matéria orgânica necessária para satisfazer eficientemente o processo depende de quanto material orgânico está disponível exclusivamente para a desnitrificação, da fração biodegradável da DQO total afluente e da taxa de crescimento dos micro-organismos.
- ✓ Substâncias tóxicas: As bactérias nitrificantes são muito mais sensíveis a substâncias tóxicas ou inibidoras em relação às bactérias heterotróficas responsáveis pela desnitrificação. No caso do processo conjunto de nitrificação e desnitrificação, caso haja a presença de substâncias tóxicas ou inibidoras, é bem provável que a desnitrificação seja afetada de forma adversa pela simples razão da nitrificação ter sido inibida.

3.5 Remoção biológica de fósforo

- **Descrição do processo**

O fósforo é um elemento importante para os micro-organismos nos processos de transferência de energia e como componente celular. A constituição típica de fósforo nas bactérias é de 1,5 a 3% de seu peso seco. Em esgoto doméstico, o fósforo está presente principalmente na forma de ortofosfato, polifosfato e ou simplesmente fosfato. Esse nutriente pode também estar sob a forma de fosfato orgânico, que compõem as moléculas orgânicas (VON SPERLING, 2005). Jordão e Pessoa (2005) apresentam valores típicos de fósforo total em torno de 20, 10 e 5 mg/L, para esgotos classificados como forte, médio e fraco, respectivamente.

A remoção de fosfato por meio biológico pode ser realizada por dois mecanismos independentes: (1) Absorção direta do fósforo por meio do crescimento de plantas ou células em suspensão, e (2) estímulo da capacidade de estocagem de fósforo, na forma de polifosfato, da biomassa microbiana no lodo. O primeiro mecanismo não contribui significativamente para a remoção de fósforo do sistema, uma vez que, como mencionado, o teor de fósforo das células bacterianas é pequeno. Devido às baixas eficiências de remoção de fósforo por meio do crescimento bacteriano, foram desenvolvidos sistemas biológicos de remoção de fósforo baseado no crescimento seletivo de bactérias acumuladoras de polifosfato inorgânico, mais conhecidos como organismos acumuladores de polifosfato (PAO) (DE-BASHAN e BASHAN, 2004).

A remoção biológica de fósforo envolve modificações operacionais nos sistemas convencionais de tratamento que resultam no crescimento de uma população biológica que tem a capacidade de acumular uma maior quantidade de fósforo do que a requerida para os processos anabólicos, isto é, para o crescimento celular.

Em certos processos de tratamento de efluentes, micro-organismos são sujeitos a um regime de “falta e fartura” de alimentos. Certos micro-organismos respondem a esse regime acumulando polímeros de reserva quando o substrato está presente. Os polímeros de reserva são usados para crescimento quando o substrato externo se torna escasso. Vários tipos de polímeros orgânicos de reserva foram descritos em literatura, podendo-se citar entre estes polihidroalcanoatos (PHA), glicogênio e lipídeos (VAN LOOSDRECHT *et al.* 1998). O produto de reserva orgânico mais comumente associado ao processo de remoção de fósforo são os PHA, sendo o mais comum o polihidroxibutirato (PHB).

A remoção biológica de fósforo tem sido alcançada por meio da alternância de ambientes aeróbios e anaeróbios na linha de tratamento, condicionando assim o desenvolvimento do processo de remoção biológica intensificada de fósforo, também conhecido como processo ou fenômeno EBPR (do inglês, *enhanced biological phosphorus removal*), como será chamado ao longo do texto. No processo EBPR, o crescimento dos organismos acumuladores de fósforo é favorecido justamente a partir da alternância entre ambientes anaeróbios e aeróbios (OEHMEN *et al.*, 2007).

Em linhas gerais, o princípio básico de um sistema biológico para remoção intensificada de fósforo é a introdução de uma zona anaeróbia à montante de uma zona aeróbia, para a qual a água residuária afluenta é direcionada. Assim, o critério primário

para atingir a capacidade de remoção de fósforo é que a biomassa deve ser submetida a ambientes anaeróbios e aeróbios sequencialmente. O propósito é selecionar a população bacteriana desejada para a remoção e estocagem do substrato orgânico na zona anaeróbia usando a energia das ligações polifosfato, que sofrem hidrólise e permitem as reações bioquímicas no interior da célula.

Em seguida, na zona aeróbia, os polímeros orgânicos estocados previamente são usados pelos organismos para absorver e estocar o fósforo na forma polifosfato, recuperando suas reservas desse composto (FLOWERS *et al.*, 2009).

A configuração mais simples de sistema biológico estimulado para remoção de fósforo consiste de dois estágios em série, sendo o primeiro anaeróbio e o segundo aeróbio. O afluente é alimentado sob condições anaeróbias e a biomassa é recirculada entre as fases anaeróbia e aeróbia. Este modo de operação promove o acúmulo de fósforo pelos PAO. Em contrapartida, essas condições, também favorecem o desenvolvimento de outro grupo de micro-organismos, denominados de organismos acumuladores de glicogênio (doravante designados por GAO, sigla do inglês *glycogen-accumulating organisms*), os quais competem com os PAO pela matéria orgânica disponível em ambiente anaeróbio, mas não contribuem para a remoção de fosfato (ZENG *et al.*, 2002 e OEHMEN *et al.*, 2006a).

Portanto, o mecanismo de remoção biológica de fósforo é baseado nos seguintes princípios (SEDLAK, 1991):

- ✓ Existência de bactérias capazes de armazenar quantidades em excesso de fósforo na forma de polifosfatos;
- ✓ Essas bactérias são capazes de remover substratos simples (ácidos graxos voláteis), produzidos em condições anaeróbias ou presentes no afluente, e assimilá-los como produtos de reserva (principalmente na forma de PHA) dentro de suas células;
- ✓ Na zona aeróbia (com oxigênio) ou anóxica (com nitrato ou nitrito), energia é produzida pela oxidação dos produtos de reserva (PHA), ocorrendo o armazenamento de polifosfatos nas células e síntese celular.

A Figura 3.2 apresenta o mecanismo esquemático de remoção de fósforo, que constitui das fases de fermentação e estocagem de ácidos graxos voláteis (AGV) na fase

anaeróbia na forma de PHA, bem como absorção de fósforo para produção de novas células e manutenção na fase aeróbia às custas do PHA armazenado.

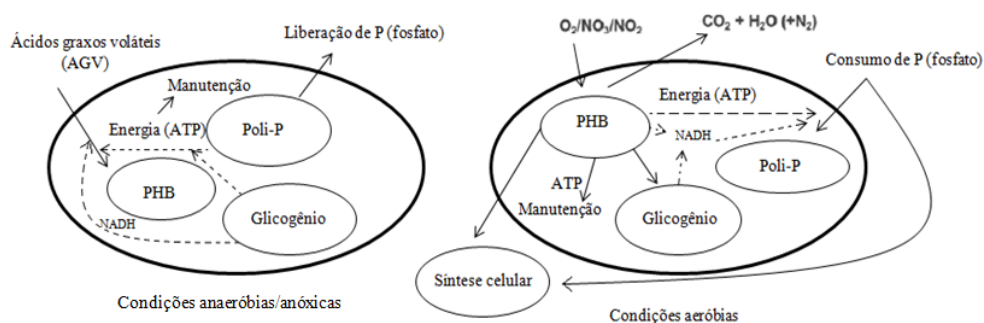


Figura 3.2: Metabolismo de organismos acumuladores de polifosfato em condições anaeróbias ou aeróbias (anóxicas) (adaptado de VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1997). Os PHA estão representados por PHB no esquema, e o metabolismo aeróbio (anóxico) mostrado no esquema representa a situação na qual o substrato externo não está disponível.

A fermentação na zona anaeróbia é importante na produção de substratos apropriados para os PAO. Os produtos de fermentação produzidos por bactérias facultativas (normalmente presentes nos esgotos e na zona anaeróbia) são derivados da porção solúvel da DBO afluente. Durante a fase anaeróbia, esses produtos de fermentação (ácidos graxos de cadeia curta) são absorvidos utilizando energia derivada da hidrólise de polifosfato intracelular, ocorrendo a liberação de ortofosfato para o meio líquido. Parte da energia também provém do glicogênio, que fornece o potencial de redução para transformar ácidos graxos em PHA.

Os ácidos graxos são então polimerizados em um ou mais PHA e armazenados dentro da célula. Durante a fase aeróbia, os PHA são oxidados e o fósforo solúvel é absorvido em excesso do meio líquido, sendo parte utilizado para o crescimento celular e o restante usado para recuperar os níveis de polifosfato. Durante esse processo, os PAO crescem e reabastecem suas reservas de glicogênio (EPA, 1987; WENTZEL *et al.*, 1990).

Portanto, o processo de remoção de fósforo necessita de uma fonte de carbono, compostos de baixo peso molecular, como o ácido acético e o ácido propiônico (SEDLAK, 1991). Se há substrato orgânico disponível, a zona anaeróbia atua como um seletor biológico aumentando a população de PAO e simultaneamente suprimindo o crescimento de micro-organismos filamentosos (REDDY, 1998).

Diante desse mecanismo de liberação anaeróbia e consumo aeróbio de fosfato, a remoção biológica de fósforo envolve a sua incorporação na biomassa como material celular. A remoção líquida de fósforo do sistema se dá por meio do descarte de lodo excedente após a fase aeróbia, quando a biomassa contém um alto nível de polifosfatos (PIJUAN *et. al.*, 2005).

- **Fatores ambientais que influenciam a remoção de fósforo**

Existem vários fatores que podem afetar a eficiência de remoção de fósforo. Esses fatores podem ser divididos em condições ambientais (OD, temperatura e pH), operacionais (idade do lodo, tempo de retenção na zona aeróbia e anaeróbia) e substrato disponível. A seguir a influência de alguns fatores é relatada.

- ✓ **Temperatura:** A temperatura parece não influenciar o processo de remoção biológica de fósforo, de maneira que observa-se sucesso em aplicações dentro de uma vasta faixa de temperaturas. No entanto, há indicações que a taxa de liberação de fósforo seja menor para baixas temperaturas, o que implica em maiores tempos de retenção na zona anaeróbia para que se complete a fermentação (BAETENS *et. al.*, 1999). Baetens (2000) estudando o efeito de diferentes temperaturas (5, 10, 15 e 20 °C) nos processos de remoção biológica de fósforo, verificaram que a estequiometria dos processos anaeróbio-aeróbio era insensível às mudanças de temperatura. No entanto, observaram que o processo cinético aeróbio e anaeróbio-aeróbio era afetado pelas mudanças de temperatura, com maiores taxas de captação de fósforo para temperaturas de 15 e 20 °C, enquanto que todas as outras taxas de conversão anaeróbia e aeróbia eram aumentadas com o aumento da temperatura. Para a temperatura de 5 °C, o consumo de acetato durante a fase anaeróbia foi incompleto, o qual foi direcionado para a fase aeróbia, o que promoveu perda de acúmulo de fósforo. Ao contrário de Baetens (2000), Erdal *et. al.* (2003), analisando o efeito da temperatura no desempenho dos sistemas, observaram que, embora fosse verificado que as taxas cinéticas (consumo de acetato, liberação e acúmulo de fósforo, oxidação de PHA, crescimento) diminuíssem com a queda de temperatura, a remoção biológica de fósforo foi melhorada para a temperatura mais baixa (5 °C). Segundo os autores, isso se deve ao processo de seleção proporcionado pela temperatura, em que temperaturas mais altas (20 °C)

permitiram uma maior diversidade de micro-organismos competindo pelo substrato, reduzindo assim a eficiência do processo. Lopez-vazquez *et al.*, (2009) revela que altas temperaturas favorecem o crescimento de GAO em detrimento ao de PAO. Para a temperatura mais baixa (5 °C) a competição pelo substrato era reduzida, resultando numa população maior de PAO. Com um único grupo dominando o ambiente, foi sugerido que os organismos pudessem usar outros caminhos metabólicos, evidenciando assim, uma maior remoção biológica de fósforo para mais baixas temperaturas.

- ✓ pH: Resultados de estudos sobre o efeito do pH sugerem uma maior eficiência do processo na faixa de pH de 7,5 a 8,0. A atividade dos micro-organismos passa a decair em valores de pH abaixo de 6,5, tornando-se nula em pH de 5,2 (SEDLAK, 1991).
- ✓ Oxigênio disponível: Não existem estudos específicos a respeito de concentrações de OD na zona aeróbia que limitem o processo de remoção de fósforo. O mecanismo de remoção de fósforo sugere que a concentração de OD pode afetar a taxa de remoção, mas não a magnitude de remoção possível, desde que haja suficiente tempo de retenção em condições aeróbias. Estudos mostram que concentrações acima de 2 mg/L são suficientes para garantir a eficiência do processo (SEDLAK, 1991).
- ✓ Tempo de retenção na zona anaeróbia e aeróbia: Na maioria dos casos, o tempo de retenção na zona anaeróbia é arbitrado entre 1 e 2 h, visto que, o fator limitante na definição desse tempo é a eficiência da fermentação, já que a formação de PHA e liberação de ortofosfatos são processos que se desenvolvem rapidamente na presença de ácidos graxos voláteis em quantidades satisfatórias. A zona aeróbia é importante para dar condições para a absorção de fósforo após a sua liberação na zona anaeróbia. Como geralmente a etapa aeróbia é dimensionada para a remoção carbonácea e/ou nitrificação, esse tempo é suficiente para a absorção do fósforo.
- ✓ Substrato disponível no esgoto afluente, produção de ácidos graxos voláteis (AGV) e presença de nitrato: Todos os modelos desenvolvidos para remoção biológica de fósforo mostram a importância da disponibilidade de produtos de fermentação para os organismos acumuladores de polifosfato. Quanto maior a quantidade, principalmente de acetato e propionato na zona anaeróbia, maior

será a remoção de fósforo. É importante que a matéria orgânica no afluente ao sistema de tratamento esteja disponível na forma solúvel (DBO solúvel), de forma a permitir a fermentação. A existência de nitrato na fase anaeróbia implica no processo de desnitrificação por organismos heterotróficos. Essas bactérias competem pelo mesmo substrato com os organismos responsáveis pela remoção de fósforo. Em decorrência, o nitrato tem o efeito de reduzir a relação DBO/P e, conseqüentemente, a eficiência do processo de remoção biológica de fósforo.

Para que o processo EBPR se desenvolva com sucesso, é importante que durante a etapa anaeróbia seja disponibilizada aos micro-organismos uma fonte de substrato orgânico. Sendo assim, a alimentação do reator deve ser direcionada ao tanque anaeróbio, de tal forma que o carbono orgânico presente no esgoto possa ser utilizado pelas PAO. A ação dos PAO sobre a matéria orgânica do esgoto resulta na formação de polihidroxialcanoatos intracelulares (PHA). Simultaneamente, o glicogênio e o polifosfato intracelular são consumidos, levando à liberação do fosfato para o licor misto. Em condições aeróbias ou anóxicas, o fosfato é absorvido e rearmazenado sob a forma de polifosfato intracelular, enquanto que as reservas de glicogênio intracelulares são restauradas e o PHA é oxidado (EPA, 2010).

É válido mencionar que existe outro grupo de bactérias capazes de proliferar em condições anaeróbias-aeróbias alternadas. Trata-se dos organismos acumuladores de glicogênio (GAO). Os GAO também são capazes de absorver AGV anaerobicamente e convertê-los a PHA. A bactéria *Candidatus competibacter phosphatis* é um GAO que tem sido frequentemente encontrado em reatores de bancada alimentados com acetato como única fonte de carbono (ZENG *et al.*, 2003; OEHMEN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2002). Os GAO consomem AGV do efluente sem remover fósforo sendo assim organismos indesejáveis nos EBPR, conseqüentemente a seleção de PAO resultará em um EBPR mais eficiente e seguro (OEHMEN *et al.*, 2005).

3.6 Tecnologias empregadas para remoção combinada de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo.

O sistema convencional de lodos ativados não contempla a remoção de nutrientes, sendo responsável apenas pelo abatimento da carga orgânica e, em algumas situações, de nitrogênio amoniacal via nitrificação. Nesse contexto, vários sistemas

baseados em modificações do tradicional processo de lodos ativados foram desenvolvidos de modo a propiciar a remoção combinada de matéria orgânica e nutrientes. Alguns dos principais estão descritos a seguir.

3.6.1 Sistema Bardenpho (4 e 5 estágios)

Uma combinação de um sistema de pré-desnitrificação e pós-desnitrificação corresponde ao sistema Bardenpho, capaz de remover matéria orgânica e nitrogênio. Esse sistema tem uma eficiência de remoção de nitrogênio elevada, acima de 90%. O nitrito/nitrato é removido no primeiro reator anóxico, e caso não seja removido, ainda há uma segunda chance de ser removido no segundo reator anóxico. A desvantagem deste sistema é a necessidade de reatores com volume final maior (VON SPERLING, 1996). Para atingir a remoção de fósforo, um reator anaeróbio que recebe o afluente e o lodo de retorno é incorporado ao sistema Bardenpho de 4 estágios (Figura 3.3), dando origem ao processo de 5 estágios (Figura 3.4).

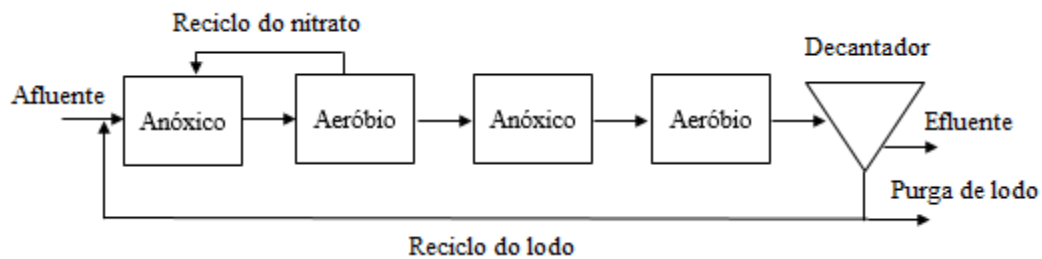


Figura 3.3: Representação esquemática do Sistema Bardenpho de 4 estágios. Fonte adaptada: Metcalf e Eddy (2003)

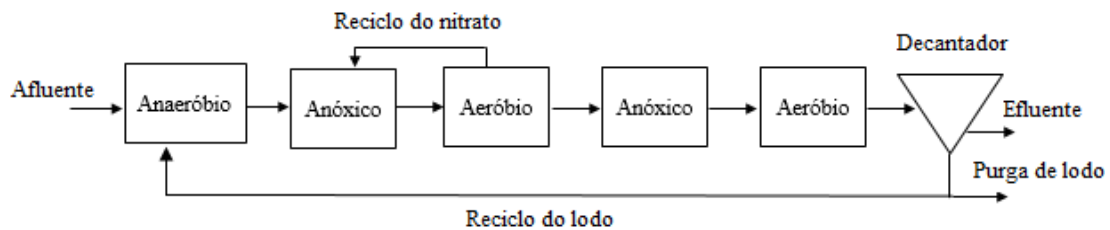


Figura 3.4: Representação esquemática do Sistema Bardenpho de 5 estágios. Fonte adaptada: Metcalf e Eddy (2003)

3.6.2 Sistema UCT (University of Cape Town)

O sistema UCT (Figura 3.5) foi proposto por um grupo de pesquisa da Universidade da Cidade do Cabo, na África do Sul, na tentativa de evitar alguns problemas inerentes ao processo Bardenpho.

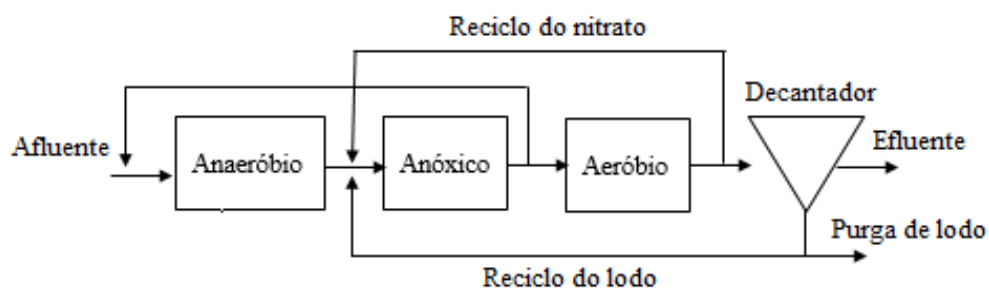


Figura 3.5: Representação esquemática do sistema UCT. Fonte adaptada: Metcalf e Eddy (2003)

No processo UCT, o reciclo de lodo (que pode apresentar nitrato residual) é recirculado para o tanque anóxico e não para o reator anaeróbico, tal como realizado no sistema Bardenpho. Esse procedimento evita a introdução de nitrato na zona anaeróbia, que comprometeria a liberação de fosfato nesse reator. Esse sistema também foi desenvolvido com o intuito de promover, simultaneamente, a remoção de nitrogênio e de fósforo (BASSIN e DEZOTTI, 2008).

3.6.3 Sistema UCT modificado

No sistema UCT modificado (Figura 3.6), a zona anóxica é dividida em duas partes, na qual a primeira parte recebe o lodo de retorno de decantador secundário no intuito de prover a remoção de nitrato, proporcionando a recirculação dessa zona para a zona anaeróbia com ausência desse composto. Já a segunda parte recebe o lodo nitrificado do reator aeróbico. A vantagem desse sistema em relação ao sistema UCT é que o reciclo do nitrato do reator aeróbico não é direcionado ao tanque do qual é oriundo o reciclo que será destinado ao tanque anaeróbico. Desse modo, caso o potencial de desnitrificação do segundo tanque anóxico seja inferior ao potencial de nitrificação do reator aeróbico, nitrato residual será obtido no efluente do primeiro, o que não afetaria o tanque anaeróbico. Esse último recebe apenas o reciclo do primeiro tanque anóxico, que

recebe uma carga de nitrato bem inferior ao segundo reator anóxico e, portanto, consegue minimizar o impacto que o nitrato teria no reator anaeróbio.

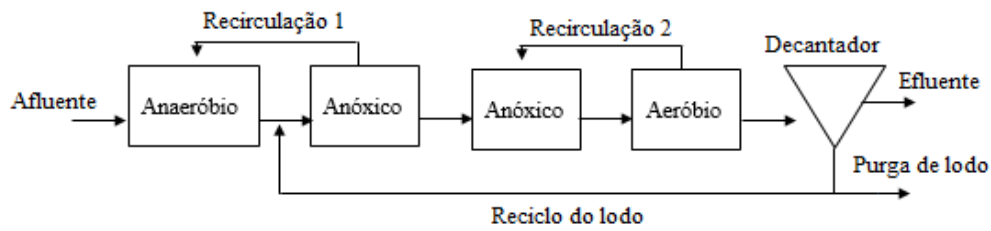


Figura 3.6: Representação esquemática do Sistema UCT modificado. Fonte adaptada: Metcalf e Eddy (2003).

3.6.4 Reatores em Bateladas Sequenciais (RBS)

O reator em bateladas sequenciais (RBS) é um sistema biológico de tratamento de águas residuárias no qual se realiza, sequencialmente, em uma mesma unidade, a oxidação da matéria carbonácea, a remoção de nutrientes e a separação sólido/líquido por meio da sedimentação (SOUSA e FORESTI, 2001).

Originado da terminologia inglesa SBR ou “*Sequencing Batch Reactor*”, o processo incorpora um tanque de volume variável. O volume total (V_T) é composto de duas frações independentes. A primeira, chamada de volume estacionário (V_0), compreende o volume de lodo sedimentado (V_S) e o volume de efluente tratado não retirado, enquanto a segunda fração compreende o volume que é retirado ou enchido a cada ciclo (V_F) (Figura 3.7).

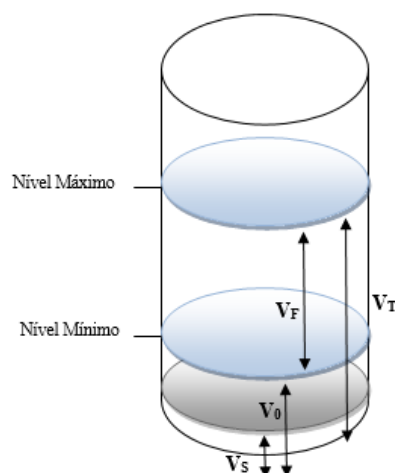


Figura 3.7: Representação esquemática dos volumes característicos de um reator em batelada sequencial.

Os sistemas de reatores em bateladas surgiram nos anos 70, na investigação do uso do processo biológico de bateladas no tratamento de esgotos sanitários (IRVINE e BUSCH, 1979). Na década de 80, essa tecnologia foi difundida e aplicada também ao tratamento de efluentes industriais. O primeiro uso do RBS aconteceu em 1985 no Sudoeste da Ásia, quando NG *et al.* (1989) fizeram suas investigações e verificaram a eficiente aplicação de RBS para tratamento de águas residuárias e industriais (NG, 1993). No Brasil, o processo em batelada sequenciais foi aplicado pela primeira vez pela SABESP para o tratamento de esgoto sanitário da cidade de Paranapuã (1989), obtendo-se excelentes resultados (KAMIYAMA e TSUTIYA, 1992). Em Santa Catarina, tem-se registro de RBS em condomínios residenciais (THANS, 2008).

Como o próprio nome da tecnologia RBS indica, a operação do reator é sequencial, cumprindo um determinado número de ciclos, em cada um dos quais o reator funciona inicialmente como tanque de aeração e, em seguida, como decantador final. A sequência operacional de um reator em bateladas é ilustrada na Figura 3.8.

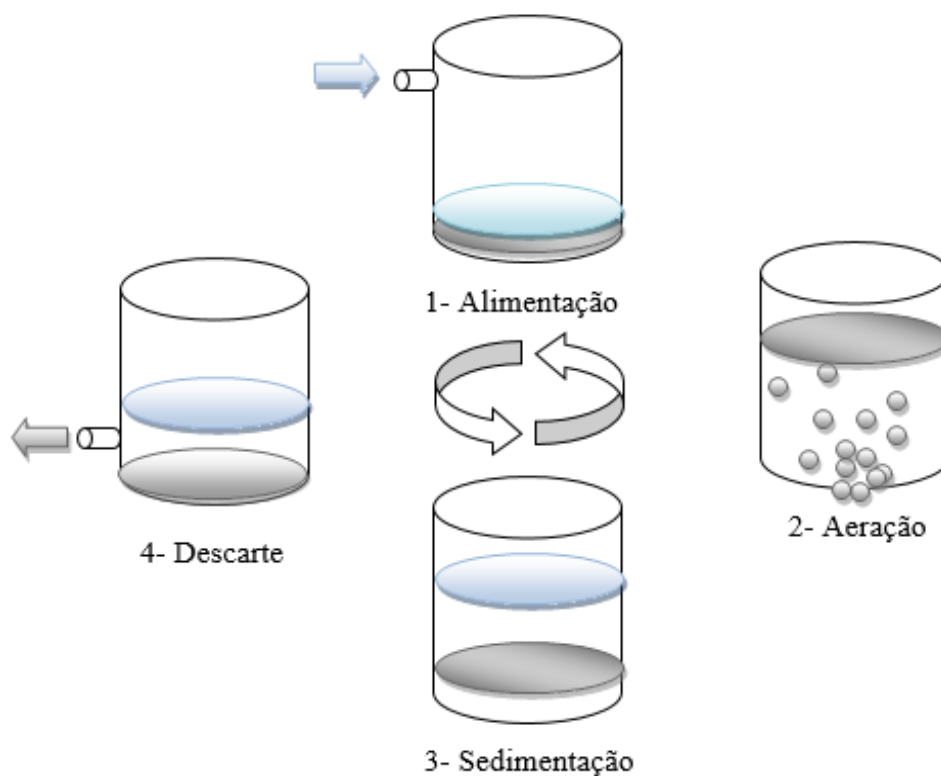


Figura 3.8: Sequência operacional de um reator em bateladas.

As fases distintas são descritas a seguir (SCHROEDER, 1982; EPA, 1993; KETCHUM, 1996):

- ✓ Fase de enchimento: corresponde ao período de alimentação do esgoto a ser tratado no reator. Vários esquemas de enchimento têm sido reportados na literatura (VON SPERLING, 2001). O enchimento pode ser estático, com mistura ou com aeração, dependendo do objetivo do tratamento de esgoto em questão. O enchimento estático envolve a introdução do esgoto sem mistura ou aeração, resultando em economia de energia e concentração de substrato. Isto significa que, para a maior parte do enchimento, nem aeração e nem mistura mecânica devem ser fornecidas. A mistura pode ser iniciada quando o reator estiver com 80% de seu volume, de forma a produzir uma alta taxa de reação biológica que permite às bactérias floculantes superar as espécies filamentosas, prevenindo o "intumescimento" (*bulking*) do lodo (DEORSOLA, 2006). O enchimento com mistura pode resultar em desnitrificação, caso nitratos remanescentes do ciclo operacional anterior estejam presentes no interior do reator. Já em condições estritamente anaeróbias, esse mesmo tipo de enchimento pode propiciar o processo de liberação de ortofosfatos e formação de PHB pelas bactérias removedoras de fósforo. Enchimento com aeração resulta no início imediato dos processos de degradação dos substratos e conseqüente redução do período de aeração. O sistema também pode alternar entre o enchimento estático, enchimento com mistura e enchimento com reação, ao longo do ciclo operacional. O ciclo de enchimento pode ser controlado por boias ou temporizadores. O ciclo de enchimento pode ser controlado por válvulas de boia até um volume pré-estabelecido ou por temporizadores para sistemas com mais de um reator (VON SPERLING, 2001). Os aeradores podem permanecer desligados ou podem estar ligados em determinado período de tempo.
- ✓ Fase de reação: A etapa de reação pode compreender mistura, aeração ou ambos. Inicia-se com o acionamento dos aeradores, que permanecem ligados e ocorre a mistura da massa líquida contida no reator. As bactérias degradam a matéria orgânica efetuando a remoção carbonácea e a nitrificação. Mantém-se uma concentração de sólidos suspensos totais (SST) típica do processo, da ordem de 2000 a 4000 mg/L (JORDÃO e PESSÔA, 2005). A reação somente com mistura resulta em desnitrificação, caso existam nitratos e matéria orgânica no reator. Condições estritamente anaeróbias favorecem a fermentação, com subseqüente formação de PHB e liberação de ortofosfatos para o meio. Na reação aeróbia,

pode ocorrer a degradação da matéria orgânica, nitrificação e absorção de ortofosfatos pelas bactérias acumuladoras de fósforo. Como no caso da etapa de enchimento, de acordo com o objetivo de tratamento do esgoto planejado, podem ser utilizadas estratégias compreendendo a alternância entre reação aeróbia e reação anóxica/anaeróbia.

- ✓ Fase de decantação e sedimentação: Após o período de reação, a mistura e/ou aeração são desligadas, permitindo a separação sólido/líquido, análoga à operação de um decantador secundário em uma ETE convencional. Ocorre com o desligamento dos aeradores, os sólidos em suspensão sedimentam no interior do tanque até uma determinada altura da manta de lodo e a concentração de sólidos totais (ST) no lodo de fundo pode alcançar cerca de 6000 a 8000 mg/L e o nível superior do esgoto permanece estável (JORDÃO e PESSÔA, 2005).
- ✓ Fase de descarte: O efluente tratado (sobrenadante) é drenado do sistema durante essa fase.

3.7 Tecnologia de Granulação Aeróbia (Lodo Granular Aeróbio)

A maioria dos sistemas de tratamento de águas residuárias, tais como o tradicional processo de lodos ativados, requer grandes áreas para a sua implantação, o que se deve principalmente à necessidade de sedimentadores e às baixas concentrações de sólidos nos tanques de aeração. Desvantagens como excesso de produção de biomassa, pequena flexibilidade em relação à flutuação da carga aplicada e capacidade de conversão volumétrica relativamente baixa, repercutem negativamente nas características apresentadas pelos processos tradicionais (DEZOTTI *et al.*, 2011, p. 91).

O incremento substancial do número de habitantes, na maioria dos casos concentrados em áreas urbanas densamente povoadas, aumentou a necessidade de se realizar o aprimoramento de plantas de tratamento de águas residuárias já existentes ou a construção de novos sistemas que sejam compatíveis com a quantidade crescente de produção de águas residuárias pela população. Geralmente a disponibilidade de espaço para essas construções é limitada, fazendo com que essas novas instalações devam ocupar a menor área possível (DEZOTTI *et al.*, 2011, p. 92).

Diante desse contexto, verificou-se a necessidade de desenvolver novos sistemas de tratamento de águas residuárias. Nesse meio termo, a pesquisa relativa ao desenvolvimento de novas formas de aglomeração de biomassa foi intensificada, com o

objetivo de facilitar e melhorar a retenção de biomassa nos processos biológicos de tratamento, fundamental quando se deseja reduzir o volume de unidades de tratamento. Foi nesse período de avanços que foram desenvolvidos os grânulos aeróbios.

Os reatores granulares surgiram no final dos anos 90 com a finalidade de desenvolver sistemas mais eficientes do que os de tratamentos convencionais por lodos ativados, no que diz respeito à remoção biológica de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo (DE KREUK *et al.*, 2004a). Comparando-se o floco biológico formado em um reator de lodos ativados com os grânulos aeróbios, as vantagens são que os grânulos formam estruturas mais compactas e mais fortes (ETTERER e WILDERER, 2001). Os reatores com grânulos aeróbios têm boa eficiência de remoção, alta capacidade de retenção de biomassa e são capazes de suportar altas cargas orgânicas (MORGENROTH *et al.* 1997).

Podendo representar a solução para a operação de alguns reatores nos quais está presente lodo floculento com más características de sedimentabilidade, a tecnologia de granulação aeróbia ainda apresenta uma economia de investimento inicial, uma vez que não requer o uso de material suporte. Além disso, a variação gradativa de oxigênio e a presença de uma quantidade de micro-organismos no interior dos grânulos aeróbios viabilizam a remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, simultaneamente (DEZOTTI *et al.*, 2011, p. 93). Nesse contexto, a granulação aeróbia vem sendo alvo de pesquisas.

As primeiras pesquisas da biomassa granular aeróbia se basearam na aplicação do conceito de auto-agregação da biomassa aeróbia usando o processo denominado biomassa granular em sistemas aeróbios, designado como “*Aerobic Upflow Sludge Blanket*” (AUSB) (MISHIMA e NAKAMURA 1991). Nesses estudos, oxigênio puro foi empregado para prover a aeração. Posteriormente, foram realizadas pesquisas focadas no estudo do crescimento e operação de biomassa na forma de grânulos em condições aeróbias. Nessas investigações foram empregados os reatores em batelada sequencial (RBS) (MORGENROTH *et al.* 1997; BEUN *et al.* 1999; DANGCONG *et al.* 1999).

Grânulos microbianos são agregados bem compactos, com muitos micro-organismos por grama de biomassa (LIU e TAY, 2002. YANG *et al.*, 2004). Podem ainda ser considerados “miniecossistemas”, dotados de populações microbianas mistas,

as quais podem ser manipuladas por meio da aplicação de condições operacionais específicas de modo a selecionar os organismos desejados (DE KEUK *et al.*, 2005).

Os grânulos apresentam forma esférica, cujo diâmetro pode variar de 0,2 a 6,0 mm. Esses aglomerados microbianos caracterizam-se por possuir densidades muito superiores em comparação com aquelas apresentadas pelo lodo ativado convencional, o que os tornam detentores de inúmeras características interessantes (BASSIN, 2011c).

Entre algumas das principais características dos grânulos aeróbios destacam-se (BASSIN, 2011a):

- ✓ Excelente sedimentabilidade, facilitando a separação do efluente tratado do lodo granular;
- ✓ Propiciam grande retenção de biomassa no reator, aumentando a capacidade volumétrica de tratamento;
- ✓ Estrutura densa e forte;
- ✓ No interior há presença de zonas aeróbias e anóxicas, o que permite que diferentes processos biológicos (remoção de matéria orgânica, nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo) sejam realizados no mesmo sistema;
- ✓ Capacidade de suportar altas velocidades;
- ✓ Menos vulneráveis à toxicidade de compostos químicos e metais pesados em comparação com o lodo ativado;
- ✓ Não necessita de material de suporte;
- ✓ Reduz os custos de operação de uma planta de tratamento em pelo menos 20% e diminuição do espaço requerido em 75%.

Esses sistemas são capazes de reter grande quantidade de micro-organismos no seu interior, permitindo dessa maneira a rápida metabolização dos poluentes, e, por sua vez, proporciona melhorias no desempenho e estabilidade do reator.

Geralmente os grânulos são cultivados em reatores batelada sequenciais (BBS), visto que sua operação é realizada em ciclos temporais. Nos RBS destinados ao cultivo de grânulos aeróbios, os tempos de ciclo são de poucas horas (3 - 6 h). No início de cada ciclo, uma quantidade de água residuária é adicionada no reator e logo em seguida é iniciada a fase de reação, seja aeróbia, anóxica ou anaeróbia, na qual ocorrem as conversões. O final de cada ciclo é caracterizado pela sedimentação rápida dos grânulos, pois somente as partículas que possuem certo tamanho e densidade (ou seja,

sedimentam rapidamente) são retidas no reator. Em contrapartida, partículas com velocidade sedimentação menores são arrastadas do sistema, permitindo somente o desenvolvimento de grânulos aeróbios (LIU e TAY, 2002).

A etapa física de sedimentação é responsável por selecionar a biomassa, visto que o tempo destinado a sedimentação apresenta grande influência na granulação aeróbia. Os grânulos mais densos são obtidos quando se utiliza pequenos tempos de sedimentação (BEUN *et al.*, 1999).

Um parâmetro que pode ser variado para controlar a etapa de sedimentação é a velocidade de sedimentação mínima (V_{\min}), que pode ser obtida dividindo-se a altura de sedimentação pelo tempo de sedimentação, que por sua vez é fixado e conforme desejado. Na maioria dos casos, os grânulos apresentam altas velocidades de sedimentação, de modo que o período de sedimentação nos RBS é bastante curto, permitindo maior tempo para os processos de degradação dos poluentes.

Um fato a ser destacado está relacionado ao tamanho dos grânulos, pois nesse caso o cultivo de grânulos maiores é favorável para o processo. Entretanto, deve-se levar em consideração os efeitos difusivos que podem estar presentes dependendo do diâmetro apresentado pelo grânulo. Quando se pretende, por exemplo, criar condições anóxicas no interior dos grânulos para permitir a desnitrificação, grânulos maiores tendem a ser os mais indicados. A difusão de oxigênio para o interior do grânulo se torna limitada, especialmente se tiverem presentes populações microbianas que causem uma diminuição da concentração de oxigênio dissolvido ao longo da estrutura granular (BASSIN, 2011a).

Os próximos tópicos irão detalhar o processo de formação dos grânulos aeróbios, os fatores que afetam a granulação aeróbia e algumas aplicações dessa tecnologia no tratamento de águas residuárias.

3.7.1 Processo de Formação dos Grânulos Aeróbios

Segundo Lui e Tay (2004), a biogranulação envolve interações entre células, contemplando fenômenos biológicos, físicos e químicos, os quais estão relacionados com a formação de associações multicelulares bastante estáveis. Segundo esses autores, o processo de granulação aeróbia pode ser descrito pelas seguintes etapas:

- ✓ Contato entre micro-organismos para formar agregados por forças hidrodinâmicas, difusivas, gravitacionais e/ou termodinâmicas;

- ✓ Estabilização dos contatos multicelulares resultantes das forças de atração inicial, as quais compreendem forças físicas (van der Waals, atração de carga oposta, forças termodinâmicas, tensão superficial, hidrofobicidade), forças químicas (emparelhamento iônico, ligação interpartículas) ou ainda forças bioquímicas (fusão de membrana celular, atração de receptor celular, desidratação da superfície celular);
- ✓ Maturação de agregação celular por meio da produção de polímeros extracelulares, crescimento de grupamentos celulares e mudanças metabólicas, facilitando a interação entre células e resultando em uma estrutura microbiana organizada;
- ✓ Formação e estabilização de estrutura tridimensional do agregado microbiano no estudo estacionário por meio de forças de cisalhamento hidrodinâmicas.

Uma visão detalhada da arquitetura e composição dos grânulos foi conseguida por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia óptica e microscopia confocal de varredura a laser, em estudo realizado por Weber *et al.* (2007). As observações microscópicas revelaram que os grânulos eram compostos de bactérias, substâncias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polymeric Substances* - EPS), protozoários e, em alguns casos, de fungos. Esses autores dividiram o desenvolvimento do lodo granular, a partir de lodo ativado até a obtenção de grânulos maduros, em três fases, levando em consideração o papel desempenhado por protozoários ciliados. Durante a primeira fase, protozoários ciliados contendo talo da subclasse *Peritrichia* estabeleceram-se em grande quantidade nos flocos de lodo ativado, formando novos talos. Em seguida, esses protozoários começaram a proliferar e formaram grandes colônias, enquanto ao mesmo tempo, seus talos foram colonizados por bactérias. A colonização foi intensificada pelo movimento de seus cílios, os quais propiciaram fluxo contínuo de nutrientes em direção às células bacterianas formadoras de biofilme.

Foi observado um grande crescimento de ciliados durante a segunda fase. Ao mesmo tempo que eram formados flocos volumosos, ocorreu a formação de uma zona central que consistiu de restos de talos de ciliados e bactérias responsáveis pela produção de EPS. Esses talos de ciliados serviam como suporte para o desenvolvimento dos grânulos (WEBER *et al.*, 2007).

Na terceira fase da granulação, os ciliados foram igualmente colonizados por células bacterianas e ficaram embutidos no biofilme em expansão. Algumas células de

ciliados livre-nadantes sem talos surgiram e deixaram o biofilme. Nessa fase, os grânulos bacterianos compactos foram formados, pouco a pouco, pelos ciliados livres que conseguiram sobreviver. Em relação aos fungos, seu papel no processo de granulação esteve relacionado ao fato de que os seus cílios, funcionaram como suporte para que as bactérias pudessem crescer, aumentando a área disponível para a colonização bacteriana (WEBER *et al.*, 2007).

Conforme descrito por Beun *et al.* (1999), inicialmente se formam no reator agregados com micélios devido aos fungos que dominam o sistema nas fases iniciais de operação. As bactérias individuais não são retidas no reator, devido ao requerimento de elevadas velocidades de sedimentação (Figura 3.9). Esses micélios têm boas propriedades de sedimentação, ficando facilmente retidos no reator. Portanto, durante o período da partida, a biomassa presente no reator consiste principalmente desses agregados filamentosos formados por fungos (BEUN *et al.*, 1999). Devido às forças de estresse aplicadas no reator, esses agregados vão se compactando pouco a pouco, até alcançar um diâmetro de 5 - 6 mm, momento no qual se rompem, provavelmente devido a limitações de oxigênio no seu interior.

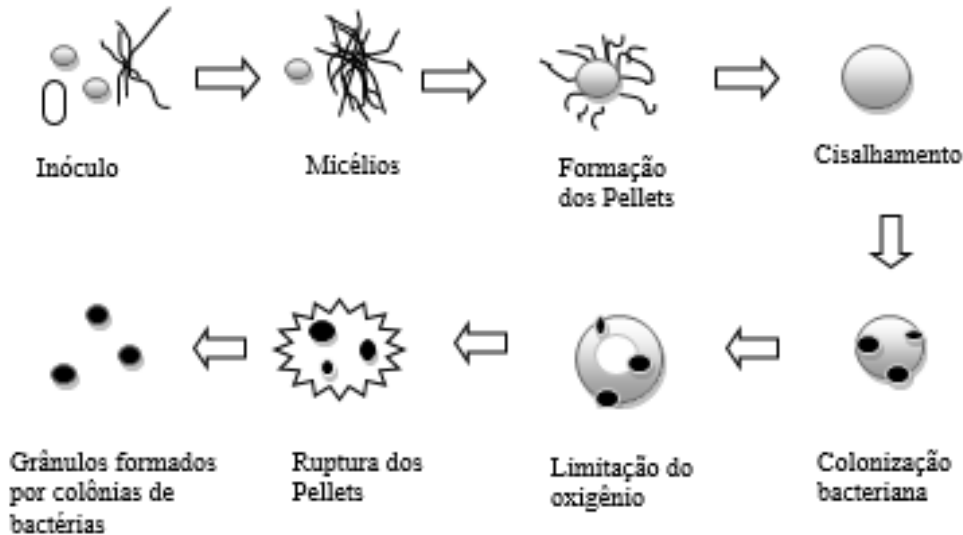


Figura 3.9: Mecanismo de formação dos grânulos (adaptado de BEUN *et al.*, 1999).

O papel desempenhado por fungos pode ou não ser observado no processo de formação de grânulos. Cada caso específico deve ser avaliado de maneira individual, uma vez que existem outros fatores determinantes para o mecanismo da granulação (como por exemplo, o inóculo usado) (BASSIN, 2011b).

Os principais parâmetros reportados na literatura que afetam a formação e as propriedades dos grânulos aeróbios são: composição do substrato, carga orgânica aplicada, alternância de concentração de substrato, duração do ciclo, forças de cisalhamento hidrodinâmico, tempo de sedimentação, tempo de retenção hidráulica e configuração do reator.

3.7.2 Fatores que afetam a granulação aeróbia

Pesquisas realizadas durante os últimos anos observaram a formação de biomassa granular empregando uma grande variedade de substratos como: glicose, acetato, etanol, peptona, fécula e fenol em águas sintéticas e também águas residuárias urbanas (ARROJO *et al.* 2004; BEUN *et al.* 1999; MORGENROTH *et al.* 1997; DANGCONG *et al.* 1999; SCHWARZENBECK *et al.* 2004a; SUN *et al.* 2006; TAY *et al.* 2002). Nesses estudos observou-se a influência do tipo de substrato empregado em relação com a estrutura e forma dos grânulos.

Para Tay *et al.* (2001), as características do substrato não afetam diretamente a formação dos grânulos, mas têm um profundo impacto na estrutura física e na diversidade das espécies presentes nos mesmos. Como exemplo, pode-se citar os estudos de Tay *et al.* (2001) e Wang *et al.* (2004), os quais observaram que os grânulos cultivados com glicose apresentaram uma superfície filamentosa, enquanto que os grânulos cultivados com acetato apresentaram uma estrutura mais compacta e maior diâmetro.

A densidade do biofilme formado depende da velocidade de crescimento dos micro-organismos presentes na estrutura do grânulo. Quanto mais alta for a velocidade de crescimento, menos densos serão os agregados formados (VILLASEÑOR *et al.* 2000; MOSQUERA-CORRAL *et al.* 2003; DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004). Na operação com grânulos aeróbios se observou que os substratos com maior presença de carboidratos favorecem o crescimento descontrolado de bactérias filamentosas (SCHWARZENBECK e WILDERER 2005; WANG *et al.* 2005), enquanto os grânulos formados com uma alimentação de acetato apresentam uma estrutura mais compacta sem a presença de bactérias filamentosas.

Segundo Ni e Yu (2008), os micro-organismos dos grânulos aeróbios têm a capacidade de utilizar a matéria orgânica da água residuária e armazená-la rapidamente como material de reserva no interior das células, para que possa consumi-la,

posteriormente, durante a fase na qual o substrato esteja ausente (fase de fome). Essa situação de abundância e escassez de substrato é bastante comum de ocorrer durante o ciclo operacional dos RBS.

Durante a fase de aeração (fase de reação), em um reator com alimentação na forma de pulso (alimentação instantânea), se distinguem dois períodos distintos: um no qual há substrato presente e outro com ausência de substrato. Dependendo da duração de cada fase, pode-se obter diferentes tipos de aglomerações microbianas (Figura 3.10 e Figura 3.11). Quando a fase de saciedade é curta (Figura 3.10), seguida de um longo período sem substrato, Morales (2009) observou a formação de grânulos bem formados, sem a presença de bactérias filamentosas. Em contrapartida, quando a fase de fome é prolongada, grânulos instáveis repletos de filamentos foram observados (MORALES, 2009).

Acúmulo de compostos no interior da célula (como exemplo, polihidroxitiratos) durante a fase em que a matéria orgânica está disponível foram estudados por Beun *et al.* (2002). Nas condições de operação de um reator em batelada sequencial, alguns micro-organismos heterotróficos são capazes de armazenar os substratos no interior das células, geralmente na forma de glicogênio, lipídios e polihidroxicarbonos (PHA). O polihidroxitirato (PHB) é o polímero de armazenamento predominante formado (BEUN *et al.*, 2002). Esse substrato armazenado intracelularmente é utilizado pelas bactérias como fonte de carbono durante o período de ausência de substrato externo.

Granulação com biomassa nitrificante empregando uma fonte de carbono inorgânica também foi reportada por Belmonte *et al.* 2009 e Tsuneda *et al.* 2003. A biomassa nitrificante se caracteriza por sua baixa velocidade de crescimento e baixa taxa de atividade. A melhora na retenção da biomassa mediante a granulação se traduz em um aumento da concentração de organismos nitrificantes no reator, acarretando em significativa melhora no processo de nitrificação.

A carga orgânica é um importante parâmetro operacional que pode afetar o processo de granulação por meio da seleção e enriquecimento de diferentes espécies de bactérias e influenciar o tamanho, a sedimentação e a atividade microbiana dos grânulos (TAY *et al.*, 2004; TAY e YAN, 1996).

Os grânulos aeróbios podem ser formados em uma ampla faixa de carga orgânica (entre 2,5 a 15 kgDQO/m³/d) (LIU *et al.*, 2005). Entretanto, Tay *et al.* (2004)

demonstraram que é difícil formar grânulos quando a carga orgânica é menor do que $2,0 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Segundo De Kreuk (2006), a utilização de cargas relativamente elevadas facilita o processo de granulação.

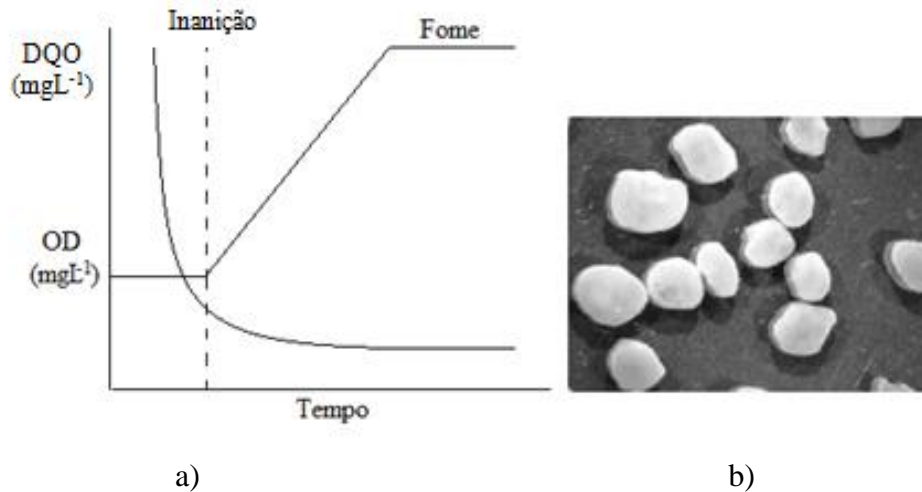


Figura 3.10: a) Representação da concentração de substrato (DQO) e oxigênio dissolvido (OD) durante a operação de um RBS granular, mostrando as fases com presença e ausência de substrato. b) Grânulos aeróbios formados com um curto período de presença de substrato. Fonte: Adaptado de Morales (2009).

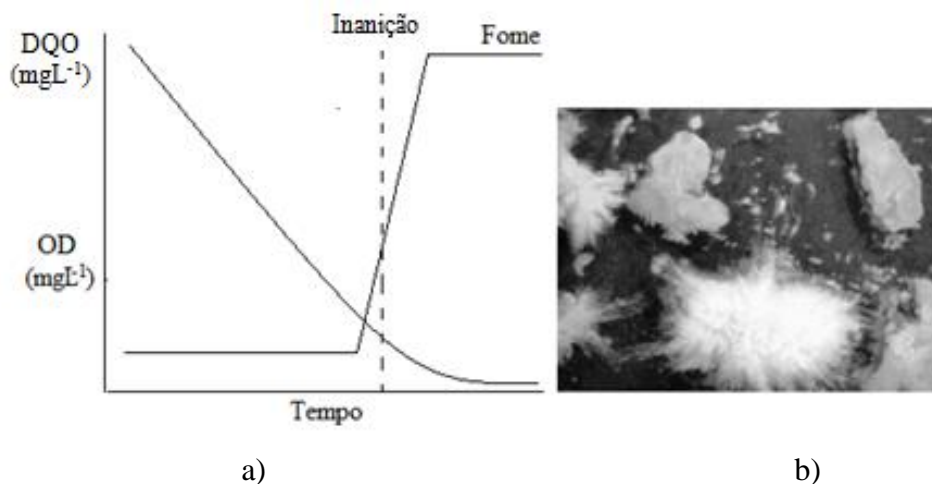


Figura 3.11: a) Representação da concentração de substrato (DQO) e oxigênio dissolvido (OD) durante a operação do RBS, mostrando as fases com presença e ausência de substrato. b) Grânulos aeróbios formados com um longo período de presença de substrato. Fonte: Adaptado de Morales (2009).

No caso dos RBS, a carga orgânica depende tanto da concentração de substrato afluente como da carga hidráulica, sendo esta última governada pelo percentual de troca volumétrica (volume de enchimento/volume do reator) e pela duração do ciclo. Assim,

se um esgoto com baixa concentração de matéria orgânica é usado como substrato e uma carga hidráulica usual é empregada, a carga orgânica resultante não será suficientemente elevada para o processo de granulação. Por outro lado, um aumento da carga orgânica devido ao aumento da carga hidráulica irá compensar a baixa concentração do substrato, favorecendo o processo de granulação. Desta forma, para manter uma carga orgânica adequada para a formação dos grânulos quando o sistema for alimentado com afluente de baixa concentração, como no caso do esgoto doméstico, é necessário ter uma carga hidráulica elevada. Isso pode ser alcançado aplicando-se elevados percentuais de troca volumétrica (entre 50 e 75%) e ciclos de curta duração (em torno de 3 h) (NI *et al.*, 2009). Contudo, Tay *et al.* (2004) e Liu *et al.* (2007c), reportaram que cargas muito elevadas (acima de $8 \text{ kgDQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$) causaram a desintegração dos grânulos. De acordo com Tay *et al.* (2004), o tamanho dos grânulos geralmente aumenta com o aumento da carga aplicada, o que pode levar a uma diminuição na densidade e a um aumento da porosidade dos grânulos, provocando a instabilidade do sistema. Para Zheng *et al.* (2006), a possibilidade de ocorrer instabilidade dos grânulos aumenta com o aumento da carga orgânica.

A forma pela qual a alimentação é estabelecida no reator é uma condição muito importante para alcançar a granulação aeróbia. Assim, a alimentação deve ser realizada em um tempo curto, a fim de permitir a existência da fase de degradação. Ela ocorre no início do período de aeração, devido à máxima concentração de substrato que se estabelece no reator após a alimentação. O substrato é então consumido até um valor mínimo, onde o mesmo não se encontra mais disponível no meio (FIGUEROA *et al.*, 2009; TAY *et al.*, 2001; KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004). Deste modo, os micro-organismos são sujeitos a períodos de alternância de concentração de substrato. Segundo Tay *et al.* (2001), sob condições de baixa concentração de substrato, as bactérias se tornam mais hidrofóbicas, o que facilita a agregação e adesão microbiana.

A duração do ciclo representa a frequência com que o conteúdo do reator é retirado do mesmo por meio da fase de retirada do efluente tratado, e está relacionada com o tempo de retenção hidráulica (TRH) (WANG e LIU, 2008). Wang *et al.* (2005), estudando o efeito da duração do ciclo nas características dos grânulos aeróbios, constataram que ciclos de 3 h de duração conduzem a um processo de granulação mais rápido, enquanto que, em ciclos de 12 h, a formação dos grânulos é mais lenta. De acordo com esses autores, em ciclos de 3 h, os micro-organismos estão frequentemente

sujeitos à fase de degradação, na qual as bactérias sintetizam novas células em uma alta velocidade de crescimento. Nesse caso, há um rápido aumento da biomassa, resultando em grânulos com maiores diâmetros. Por outro lado, em ciclos de 12 h, os microorganismos passam por longos períodos de falta de alimento, nos quais a velocidade de crescimento específico é lenta, o que, por sua vez, resulta em grânulos com diâmetros pequenos.

A hidrodinâmica é um fator crucial nos sistemas de grânulos aeróbios, uma vez que favorece a transferência de massa e as propriedades físicas da biomassa. Dessa forma, a estrutura dos grânulos é fortemente influenciada pela força de cisalhamento hidrodinâmico presente no reator (FIGUEROA *et al.*, 2009). Essa força de cisalhamento é geralmente descrita em termos de velocidade superficial ascensional do ar, isto é, a taxa de aeração aplicada sobre a área superficial do reator. Elevadas forças de cisalhamento favorecem a formação de grânulos mais fortes, compactos, densos e arredondados (TAY *et al.*, 2004), além de fornecer ao sistema oxigênio suficiente para conter o crescimento filamentosos (ADAV *et al.*, 2008). De acordo com Tay *et al.* (2001), isso acontece pelo fato de que a força de cisalhamento hidrodinâmico favorece a produção de substâncias poliméricas extracelulares, as quais, segundo Figueroa *et al.*, (2009), são mediadores da coesão e adesão das células, tendo um importante papel na manutenção da integridade estrutural das mesmas. Outra função importante das forças de cisalhamento é prover um balanço entre o desprendimento e o crescimento da biomassa, a fim de manter a estabilidade dos grânulos (LIU e TAY, 2006).

O tempo de sedimentação é um importante parâmetro operacional, pois desempenha um papel fundamental na seleção da comunidade microbológica (LIU e TAY, 2004). Essa seleção tem sido identificada como o principal mecanismo que favorece a formação e o acúmulo de grânulos no reator (HUBNER, 2008). De acordo com Qin e Liu (2008), os grânulos aeróbios podem ser cultivados com sucesso e se tornarem dominantes somente se o reator for operado com curtos tempos de sedimentação. Esta é uma estratégia eficiente para limitar a presença de organismos formadores de flocos, uma vez que os grânulos, por serem mais densos, requerem um menor tempo de sedimentação do que os flocos (FIGUEROA *et al.*, 2009). Assim, ocorrerá uma seleção entre a biomassa que apresenta boa sedimentabilidade (grânulos) e a biomassa que sedimenta mal (filamentos e flocos) (BEUN *et al.*, 2002). As partículas que sedimentam rápido ficarão retidas no reator, e as que não sedimentam

suficientemente rápido, serão arrastadas do reator, saindo com o efluente (FIGUEROA *et al.*, 2009; LIU e TAY, 2004). As partículas com boa sedimentabilidade retidas no RBS vão assegurar uma granulação rápida e eficiente. A maioria dos estudos adota tempos de sedimentação na faixa de 2 a 20 min (QIN e LIU, 2008). Contudo, Qin *et al.* (2004) consideram que os grânulos aeróbios só podem se formar quando o tempo de sedimentação for menor ou igual a 15 min. Segundo Ni *et al.* (2008), empregando-se tempos de sedimentação longos, os flocos que não sedimentam bem podem não ser removidos de forma eficaz, podendo, por sua vez, competir com os flocos formadores de grânulos pelos nutrientes disponíveis. Como resultado, a granulação aeróbia não pode ser alcançada em um RBS operado com elevados tempos de sedimentação.

A combinação de um curto tempo de sedimentação e de uma curta duração de ciclo gera uma forte pressão de seleção hidráulica, facilitando o processo de formação dos grânulos aeróbios. Ademais, o tempo de sedimentação é o parâmetro mais importante para manter a estabilidade do lodo granular (LIU *et al.*, 2010).

Na maioria dos estudos relatados, a formação dos grânulos ocorreu em RBS do tipo coluna de bolhas com fluxo de ar ascendente. Segundo Liu e Tay (2004), nesse tipo de reator, a ascensão do ar ou do líquido na coluna cria um fluxo circular relativamente homogêneo e vórtices localizados ao longo do eixo do reator. Desta forma, os agregados estão sujeitos a um constante atrito hidráulico, forçando-os a se adaptarem à forma granular, que apresenta mínima energia livre de superfície. Esses autores afirmam ainda que para assegurar essa trajetória de fluxo e promover um atrito hidráulico eficaz, devem-se utilizar reatores que apresentam uma alta razão entre altura e diâmetro (razão A/D). A utilização de reatores com uma alta razão A/D gera uma redução da área superficial ocupada pelo reator e favorece a seleção dos grânulos por meio da diferença na velocidade de sedimentação, como exposto anteriormente.

3.7.3 Estudos específicos acerca da formação e estabilidade dos grânulos aeróbios

Recentemente, vários grupos mostraram a formação do lodo granular aeróbio. Como citado anteriormente, as principais características dessa tecnologia é a excelente sedimentação e a construção de plantas de tratamento que privilegiem instalações compactas. Na maioria das vezes, os estudos mostraram a necessidade de altas concentrações de oxigênio para obtenção de granulação estável. No entanto, para

assegurar boas eficiências de desnitrificação, baixas concentrações de oxigênio são requeridas (ZHANG *et al.*, 2015).

A baixa estabilidade dos grânulos aeróbios, em muitos casos, é o que limita sua utilização na prática. Para melhorar a estabilidade dos grânulos, a seleção de bactérias de crescimento lento, tais como bactérias nitrificantes e removedoras de fósforo tem sido proposta (LIU *et al.*, 2004). No entanto, este método está intimamente relacionado com as características do efluente, que deve conter altas concentrações de nitrogênio e fósforo para que haja o crescimento em larga escala destas bactérias de crescimento lento. O uso de agentes quelantes sintéticos, como o ácido nitrilotriacético – NTA aumenta a granulação microbiana aeróbia. A presença de compostos de degradação lenta torna o crescimento bacteriano mais lento. Então, uma fonte de carbono relativamente difícil de degradar (agente quelante), poderia promover uma melhor granulação do lodo aeróbio devido a seleção de bactérias de crescimento lento, resultando na formação de grânulos estáveis (YARLAGADDA *et al.*, 2008). A estabilidade dos grânulos aeróbios também determina a viabilidade de utilização destes sistemas a longo prazo (LIU *et al.*, 2004). Mc Swain *et al.* (2005) mostraram que algumas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) possuem um importante papel na estabilidade dos grânulos aeróbios. Devido a uma série de condições estressantes de inoculação, a produção e distribuição dos EPS nos grânulos aeróbios são bastante diferentes dos flocos biológicos convencionais (Mc SWAIN *et al.*, 2005).

A partir de pesquisas anteriores sobre a morfologia do biofilme, ficou evidenciado que os organismos de crescimento lento influenciam positivamente na densidade dos grânulos (KREUK E VAN LOOSDRECHT, 2004).

De Kreuk e van Loosdrecht (2004) observaram que para diminuir a taxa de crescimento dos organismos que utilizam substratos facilmente degradáveis (por exemplo, acetato), esses devem ser lentamente convertidos em polímeros de armazenamento (por exemplo, PHA). Bactérias removedoras de fosfato executam esta conversão de forma mais eficiente. O trabalho mostrou que a seleção dessas bactérias de fato levou à uma biomassa granular estável, mesmo em baixas concentrações de oxigênio.

Zheng *et al.* (2006) observaram que grânulos maduros cresceram continuamente e perderam gradualmente a estabilidade devido ao crescimento de filamentos. Ficou evidenciado que a perda de estabilidade também esteve relacionada ao fato dos grânulos

terem atingido grande porte. De Kreuk *et al.* (2005b) relatou que a respiração endógena tende a desestabilizar a o interior dos grânulos grandes, resultando no colapso e formação de pequenos fragmentos.

ADAV *et al.* (2008) evidenciaram que os esforços excessivos dos grânulos implicariam na perda da capacidade de auto-agregação e na produtividade de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Li *et al.* (2006) indicaram que a produção de EPS deve ser controlada a um valor razoável para manter a estrutura dos grânulos aeróbios, e longos períodos sem substrato foram desfavoráveis à manutenção da estabilidade a longo prazo dos grânulos aeróbios. ADAV *et al.* (2008) comentou que a desintegração dos grânulos é causada hidrólise do β -polissacarídeos.

Lemaire *et al.* (2008) observaram que o entupimento dos poros e canais dos grânulos dificultam o transporte de nutrientes para os micro-organismos que colonizam o seu interior, levando os grânulos a se desintegrarem.

Wang *et al.* (2008) observaram a quebra do grânulo quando o modo de operação é alterado de SBR (Reator em batelada sequencial) para MBR (biorreatores com membrana), mudança essa que acarretou na alteração da tensão de cisalhamento.

O diâmetro dos grânulos influencia significativamente a estabilidade dos grânulos aeróbios (LI *et al.*, 2011). Em comparação com pequenos grânulos, a transferência de massa por difusão em grânulos maiores é limitada, o que estimula a formação de grandes núcleos anaeróbios e consequentemente aumenta a atividade de micro-organismos anaeróbios. A atividade celular interna passa a utilizar o EPS para sobreviver, o que pode enfraquecer a estrutura granular (WANG *et al.*, 2005).

O gás gerado por meio de processos biológicos dentro do grânulo pode promover a sua desintegração (TAY *et al.*, 2002). Além disso, a ruptura e desgaste do grânulo limitam o crescimento. Portanto, grânulos de grande dimensão podem ter sua estabilidade ameaçada a longo prazo (ZHENG *et al.* 2006; ZHANG e ZHANG, 2013); TOH *et al.*, 2013). Além disso, o diâmetro influencia no desempenho do sistema no que se refere à remoção dos poluentes, uma vez que propicia o estabelecimento de diferentes regiões (aeróbias e/ou anóxicas/anaeróbias). Assim, mantendo-se o diâmetro dos grânulos em baixos valores é uma estratégia desejada para manter a estabilidade e o desempenho de tratamento dos grânulos aeróbios (LOCHMATTER *et al.*, 2013 e ZHANG *et al.*, 2011).

Zhang *et al.* (2015) também observaram que o diâmetro é o fator chave que influencia na estabilidade dos grânulos. No estudo realizado por esses autores, foi utilizado um efluente de baixa concentração de matéria orgânica (DQO, 200 ± 40 mg/L), baixa tensão de cisalhamento hidrodinâmico (velocidade superficial do gás de 0,55 cm/s e agitação de 180 rpm), diferentes modos de descarte de efluente, em RBS, com alternância de fases anaeróbio/aeróbio/anóxico. Esse processo operacional foi utilizado para limitar o diâmetro dos grânulos aeróbios. O processo de granulação foi concluído após 40 dias. Os grânulos maturados com pequeno diâmetro (DP = 0,9 mm) mantiveram-se estáveis, sem desagregação durante o período do experimento (220 dias).

Embora muitos estudos tenham focado na formação de lodo granular em diferentes condições operacionais, existem alguns pontos a serem discutidos com relação ao papel do inóculo na formação do grânulo e sua estabilidade durante o processo de granulação. Portanto, faz-se necessário um estudo mais aprofundado com relação a comunidade microbiana responsável pela formação de grânulos estáveis e consequentemente a sua importância na remoção simultânea de nutrientes.

3.7.4 Remoção de matéria carbonácea e nutrientes em reatores de lodo granular: mecanismo e aplicação

Devido ao seu tamanho, no interior dos grânulos aeróbios existe um gradiente de oxigênio dissolvido (OD) que propicia zonas com diferentes condições de oxirredução (redox). A zona mais externa é mantida em condições aeróbias, seguida por uma zona anóxica e uma zona anaeróbia (Figura 3.12). Esta configuração ocasionada pela difusão do oxigênio permite o crescimento de diferentes bactérias nessas zonas, o que corrobora para a ocorrência da remoção combinada de matéria orgânica carbonácea, nitrogênio e fósforo.

Os micro-organismos que realizam a oxidação da matéria orgânica localizam-se na parte mais externa dos grânulos. Na camada mais profunda, mas ainda aeróbia, se encontram as bactérias nitrificantes e no interior dos grânulos, onde não há a penetração do oxigênio ou a concentração desse é muito baixa, estariam as bactérias desnitrificantes. A distribuição da biomassa autotrófica é influenciada pela concentração de OD dentro do reator, sendo que a localização da biomassa influencia na remoção de nitrogênio. Para que ocorra o processo de desnitrificação, é necessária a ausência de oxigênio, presença de NO_3^- e a disponibilidade de matéria orgânica (DQO). A ausência

de oxigênio é obtida diminuindo-se a concentração de OD no reator a um nível em que seja permitida a ocorrência da nitrificação nas camadas mais externas dos grânulos. Desta forma, o OD é consumido pelo processo de nitrificação nessa região mais superficial, permitindo que a desnitrificação ocorra na região central dos mesmos. Já a disponibilidade de matéria orgânica é alcançada por meio da alimentação descontínua do reator (BEUN *et al.*, 2001).

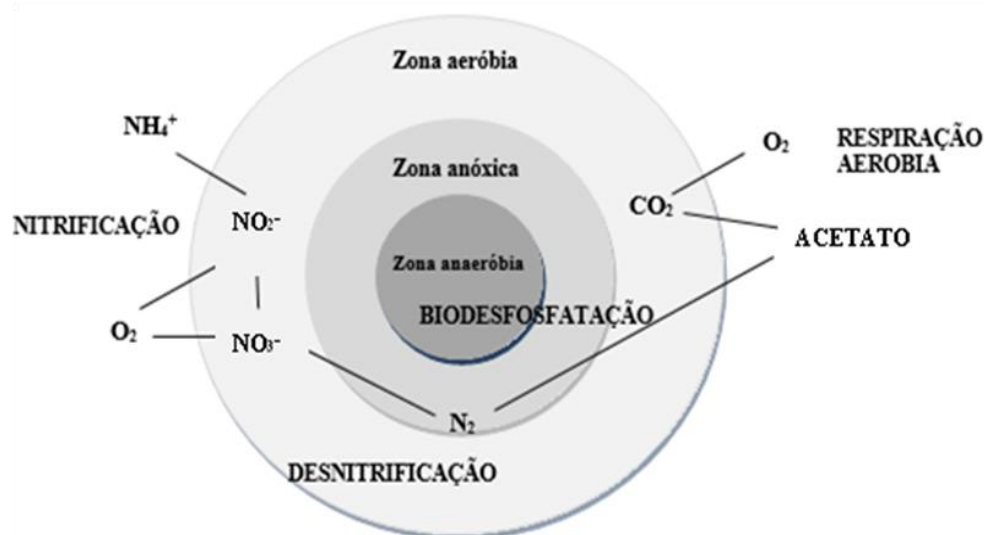


Figura 3.12: Combinação de processos no interior dos grânulos. Fonte: Adaptado de Campos *et al.* (2009).

Em reatores de grânulos aeróbios onde a alimentação ocorre de maneira descontínua (intermitente), a matéria orgânica é suprida apenas no início do ciclo operacional, e a alta concentração do substrato no meio líquido faz com que esse penetre em direção ao interior dos grânulos aeróbios. A matéria orgânica consegue uma penetração maior do que oxigênio nessa fase com abundância de substrato. Nesse período, o oxigênio é rapidamente consumido pelo metabolismo aeróbio nos processos de crescimento, armazenamento de substrato e nitrificação, notadamente nas camadas mais externas dos grânulos. O armazenamento de matéria orgânica como polihidroxibutirato (PHB) e o crescimento ocorrem aerobicamente no exterior dos grânulos ou por via anóxica no interior dos agregados microbianos. Durante o período sem substrato externo disponível, ocorre o crescimento utilizando o PHB armazenado previamente. O nitrato produzido durante a nitrificação pode ser simultaneamente

desnitrificado dentro do grânulo utilizando o PHB armazenado intracelularmente como doador de elétrons (BEUN *et al.*, 2001).

Quando no processo de formação do lodo granular aeróbio, o inóculo é submetido a condições anaeróbias-aeróbias alternadas, isso irá proporcionar a seleção dos agentes microbianos, alguns deles responsáveis pela remoção simultânea dos nutrientes. Esses organismos são os acumuladores de polifosfato (PAO) e os acumuladores de glicogênio (GAO) (ZENG *et al.*, 2002). Entretanto, o processo de formação de lodo granular aeróbio combinado com remoção biológica de nitrogênio (nitrificação e desnitrificação) pode encontrar alguns problemas, uma vez que a quantidade de matéria orgânica constitui em um fator limitante para a remoção de fósforo e para a desnitrificação.

A presença de organismos responsáveis tanto pela desnitrificação quanto pelo consumo de fósforo em condições anóxicas, pode superar o problema de limitação de material orgânico (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1998). Essas bactérias, designadas por organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes (DPAO), possuem características metabólicas similares às aquelas apresentadas pelos PAO. A distinção está na capacidade dos DPAO em utilizar o nitrato e/ou nitrito (produzidos pela nitrificação em condições aeróbias) ao invés de oxigênio como acceptor de elétrons para remover de forma simultânea nitrogênio e fósforo da água residuária. Segundo FLOWERS *et al.*, (2009) esses organismos não requerem a adição externa de carbono, porque eles utilizam os polímeros armazenados intracelularmente (em condições anaeróbias) como doador de elétrons para a desnitrificação. Além do uso eficiente da matéria orgânica afluyente, o nitrito ou nitrato é utilizado como acceptor de elétrons (ao invés do oxigênio), diminuindo o requerimento de aeração, o que reflete na redução dos custos operacionais.

A Figura 3.13 apresenta um mecanismo simplificado das principais conversões ocorrendo em paralelo na estrutura do lodo granular aeróbio cultivado em RBS sob o regime anaeróbio/aeróbio. A ocorrência simultânea dos processos de nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo durante a fase aeróbia dificulta a identificação de rotas específicas de conversão. Durante o regime de alimentação anaeróbio, não há estratificação do biofilme e todo o grânulo é mantido em condições anaeróbias.

Em uma pesquisa desenvolvida na Itália para tratamento de esgoto sanitário, utilizou-se um reator de 2 m³ de volume, operado em bateladas sequenciais com

grânulos aeróbios, cujos ciclos de operação apresentaram duração de 4 - 12 h. Foram reportadas eficiências de remoção de 80 - 90 % para matéria orgânica, sólidos suspensos totais e amônia (DIACONI *et al.* 2008).

Mosquera-Corral *et al.* (2005) avaliaram o desempenho de um RBS com grânulos aeróbios para tratamento de esgoto sanitário, adicionando diferentes concentrações de carga orgânica e nitrogênio, para verificar a eficiência de remoção de nitrogênio. Os autores reportaram remoções máximas de 90% de matéria orgânica e 55% de nitrogênio.

Com objetivo de remover clorofenóis de efluentes advindos de atividades industriais e agrícolas, Carucci *et al.* (2008), trabalharam com reatores granulares e verificaram que o uso desta tecnologia foi uma alternativa viável para remoção destes compostos. Hübner (2008), trabalhando com RBS para tratamento de águas residuais da suinocultura, obteve uma eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 88 % aos 16 dias de operação.

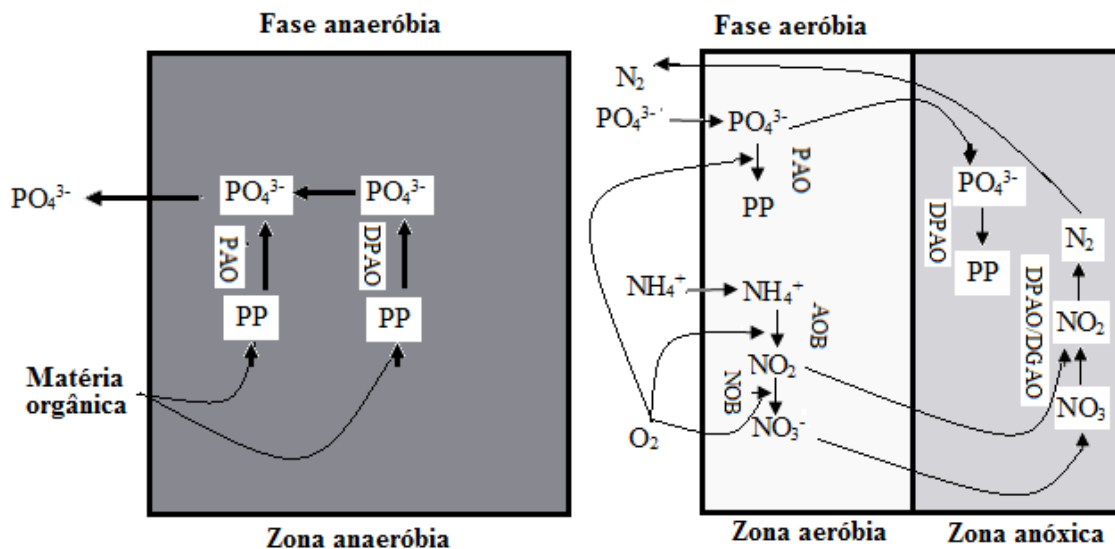


Figura 3.13: Esquema das principais conversões ocorrendo em paralelo na estrutura dos grânulos aeróbios. AOB: bactérias oxidadoras de amônio; NOB: bactérias oxidadoras de nitrito; PAO: organismos acumuladores de polifosfato; DPAO: organismos acumuladores de polifosfato desnitrificantes; GAO: organismos acumuladores de glicogênio; DQO: demanda química de oxigênio; PP: polifosfato. Os organismos desnitrificantes são exemplificados pelos DPAO e organismos acumuladores de glicogênio desnitrificantes (DGAO). Fonte: Adaptado de Bassin (2012).

Figuroa *et al.* (2008) utilizaram um RBS com grânulos aeróbios para tratar efluentes de indústria pesqueira, caracterizados pela elevada concentração em sais (> 30

g NaCl/L). Foram aplicadas cargas superiores a 1,72 kg DQO/m³/dia com eficiência de remoção entre 90 - 95%. O nitrogênio amoniacal foi removido via nitrificação/desnitrificação em valores acima de 40 % para cargas aplicadas de 0,18 kg N/m³/dia. A presença de sais no efluente bruto não causou efeito negativo na operação do reator durante a formação dos grânulos.

De acordo com os primeiros resultados apresentados por diferentes pesquisadores (IVANOV *et al.* 2005; TSUNEDA *et al.* 2005, ETTERER E WILDERER, 2001; BEUN *et al.* 2000; MOSQUERA CORRAL *et al.* 2005a; LI *et al.* 2006), o reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios é uma boa alternativa para o tratamento de esgotos domésticos, contribuindo para a conservação das águas nos meios urbanos, principalmente na remoção dos nutrientes.

Com base nos resultados apresentados por diversos autores, verifica-se que a utilização de RBS com biomassa granular tem sido uma boa alternativa para a remoção simultânea de DQO, nitrogênio e fósforo de diferentes tipos de águas residuárias (SCHWARZENBECK *et al.*, 2005; DE KREU *et al.*, 2005b; WANG *et al.*, 2009; JUNGLES *et al.*, 2011; COMA *et al.*, 2011).

Segundo Barr *et al.* (2010), Gonzalez-Gil e Holliger, (2011) e Franca *et al.*, (2015), o lodo granular aeróbio provou ser um processo eficiente para remover matéria orgânica e nutrientes em diversas águas residuais em escala laboratorial.

Weissbrodt *et al.* (2013), Bassin *et al.*, (2011) e Gonzalez-Gil e Holliger (2011) relatam que os fatores como temperatura, pH, concentração de sal, carga orgânica, composição do efluente, formação de consórcios microbianos unidos com os ciclos dos reatores bateladas sequências e uma estratégia de aeração, afetam a remoção biológica do fósforo.

Pronk *et al.* (2015) verificaram que para uma formação estável de grânulos aeróbios utilizando acetato, deve ocorrer a produção de polímeros de armazenamento sob condições de alimentação anaeróbia. Isso evita o consumo de DQO em meio aeróbio, resultando, conseqüentemente, na formação de grânulos estáveis. Os autores observaram que os grânulos instáveis podem surgir quando os substratos não são convertidos anaerobicamente em polímeros de armazenamento. No entanto, quando a DQO biodegradável é absorvida nos grânulos e/ou quando o substrato é convertido por bactérias de crescimento lento no período aeróbio, pode ocorrer granulação estável.

Henriet *et al.* (2016) estudaram a remoção de fósforo em reatores batelada sequenciais com lodo granular aeróbio, por meio de uma seleção de grânulos que proporcionaram uma maior remoção de fosfato. Foram avaliadas duas estratégias de remoção de biomassa, a primeira foi aplicada uma alta pressão seletiva (tempo de sedimentação curto), enquanto a segunda foi um aumento do tempo de sedimentação combinado com o enriquecimento da biomassa com micro-organismos acumuladores de polifosfato (PAO). A primeira estratégia resultou numa redução da eficiência de remoção de P, ao contrário da segunda, na qual se atingiu uma remoção de mais de 90% de P.

Apesar de todos os estudos supracitados, pesquisas focando na formação/estabilização de grânulos e remoção simultânea de DQO, N e P a partir de sistema de lodo ativado sem remoção de nutrientes e em condições de clima tropical são escassas (WINKLER *et al.*, 2011a).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Sistema experimental

O sistema experimental foi instalado no Laboratório de Poluição das Águas (LABPOL), no Programa de Engenharia Química da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Foi composto por tanques de armazenamento da alimentação do reator (A, B e C), reator de escala laboratorial, compressor de ar, medidor de vazão de ar (rotâmetro), sistema de automação para permitir a operação em bateladas sequenciais e bombas peristálticas para alimentar e esvaziar o reator. A configuração geral do sistema pode ser vista na Figura 4.1. O Reator em Bateladas Sequenciais de Grânulos Aeróbios (RBSG) foi confeccionado em acrílico transparente em formato de coluna de bolhas (Figura 4.2), apresentando as seguintes dimensões: 2,1 m de altura e 0,06 m de diâmetro interno. O volume útil do reator foi de 1,5 L.

O efluente sintético alimentado ao sistema foi dividido nos tanques de armazenamento A (Tabela 4.1), B (Tabela 4.2) e C (água). O meio A representou a fonte de carbono, enquanto o meio B forneceu a fonte de nitrogênio e fósforo. Em cada ciclo, 150 mL do meio A e do meio B foram misturados com 1200 mL de água (recipiente C) de modo a fornecer um afluente com DQO, nitrogênio amoniacal e fósforo de aproximadamente 400 mg/L, 50 mg/L e 20 mg/L, respectivamente. Tal composição é similar à utilizada por Bassin (2012), e procura simular as concentrações presentes em um esgoto sanitário típico (METCALF e EDDY, 1991). Uma solução de micronutrientes (Tabela 4.3) também foi adicionada ao meio sintético na proporção de 5 ml/L de meio para cada litro preparado.

Tendo em vista que a cada ciclo são alimentados e retirados 0,95 L de líquido e o reator apresenta volume útil de 1,5 L, o volume que permanece no interior do sistema é de 0,55 L. Desse modo, o percentual de troca de volume do RBS é de 63%, e o TRH do sistema é de aproximadamente 4,8 h. Levando em conta as concentrações de matéria orgânica, nitrogênio amoniacal e fósforo e as características do reator, tem-se que a carga orgânica, nitrogenada e de fósforo aplicada ao sistema é de 2 kgDQO/(m³.d), 0,25 kgNH₄⁺/N/(m³.d) e 0,1 kgPO₄³⁻P/(m³.d).

Tabela 4.1: Composição da solução A.

Componentes	Concentração (mg/L)
NaAc3H₂O	4385
MgSO₄7H₂O	445
KCl	175
CaCl₂	364

Tabela 4.2: Composição da solução B.

Componentes	Concentração (mg/L)
NH₄Cl	900,7
K₂PO₄	368
KH₂PO₄	143,5

Tabela 4.3: Composição da solução de micronutrientes suplementada ao efluente sintético.

Componentes	Concentração (mg/L)
EDTA	50000
(NH₄)₆Mo₇O₂₄	1036
ZnSO₄	3220
CaCl₂	12354
CoCL₂	5540
CuSO₄	1004
FeSO₄	2728

A aeração foi feita por meio de um compressor que enviava o ar comprimido para o interior do reator por meio de um difusor poroso, instalado na parte inferior do reator. A linha de ar comprimido também foi composta por filtros, válvulas reguladoras de pressão e rotâmetro para medição da vazão. O funcionamento desses equipamentos foi controlado por meio de um controlador lógico programável (CLP), que permitiu controlar a duração de cada fase (enchimento, aeração, sedimentação e retirada do

efluente tratado) do ciclo operacional do reator, o acionamento e desligamento das bombas e válvulas de entrada/saída de líquido e do compressor de ar.

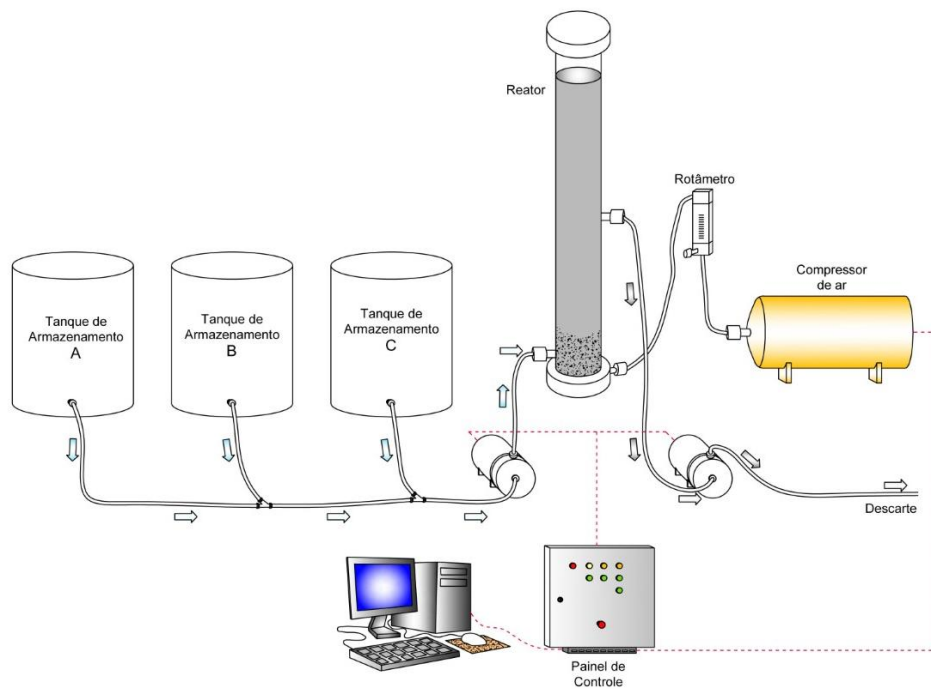


Figura 4.1: Ilustração do sistema experimental.

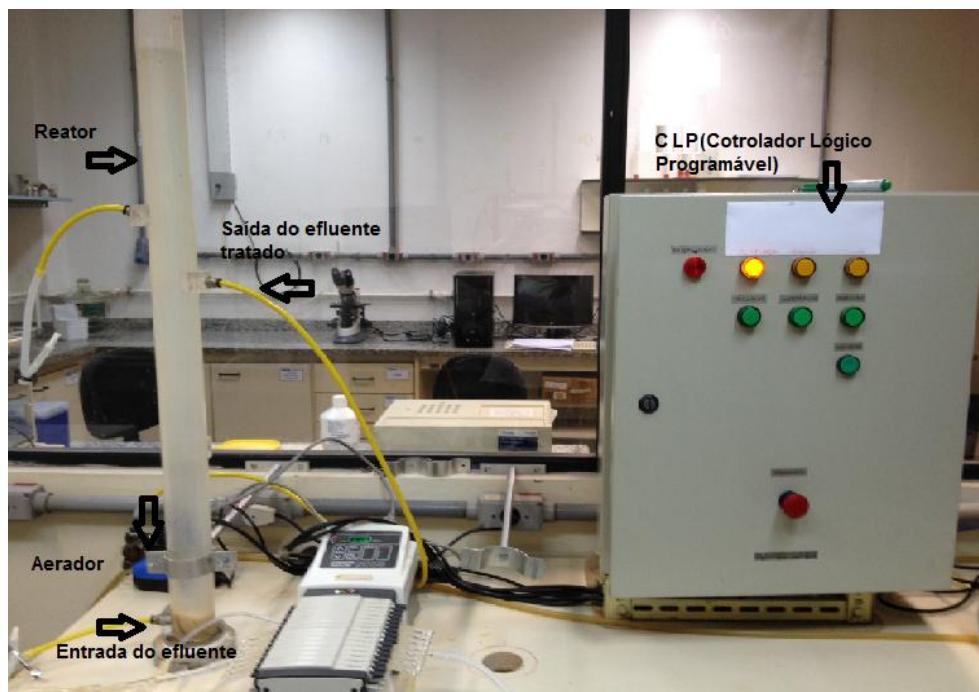


Figura 4.2: Sistema experimental composto pelo reator em bateladas sequenciais de grânulos aeróbios (RBSG) durante o período de partida para seleção de grânulos.

4.2 Inoculação do reator e estratégias operacionais

O reator foi inoculado com lodo ativado proveniente de uma Estação de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro (Alegria, CEDAE). Foi adicionado 1 L de lodo de inóculo no reator, e, em seguida, iniciou-se a operação do reator.

A operação do reator foi dividida em duas fases: I e II. Na fase I, o processo de seleção de grânulos aeróbios foi realizado logo após o reator ter sido inoculado com lodo ativado, sem prévia aclimação do mesmo. Na fase II, a tentativa de formação de grânulos foi antecedida por uma fase de adaptação do inóculo, conforme será detalhado a seguir.

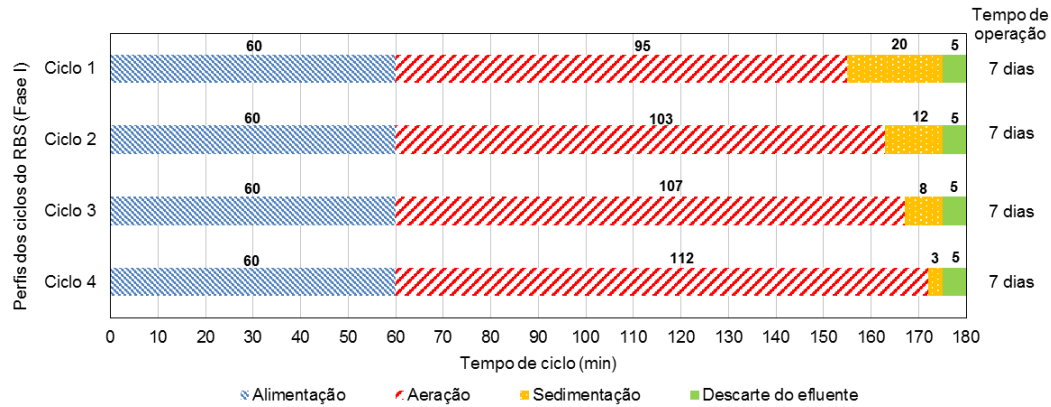
A Figura 4.3 apresenta a duração de cada fase do SBR (isto é, alimentação, aeração, decantação e retirada de efluente) nas fases I (Figura 4.3a) e II (Figura 4.3b). O tempo de operação em cada condição do ciclo SBR durante os estágios de aclimação e seleção também está indicado. O estágio de seleção de grânulos na fase I e II é representado pelos ciclos 1 a 4 (Figura 4.3a) e pelos ciclos 1 a 5 (Figura 4.3b), respectivamente.

Durante a fase I (granulação aeróbia sem aclimação prévia da biomassa), o tempo total de ciclo foi de 3 h, o qual foi inicialmente dividido em 60 min de enchimento, 95 min de aeração, 20 min de sedimentação e 5 min de retirada do efluente. Durante a fase de partida do reator (primeiros 28 dias de operação), o tempo de sedimentação foi gradualmente reduzido a cada 7 dias de 20 para 3 minutos no intuito de selecionar a biomassa de rápida sedimentação e promover a remoção de lodo floculento leve. O período de aeração foi consequentemente aumentado de 95 min para 112 minutos para manter o tempo de duração total do ciclo constante (3h) (Figura 4.3a).

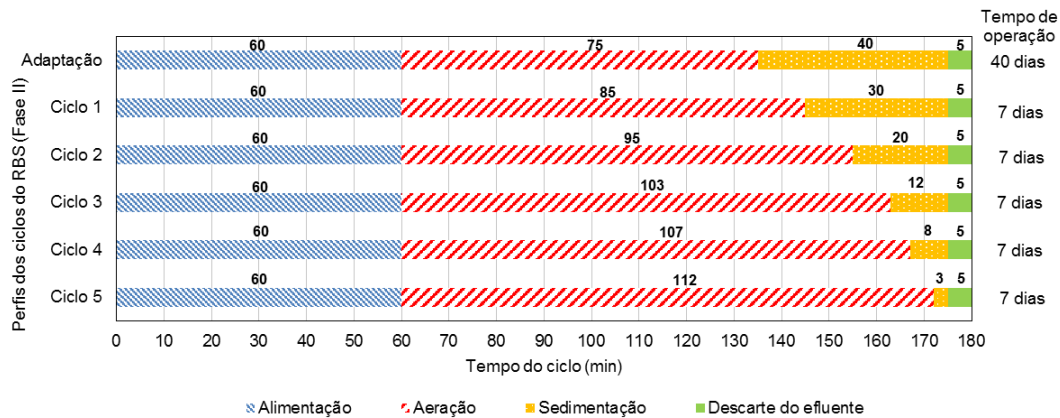
Na Fase II, o RBSG também foi operado com uma fase adicional que antecede os regimes dos ciclos. Essa fase adicional se refere à aclimação do lodo, no próprio reator, durante a qual o tempo total do ciclo foi de 3 h, sendo 60 min de enchimento, 105 min de aeração, 40 min de sedimentação e 5 min de retirada do efluente.

Logo, a fase de partida incluiu um período relativamente longo (40 dias) de adaptação durante os quais foram propiciadas condições para que a biomassa sedimentasse durante 40 minutos com o propósito de maximizar a retenção do lodo floculento presente no SBR e evitar o seu arraste (*washout*). Sob essas condições, a fase de aeração durou 75 min. O período de aclimação do lodo foi encerrado quando um

estado pseudo-estacionário foi alcançando (isto é, conversões biológicas estáveis dentro do reator). Em seguida, o tempo de sedimentação foi gradualmente reduzido de 30 para 3 min em cinco etapas. Por conseguinte, o tempo de aeração foi aumentado para manter a duração total do ciclo em 3 h (Figura 4.3b).



(a) Fase I



(b) Fase II

Figura 4.3: Perfis do ciclo SBR em (a) Fase I e (b) Fase II.

Durante a fase de seleção de grânulos, o tempo de retenção do sólidos (TRS) não foi controlado, sendo influenciado, portanto, pelo descarte natural de biomassa resultante da redução gradual no tempo de sedimentação. Uma vez que a granulação completa foi atingida nas duas estratégias operacionais (Fases I e II), o TRS foi controlado em cerca de 30 dias por meio de remoção manual de lodo do reator, como

descrito previamente (BASSIN *et al.*, 2012b). A remoção de lodo se seu a cada dois dias, e o TRS foi determinado de acordo com WINKLER *et al.* (2011).

4.3 Monitoramento do reator

Durante ambas as Fases (I e II), o desempenho do reator em relação à remoção de matéria orgânica (DQO) e nutrientes (nitrogênio e fósforo) foi acompanhado por meio de determinações analíticas desses parâmetros, tal como apresentado a seguir. A biomassa foi igualmente caracterizada ao longo do tempo no intuito de permitir o entendimento do processo de granulação aeróbia sob diversas condições de operação. A Tabela 4.4 mostra a frequência de análises dos parâmetros analisados.

Tabela 4.4: Frequência de análises dos parâmetros analisados.

Parâmetros	Frequência
Nitrogênio Amoniacal, Nitrito, Nitrato, Fósforo, Demanda Química de Oxigênio, Oxigênio dissolvido, pH e T.	1 a 3 vezes por semana
Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos voláteis, Índice volumétrico de lodo (IVL), Densidade dos grânulos, Diâmetro médio das partículas e Velocidade de sedimentação.	1 vez por semana
Determinação de Polihidroxibutirato (PHB), Testes complementares à operação contínua do sistema RBS e Coleta de amostras para extração de DNA e Sequenciamento do gene.	Eventualmente

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Nitrogênio Amoniacal, fósforo e demanda química de oxigênio

A concentração de nitrogênio amoniacal (amônio) foi determinada por meio do reagente de Nessler (APHA, 1992). A análise de fósforo total foi determinada pelo método espectrofotométrico do ácido molibdovanadofosfórico (APHA, 2005). A demanda química de oxigênio (DQO) foi analisada segundo o método colorimétrico 5220 (APHA, 2005).

4.4.2 Nitrito

Para quantificação de nitrito (NO_2^-) nas amostras, foi empregado o kit analítico Nitriver 2 Nitrite Reagent, da Hach Company. Para tanto, foram adicionados em um tubo de ensaio 5 mL de amostra e um sachê do kit e em seguida, a mistura era agitada. Após 10 min, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro Hach, modelo DR/2000, a 585nm. Por meio da construção de curva de calibração, a concentração era obtida.

4.4.3 Nitrato

Para a determinação do nitrato (NO_3^-) e foi empregado o kit analítico Nitriver 5 Nitrate Reagent, da Hach Company. Para tanto, foram adicionados em um tubo de ensaio 5 mL de amostra e um sachê do kit, após 1 min a amostra era agitada. A leitura da absorbância em espectrofotômetro Hach, modelo DR/2000, era realizada depois de um período de 5 min a 500 nm. Com o auxílio de uma curva de calibração, a concentração era encontrada.

4.4.4 Oxigênio dissolvido, pH e T

O teor de oxigênio dissolvido (OD) foi medido utilizando um oxímetro da marca Inolab WTW, modelo oxi 7310. As medidas de pH foram realizadas por meio do método potenciométrico, com auxílio de um medidor de pH da Digimed DM-23, previamente calibrado com soluções padrão. A temperatura do meio reacional também foi determinada com o auxílio desse equipamento e expressa em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$).

4.5 Métodos de caracterização da biomassa

4.5.1 *Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos voláteis (SSV)*

Os sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV) no interior do reator foram quantificados utilizando o método descrito por Bassin *et al.* (2012). Os sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV) do efluente foram determinados conforme metodologia descrita nas seções 2540D e 2540E, detalhados pela APHA (2005). Nesse método, o volume da amostra varia de acordo com a quantidade de sólidos suspensos presentes, podendo ficar em torno de 10 a 200 mL. Nesse trabalho, foi utilizado um volume de 100 mL. Primeiramente, cadinhos com membranas de fibra de vidro eram colocados em uma mufla Pyroteca 560°C por 1h e, subsequentemente, após resfriados à temperatura ambiente eram pesados (essa massa corresponde a quantidade de sólidos relativo a membrana apenas). Em seguida, as amostras eram filtradas em membranas e levadas à estufa Fabbe-Primar, modelo 219, para secar por um período de 12 h à temperatura de 105 °C. Após esse período de tempo, os cadinhos eram novamente pesados em uma balança analítica Ohaus, modelo As 200, obtendo-se assim o valor de SST. Posteriormente, procedeu-se à calcinação do material em mufla à temperatura de 560 °C. Após a pesagem dos mesmos, determinou-se a concentração dos sólidos suspensos fixos (SSF). O valor de SSV foi obtido a partir da diferença entre SST e SSF.

4.5.2 *Índice volumétrico de lodo (IVL)*

Esse parâmetro indica o volume ocupado por unidade de massa (mL/gSST) de lodo ao decantar. Para a determinação do IVL₃₀, deixou-se decantar em uma proveta de 500 mL um volume de 100 mL de amostra, extraída do reator, durante 30 min, medindo-se o volume final ocupado pelos sólidos. Conhecida a concentração de biomassa na proveta e o volume da mesma, determinou-se o IVL pela relação entre o volume final ocupado pelo lodo (mL) e a quantidade de biomassa na proveta (g SSV).

4.5.3 *Densidade dos grânulos*

A massa específica de uma substância é definida como a massa por unidade de volume e expressa em kg/m³ no sistema internacional de unidades (MUNSON *et al.*, 1997). Um dos métodos para a determinação de densidade consiste na medida do peso

de um recipiente com volume conhecido, volume este calibrado com o peso da água pura no mesmo recipiente. Esse recipiente é normalmente um picnômetro de vidro, resistente e com baixo coeficiente de expansão térmica, geralmente com 25 mL ou 50 mL de volume e precisão até a quarta casa decimal (CECCHI, 2003). A ABNT adota o processo do picnômetro para a determinação da massa específica das partículas menores que 4,8 mm, utilizando a Equação 4.1.

$$\rho_a = \rho_{H_2O} \frac{(m_a - m_v)}{(m_{H_2O} - m_v)} \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde ρ_a é a massa específica da amostra (kg/m^3) a uma dada temperatura; ρ_{H_2O} é a massa específica da água (kg/m^3) na mesma temperatura; m_a é a massa (kg) do picnômetro cheio da amostra; m_{H_2O} é a massa do picnômetro (kg) cheio de água e m_v é a massa do picnômetro (kg) vazio (WINKLER *et al.*, 2011).

4.5.4 Diâmetro médio das partículas

A determinação do diâmetro médio das partículas foi realizada pela técnica de granulometria por difração a laser, com o equipamento Mastersizer 2000 da marca Malvern Instruments AS. O aparelho utilizado possui capacidade de medição de partículas numa faixa de 0 a 2000 μm .

4.5.5 Velocidade de sedimentação

Dois métodos foram usados para determinar a velocidade de sedimentação: um realizado em proveta (método experimental) e o outro teórico baseado na lei de Stokes. No método experimental, levou-se em consideração o tempo que o grânulos do topo leva até a base do leito do lodo. A Equação 4.2 determina a velocidade de sedimentação de uma única partícula.

$$V_s = \frac{d}{t} \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde d é a distância percorrida pela partícula (m) e t é o tempo (s).

Para o cálculo segundo a lei de Stokes, levou-se em consideração valores médios de densidade e diâmetro. Quando o número de Reynolds da partícula era menor do que 1, foi utilizada a lei de Stokes para calcular a velocidade de sedimentação (Equação 4.3).

$$V_s = \frac{g}{18} \cdot \frac{\rho_p - \rho_w}{\rho_w} \cdot \frac{d_p^2}{\nu_w} \quad \text{Equação 4.3}$$

Para partículas cujo número de Reynolds era superior a 1, a velocidade de sedimentação foi determinada por meio do cálculo do número de Arquimedes (Equação 4.4).

$$Ar = \frac{g}{\nu_w} \cdot \frac{\rho_p - \rho_w}{\rho_w} \cdot d_p^3 \quad \text{Equação 4.4}$$

E posteriormente foi definido o número ômega a partir do diagrama de Omega Arquimedes. A velocidade de sedimentação foi então calculada por meio da Equação 4.5.

$$A = \frac{V_s^3 \cdot \rho_w}{g \cdot \nu_w \cdot (\rho_p - \rho_w)} \quad \text{Equação 4.5}$$

Em que, g é a aceleração da gravidade, ρ_w é a massa específica da água, ρ_p é a massa específica da partícula, ν_w é a viscosidade cinemática da água, d_p é o diâmetro de partícula e V_s é a velocidade de sedimentação.

4.5.6 Idade do lodo

A idade do lodo ou tempo de retenção sólidos (TRS) foi calculado segundo a Equação 4.6.

$$\theta_c = \frac{V_r \cdot SSV_r}{Q_{es,SSV} + Q_{ex,SSV}} \quad \text{Equação 4.6}$$

Onde: θ_c = Tempo de retenção celular (dias), V_r = volume do reator (m^3), $SSV_{r,ex}$ = sólidos suspensos voláteis do reator ou do excesso (gSSV), $Q_{es,SSV}$ = taxa de SSV do efluente de saída ($gSSV_{es} m^3 dia^{-1}$) e $Q_{ex,SSV}$ = taxa de SSV do lodo em excesso ($gSSV_{ex} m^3 dia^{-1}$).

4.5.7 Determinação de Polihidroxibutirato (PHB)

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres lineares produzidos por diversos grupos de bactérias como reserva de carbono e energia, a partir de ácidos graxos, açúcares ou lipídeos. O polihidroxibutirato (PHB) é o mais conhecido dos PHA e é classificado como PHA um composto de cadeia curta (C3 – C5) (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Para a determinação do PHB, foi necessário preparar padrões desse composto para gerar uma curva de calibração para o método. Para tal, pesou-se de 2 mg a 50 mg ao 0,1 mg de ácido polihidroxibutírico em tubos com tampa, de modo que os pontos ficassem espaçados. Para uma amostra com células, pesou-se 40 mg de célula liofilizada em tubo com tampa; ou com amostra líquida, deixou-se o tubo secando em estufa para retirada de água. Os tubos foram colocados em dessecador para esfriar ao abrigo de água. Foram então pesados até se obter massa constante. Preparou-se uma solução de padrão interno. Para isso, pesou-se 0,04 g a 0,1 mg de ácido benzoico. Dissolveu-se o ácido benzoico em n-propanol e transferiu-se o mesmo para um balão volumétrico de 10 mL. Avolumou-se o balão até o traço de referência. Fez-se uma solução de n-propanol acidificado para que ocorresse a quebra do polímero. Para isso, misturou-se HCl e n-propanol na proporção de 1:4 em quantidade suficiente para análise das amostras (2 mL para cada tubo). Adicionou-se 2 mL de n-propanol acidificado em cada tubo. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de 1,2-dicloroetano, solvente responsável pela extração dos analitos para análise. Então, 100 μ L do padrão interno foram adicionados. Vedaram-se os tubos com fita teflon para que não houvesse perdas por evaporação. Agitou-se cada tubo no vórtex e estes foram colocados em banho por 3 h a 100°C para que ocorresse a reação. Agitações adicionais foram realizadas nos primeiros 30 min. Para que a água do banho não evaporasse totalmente, adicionou-se sazonalmente uma quantidade pequena de água, suficiente para que cobrisse os tubos e não alterasse a temperatura de forma brusca. Retiraram-se os tubos do banho após 3 h para resfriamento dos mesmos. Adicionou-se 4 mL de H₂O Milli-Q e agitou-se cada tubo em

vórtex por 30 segundos. Transferiu-se a fase orgânica do fundo do tubo para um tubo Eppendorf. A fase orgânica era a inferior, devido à maior densidade do 1,2-dicloroetano (1,25 g/cm³). Centrifugaram-se esses tubos a 13.000 rpm, por 3 min, a 10°C, para que ocorresse a separação de fases orgânica e aquosa (caso ainda apresentassem resíduo aquoso). Terminada esta etapa, coletou-se a fração orgânica com auxílio de seringa, filtrando o material extraído em membrana de PTFE com 0,22 µm de diâmetro de poro e 13 mm de diâmetro para um frasco de 2 mL. Esses padrões e amostras foram levados ao cromatógrafo para análise.

A quantificação dos analitos se deu por meio interpolação dos dados obtidos, com a equação gerada pela curva padrão. Em cada cromatograma obtido, foi anotado a área do analito (P3HB) e a área de ácido benzóico (padrão interno), para obter a razão das áreas. O “y” da equação da curva de calibração foi substituído pela razão entre a área do analito de interesse e a área do padrão interno, para obter a massa da substância na amostra.

4.5.8 Testes complementares à operação contínua do sistema RBS

Alguns testes de ciclo foram realizados em condições normais de operação do reator. Os testes foram realizados durante o final de cada estágio da Fase II para efeito de comparação entre os resultados obtidos em cada condição. Amostras foram coletadas a cada 10 – 20 min durante a fase de aeração para determinação de fósforo total, amônio, nitrato, nitrito e DQO.

4.5.9 Extração de DNA e sequenciamento do gene

Para investigar a diversidade bacteriana no reator, foram coletadas 8 amostras ao longo das Fases I e II. A Tabela 4.5 mostra as amostras e os dias em que foram coletadas.

O DNA genômico das amostras foi extraído usando o kit PowerSoil DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após isso, as amostras de DNA extraídas foram enviadas para sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq no Laboratório Nacional de Argonne (Argonne National Laboratory) (EUA).

Os dados de sequências foram processados usando o "RDP pipeline" (Ribosomal Database Project v.11). Os barcodes foram removidos e as sequências menores do que

150 pb e as quimeras foram removidas da análise. Os contigs foram montados e o arquivo de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi gerado. As UTOs foram definidas levando em consideração o critério de 3% de divergência. Uma sequência representativa de cada OTU foi classificada taxonomicamente usando classificador RDP.

Tabela 4.5: Amostras coletadas ao longo das Fases I e II para a análise de diversidade microbiana.

Fase I		Fase II	
Dias de coleta	Amostra	Dias de coleta	Amostra
0	Inóculo (IN_I)	0	Inóculo (IN_II)
40	Grânulo formado (GR_I)	80	Grânulo formado (FG_II)
160	Grânulo instável (UG_I)	120	Grânulo maduro (MG_II)
		160	Grânulo de cor escura (DG_II) e Grânulo de cor clara (LG_II)

Os índices de diversidade foram obtidos por meio do software PAST (“Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis”) (HAMMER, HARPER E RYAN,. 2001).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo, serão apresentados separadamente os resultados obtidos durante a operação do reator na Fase I (sem prévia aclimatação do inóculo) e Fase II (com prévia aclimatação do inóculo). Será apresentada uma discussão acerca de todo o experimento de modo que todos os resultados sejam analisados conjuntamente e comparados com os reportados na literatura.

Durante todo o período de operação, o oxigênio dissolvido na fase de aeração se manteve na faixa entre 4 e 6 mgO₂/L. A temperatura de operação do sistema foi de 28 ± 4°C. Já o pH foi mantido na faixa compreendida entre 7 a 8.

5.1 Fase I

5.1.1 Inóculo

Coletado a partir da estação de tratamento de esgoto municipal Alegria (CEDAE), o lodo utilizado como inóculo para a partida do reator na Fase I era formado majoritariamente por flocos, os quais apresentavam uma estrutura morfológica bastante irregular (Figura 5.1). Em geral, os flocos biológicos são formados basicamente por bactérias formadoras de flocos, cuja composição influencia na floculação da biomassa, e conseqüentemente, na sua sedimentação. Flocos ideais que propiciam boa eficiência de tratamento e sedimentação são classificados como sendo predominantemente de médio e grande porte, além de firmes, redondos e com aspecto compacto (VON SPERLING, 2008).

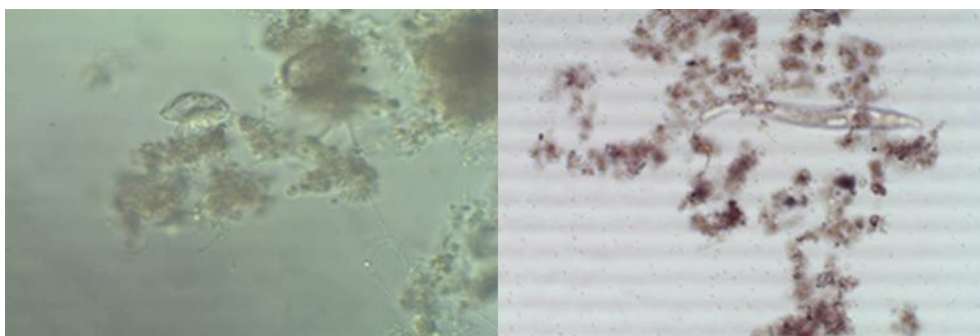


Figura 5.1: Morfologia do lodo de inóculo observadas em microscopia óptica de contraste de fase. Aumento de 40x.

Vale ainda mencionar que a planta de tratamento da qual o inóculo foi obtido foi concebida principalmente para a remoção de matéria orgânica. Além disso, durante a coleta do lodo, a atividade nitrificante do mesmo era baixa, de modo que a presença de amônio no efluente do processo de lodo ativados era observada.

5.1.2 *Processo de granulação aeróbia e características dos grânulos formados*

Após a fase de partida do reator (aproximadamente 30 dias), durante a qual o tempo de sedimentação foi diminuído gradativamente de 20 a 3 min, observou-se o início da aglutinação dos micro-organismos para a formação dos grânulos (Figura 5.2). Os grânulos formados apresentaram quantidade expressiva de micro-organismos filamentosos. A Figura 5.3 apresenta uma imagem dos grânulos formados no 40º dia de operação do reator, isto é, 10 dias após o fim do período de seleção da biomassa granular.

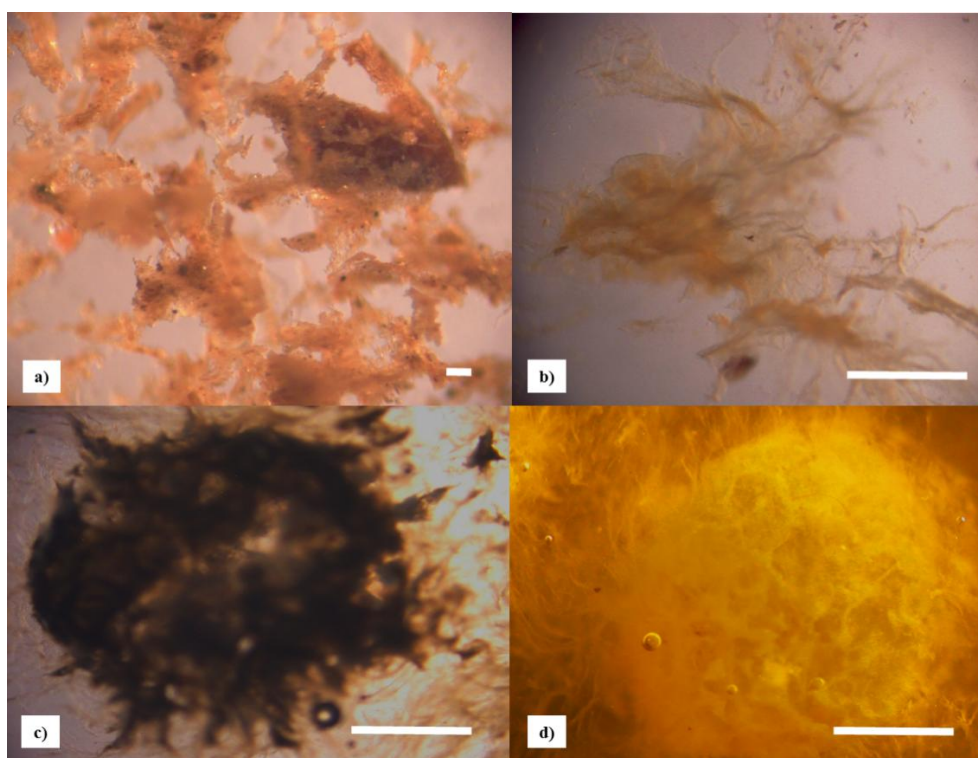


Figura 5.2: Imagens da biomassa obtidas em estereoscópio durante operação na Fase I (sem prévia aclimatação do lodo de inóculo): a) fase de seleção com 20 min de decantação; b) fase de seleção com 12 min de decantação; c) fase de seleção com 3 min de decantação d) fase de granulação completa. A barra de escala indica 50 µm em (a) enquanto em (b), (c) and (d) a barra de escala indica 500 µm.



Figura 5.3: Grânulos formados dentro do reator após 40 dias de operação do reator.

O índice volumétrico de lodo (IVL) é um parâmetro bastante utilizado para entender as diferentes fases da granulação aeróbia (ZHENG *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005). Esse parâmetro foi monitorado durante toda a operação do reator ao longo da Fase I (Figura 5.4). Com a diminuição gradual do tempo de sedimentação de 20 a 3 min objetivando a seleção das partículas de melhor sedimentabilidade logo após a inoculação do reator, observou-se a formação de agregados microbianos de maiores dimensões. Ao término do estágio de seleção, o diâmetro médio das partículas de lodo granular chegou a 0,75 mm (Figura 5.5). Como os flocos de difícil sedimentação foram gradualmente arrastados do reator devido ao decréscimo do tempo de sedimentação do ciclo do SBR, as propriedades de sedimentação da biomassa melhoraram consideravelmente. Isto se refletiu em um acentuado aumento na velocidade de sedimentação, de 1 para 23 m/h (Figura 5.8), enquanto que a densidade da biomassa também apresentou um acréscimo gradual (Figura 5.6). Concomitantemente, foi observada uma diminuição gradual do IVL na fase de seleção dos grânulos, o qual passou de 203 mL/g para 60 mL/g em menos de 20 dias.

A redução do IVL também foi observada por Akker *et al.* (2015) durante as 3 primeiras semanas de operação de um reator visando à granulação aeróbia, sendo que o valor desse parâmetro passou de 240 para 60 mL/g. Wagner (2011) observou que a redução do tempo de sedimentação teve um efeito positivo no IVL, que diminuiu de 190 para 26 mL/g. Por sua vez, o diâmetro médio dos grânulos aumentou gradualmente, atingindo um valor de 3,5 mm no final da operação do RBS de lodo granular (63 dias de duração).

Uma vez observada a formação dos primeiros grânulos, esperava-se que o IVL após a fase de seleção fosse mantido em valores próximos a 60 mL/g, característico de lodo granular com boa sedimentação (ZHENG *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005). No entanto, 10 dias após a fase de seleção, a biomassa granular formada foi totalmente tomada de filamentos, o que repercutiu na diminuição de sua densidade e no aumento brusco do IVL₃₀. Nesse período, a biomassa perdeu a forma arredondada, apresentando uma estrutura descompactada, sem forma definida. O diâmetro médio dessa biomassa foi reduzido para em torno de 0,5 mm, o que não representa um decréscimo substancial. No entanto, deve-se levar em conta que o excesso de filamentos presentes na biomassa pode ter influenciado o resultado obtido no analisador de granulometria por difração a laser (Malvern), contribuindo para superestimar o diâmetro médio das partículas. De fato, a proliferação de filamentosas durante esse período acarretou o aumento significativo do IVL₃₀, que passou a oscilar entre 400 mL/g e 540 mL/g (Figura 5.4). Períodos de queda e aumento do IVL (60 - 385 mL/g), atrelado ao aumento da concentração de biomassa (3,5 - 13 gSST/L) também foram constatados por Akker *et al.* (2015). Esses autores afirmam que esse fenômeno está ligado à instabilidade da biomassa, e, conseqüentemente, ao crescimento de organismos heterotróficos, visto que o arraste dos sólidos ocorreu gradativamente durante os 40 dias de operação, fazendo com que a concentração de sólidos caísse para 0,9 gSST/L.

De forma surpreendente, grânulos com estrutura razoavelmente regular formados a partir da biomassa com formato indefinido voltaram a aparecer no sistema, levando a um novo decréscimo do IVL para 120 mL/g. O diâmetro médio das partículas voltou a subir para aproximadamente 0,7 mm, ao mesmo tempo que a densidade sofreu um pequeno incremento. No entanto, após alguns dias de recuperação, a biomassa granular, além de perder a forma novamente, sofreu desagregação, dividindo-se em pequenas partículas com menor densidade. Essa fase foi denominada de desgranulação. Conseqüentemente, o diâmetro médio da biomassa decaiu gradualmente, até atingir o valor mínimo de 0,39 mm (Figura 5.5). Com partículas menores e menos densas, o IVL voltou a subir, permanecendo estável em valores na faixa entre 215 e 300 mL/g. Beun *et al.* (1999) trabalharam com um reator granular submetido a tempos de retenção celular em torno de 50 dias. Os menores valores de IVL₁₀ e IVL₃₀ foram de 80 e 77 mL/g, respectivamente.

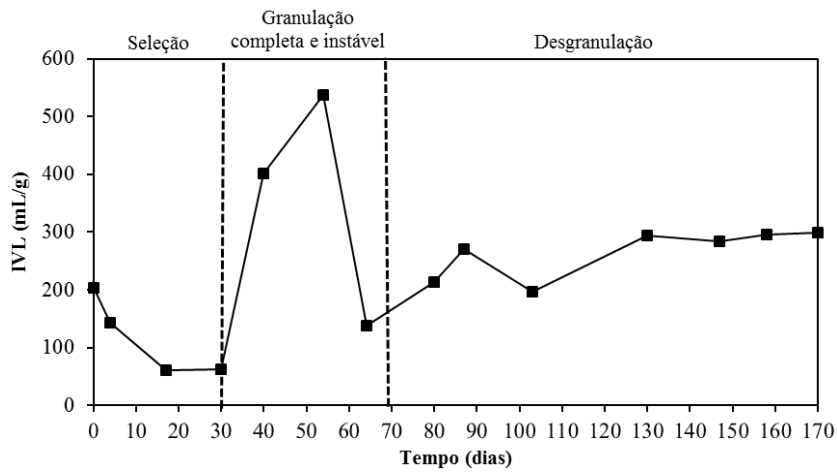


Figura 5.4: Índice volumétrico de lodo (IVL_{30}) ao longo da operação do reator na Fase I.

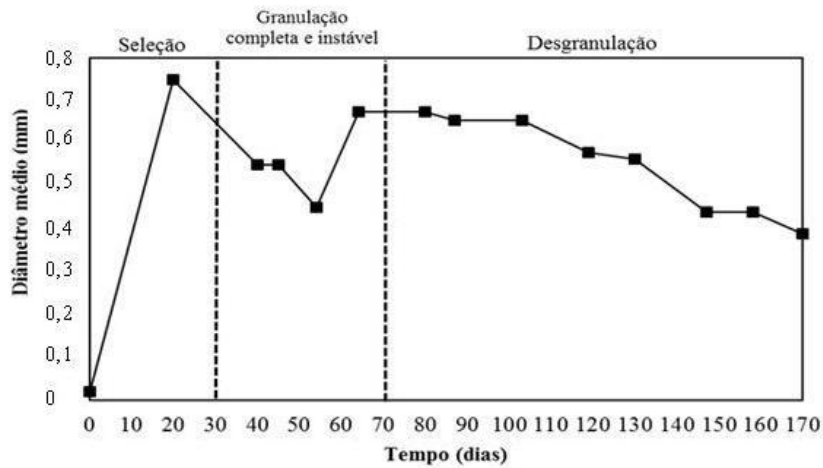


Figura 5.5: Diâmetro médio das partículas de biomassa ao longo da operação na Fase I.

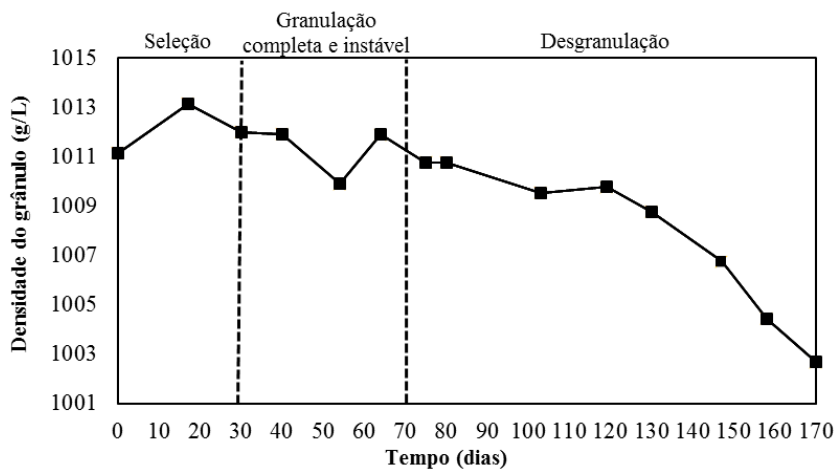


Figura 5.6: Densidade do grânulo da Fase I.

A velocidade de sedimentação da biomassa também foi avaliada por meio de experimentos. Como os flocos de difícil sedimentação foram gradualmente arrastados

do reator devido ao decréscimo do tempo de sedimentação do ciclo do SBR, as propriedades de sedimentação da biomassa melhoraram consideravelmente. Isso se refletiu em um acentuado aumento na velocidade de sedimentação, passando de 1 para 23 m/h (Figura 5.8). Jungles *et al.* (2011) também observaram que quando o tempo de sedimentação foi reduzido de 6 para 4 min, a velocidade de sedimentação passou a 11 m/h, enquanto que a redução de 4 para 3 min acarretou um aumento desse parâmetro para 15 m/h. De fato, a estratégia de redução gradual do tempo de sedimentação tem sido efetivamente aplicada em reatores de escala laboratorial para obtenção de partículas com alta velocidade de sedimentação (ARROJO *et al.*, 2004).

Uma vez completa a granulação (ao fim do estágio de seleção), grânulos começaram a se acumular rapidamente no sistema, resultando em um aumento na concentração de biomassa (Figura 5.7). Após cerca de 40 dias, o reator estava completamente dominado por grânulos, como ilustrado na Figura 5.3. Sob essas condições, esperava-se que o IVL_{30} se mantivesse próximo a 60 mL/g, o que é característico de lodo granular com boas propriedades de sedimentação (ZHENG *et al.*, 2005). No entanto, considerando-se que a biomassa formada estava completamente coberta por filamentos, um decréscimo em sua densidade e um rápido aumento no IVL_{30} foram observados. O IVL_{30} permaneceu instável entre 400 e 540 mL/g. Durante esse período, a biomassa não mais apresentava uma forma arredondada bem definida, assumindo uma aparência pastosa e sem forma regular. Apesar do diâmetro médio ter se reduzido para cerca de 0,5 mm, a taxa de sedimentação caiu substancialmente, resultando em arraste de biomassa do reator (Figura 5.7).

Após a fase de instabilidade e crescimento dos filamentos, a velocidade de sedimentação decaiu substancialmente, o que ocasionou certo arraste de células do sistema, evidenciado pelo decréscimo na concentração de sólidos suspensos totais (Figura 5.7). Nesse período, ocorreu também o acréscimo do IVL_{30} e diminuição do diâmetro das partículas. Surpreendentemente, alguns grânulos de formato razoavelmente regular começaram a se formar novamente a partir da biomassa filamentosa presente no biorreator. Isso levou ao decréscimo do IVL_{30} para 120 mL/g. Enquanto isso, o diâmetro médio aumentou para 0,7 mm e a densidade sofreu um pequeno aumento. A recuperação parcial do sistema durante a fase de granulação completa foi também acompanhada por um aumento na taxa de sedimentação (Figura 5.8) e na concentração de biomassa dentro do reator (Figura 5.7). Apesar disso, após

alguns dias, os grânulos perderam sua forma regular e se desagregaram, gerando pequenas partículas fragmentadas. O diâmetro médio caiu para 0,39 mm (Figura 5.5) enquanto o IVL_{30} aumentou e permaneceu entre 215 - 300 mL/g, faixa na qual *bulking* filamentoso é predominante. Nesse estágio, denominado como desgranulação, a velocidade de sedimentação dos flocos de lodo foi gradualmente reduzida para 2,5 m/h enquanto o TSS gradualmente decaiu de cerca de 2 g/L para 0,5 g/L (Figura 5.7). A razão média de VSS/TSS foi de cerca de 84%.

Um fato a ser destacado é que, apesar de ter ocorrido arraste da biomassa, esta permaneceu presa à parede do reator devido à consistência pastosa adquirida, provavelmente como resultado da proliferação de organismos filamentosos. Essa observação pode explicar o teor de sólidos praticamente invariável observado durante os últimos 20 dias de operação do reator na Fase I (Figura 5.7).

Quando as velocidades de sedimentação obtidas experimentalmente (com uso de proveta graduada) são comparadas com aquelas estimadas a partir da lei de Stokes, percebe-se que valores mais elevados foram obtidos quando o segundo método foi empregado (Figura 5.8). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de o diâmetro de partícula, utilizado no cálculo da velocidade de sedimentação, ter sido superestimado pelo método de difração a laser devido à presença de filamentos. Em função disso, o procedimento experimental parece ser mais adequado para a determinação da velocidade de sedimentação da biomassa, especialmente na presença de organismos filamentosos. Nesses casos, o diâmetro de partícula deve ser avaliado com cautela.

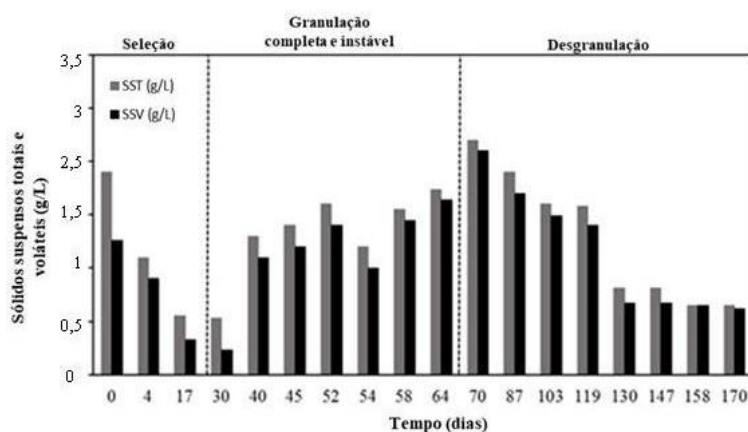


Figura 5.7: Sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) durante a Fase I.

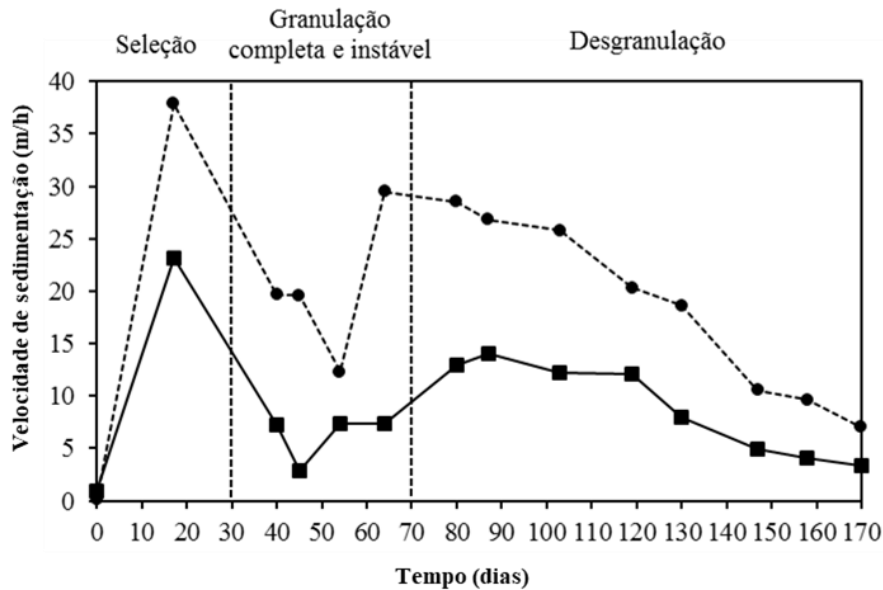


Figura 5.8: Velocidade de sedimentação das partículas ao longo da operação do reator em batelada sequencial: método experimental utilizando proveta (■) e cálculo teórico pela Lei de Stokes (●)

Para tentar compreender melhor as mudanças na estrutura da biomassa ao longo do processo de granulação, lançou-se mão de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 5.10). O lodo flocculento, sem forma definida, utilizado como inóculo, está representado na Figura 6.8a. Após a etapa de seleção de partículas de maior tamanho e densidade, foi atingido o estágio de granulação completa, durante o qual as partículas apresentaram forma arredondada (Figura 5.10b). A proliferação de filamentos nos grânulos formados (Figura 5.10c) provocou a perda da estrutura granular e, por conseguinte, deu início à fase de desgranulação (Figura 5.10d). Durante esse último estágio, observa-se que a biomassa já não apresenta mais forma definida (Figura 5.10d,e). Esse fenômeno de instabilidade dos grânulos também foi verificado por Akker *et al.* (2015). Como a biomassa já apresentava aspecto pastoso (Figura 5.9) na fase de desgranulação, não foi possível obter uma imagem mostrando a estrutura externa do grânulo. O próprio procedimento de preparação da amostra usado para visualização em MEV já era responsável por fragmentar ainda mais as partículas tomadas por filamentos, os quais podem ser observados em detalhes na Figura 5.10e. Além disso, é relevante mencionar que a preparação de amostras para à análise de MEV contribui com a fragmentação das partículas com excesso de filamentos, as quais exibem uma menor resistência ao cisalhamento. Em suma, a instabilidade observada nas diversas propriedades da biomassa, (IVL_{30} , diâmetro de partícula, densidade e velocidade de

sedimentação) é um reflexo dos instáveis agregados microbianos formados, indicando que o processo de granulação não foi bem-sucedido. O experimento foi, portanto, encerrado.

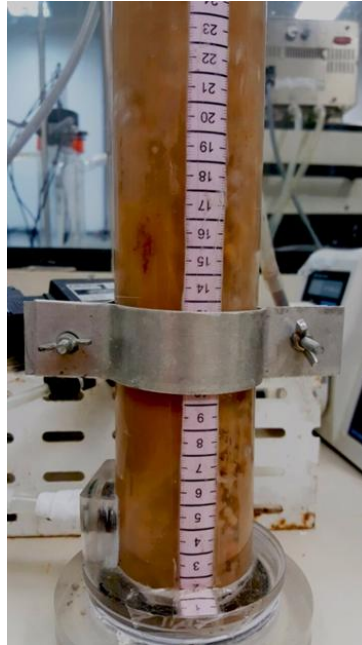


Figura 5.9: Biomassa com consistência pastosa retida na parede do reator após a desgranulação.

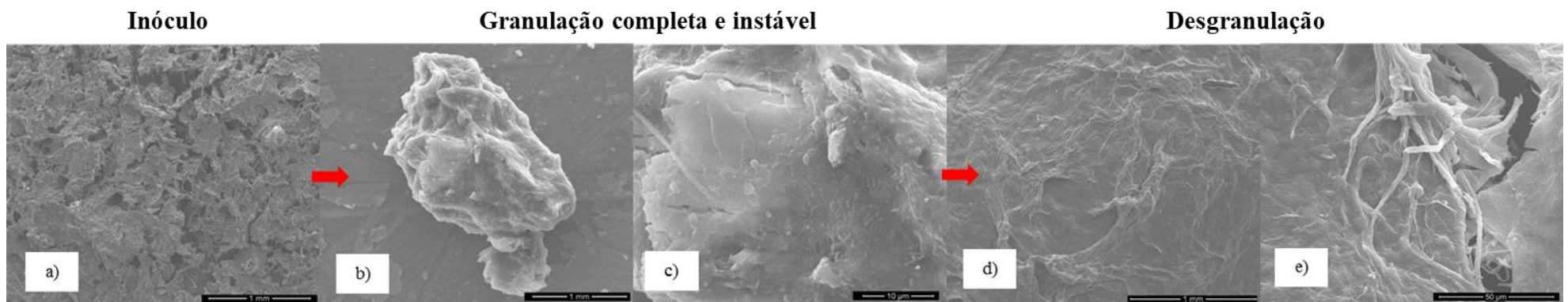


Figura 5.10: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da biomassa no final das diferentes fases: (a) inóculo; (b) e (c) granulação completa; (d) e (e) desgranulação.

5.1.3 Remoção de matéria orgânica e nutrientes

O desempenho do reator na Fase I foi avaliada em termos de remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo (Figura 5.11 a 5.13). Durante a fase de seleção da biomassa granular, a maior parte dos flocos de difícil sedimentação foram arrastados do sistema de modo a selecionar apenas partículas mais densas com alta velocidade de sedimentação.

A Figura 5.11 apresenta o desempenho do reator em relação à remoção de matéria carbonácea. A DQO na entrada (designada por t_0) foi mantida em aproximadamente 400 mg/L. Pequenos desvios desse valor devem-se à preparação do meio sintético. Durante a fase de seleção da biomassa granular, a remoção de matéria orgânica não foi completa, permanecendo em torno de 90%. Durante esse período, grande parte dos flocos pobremente sedimentáveis foi arrastada do sistema, dando oportunidade para a seleção apenas de partículas mais densas e com maior velocidade de sedimentação. No entanto, uma vez atingida a granulação completa (após 30 dias de operação), o acúmulo de biomassa granular permitiu remover toda a matéria orgânica afluyente. Com a instabilidade da biomassa, causada pela proliferação de bactérias filamentosas, tal desempenho não foi afetado, e a remoção de matéria orgânica continuou a ser completa. O mesmo foi observado durante a fragmentação da estrutura dos grânulos (etapa de desgranulação).

Trabalhando com cargas orgânicas entre 1,5 e 10 KgDQO/(m³.d), Figueroa *et al.*, (2009) obteve eficiências na remoção de matéria orgânica em termos de DQO solúvel de 80-90%. Esses valores são inferiores ao encontrados neste estudo, no qual a carga orgânica aplicada foi de 2 kgDQO(m³.d). Li *et al.* (2008) observaram que a carga orgânica aplicada teve um importante efeito na morfologia, propriedades estruturais e na população bacteriana dos grânulos formados. Segundo esses autores, altas cargas orgânicas promovem a formação de grânulos grandes e posterior ruptura dos mesmos.

É interessante ressaltar que, durante todo o período experimental, praticamente toda a matéria orgânica foi removida na fase de aeração, enquanto que a fase anaeróbia pouco contribuiu para abater a DQO. O balanço de massa para a DQO, levando em consideração a DQO afluyente e a taxa de troca de volume do SBR, revelou que apenas 10 - 20% da matéria orgânica afluyente foi removida durante o período de alimentação anaeróbia. Desse modo, a concentração de matéria orgânica após os 60 min destinados à

fase anaeróbia de alimentação (instante designado por t_{60}) são menores do que as do afluente principalmente devido à diluição desse último com o líquido remanescente do ciclo anterior (efluente tratado), praticamente desprovido de material orgânico durante a maior parte do experimento.

Considerando que a troca volumétrica do reator em cada ciclo é em torno de 63%, a diluição da afluente (DQO de 400 mg/L) com o líquido presente no interior do reator após o descarte fornece uma DQO em torno de 230 mg/L, particularmente para o período em que a DQO no efluente do reator (final do ciclo, designado por t_{180}) era nula. De fato, como pode ser observado na Figura 5.11, a DQO após o período de alimentação apresenta valor próximo a esse durante o período no qual a DQO foi totalmente removida. A DQO média no t_{60} foi de 224 mg/L.

Os perfis de concentração de fosfato ao longo da Fase I podem ser visualizados na Figura 5.12. A concentração afluente de fósforo apresentou o valor médio de 14 mgPO₄³⁻-P/L. Como o reator foi operado em regime anaeróbio-aeróbio, era esperado que ocorresse o desenvolvimento dos organismos acumuladores de polifosfato (PAO), com conseqüente liberação de fosfato na fase anaeróbia e absorção do mesmo na fase aerada. No entanto, a ocorrência do fenômeno EBPR (*Enhanced biological phosphorus removal*) pode ser desprezada ao longo de todo o período experimental, e a pequena remoção de fósforo (em torno de 19%) obtida ao longo do ciclo operacional por ser atribuída ao seu consumo para o crescimento celular. Jungler *et al.* (2011), operando um reator de grânulos em escala de laboratório, também observou que a eficiência de remoção de fosfato não teve uma clara tendência, atingindo o valor máximo de cerca de 80%.

As concentrações de amônio nas diferentes fases do ciclo do SBR estão ilustradas na Figura 5.13. A concentração afluente de amônio variou principalmente na faixa entre 40 e 44 mgN/L. Como não há nitrificação na fase de alimentação anaeróbia, a concentração de amônio após essa etapa é menor que a concentração de amônio na corrente de alimentação devido à diluição da última com líquido remanescente do ciclo anterior do SBR. Durante toda a operação na Fase I, a remoção de amônio foi baixa, em média de 46%. O baixo percentual de nitrificação foi parcialmente causado pela significativa perda de biomassa e conseqüente redução do tempo de retenção de biomassa em várias ocasiões durante a Fase I, como ocorreu na fase de seleção de grânulos e no período de instabilidade da biomassa granular.

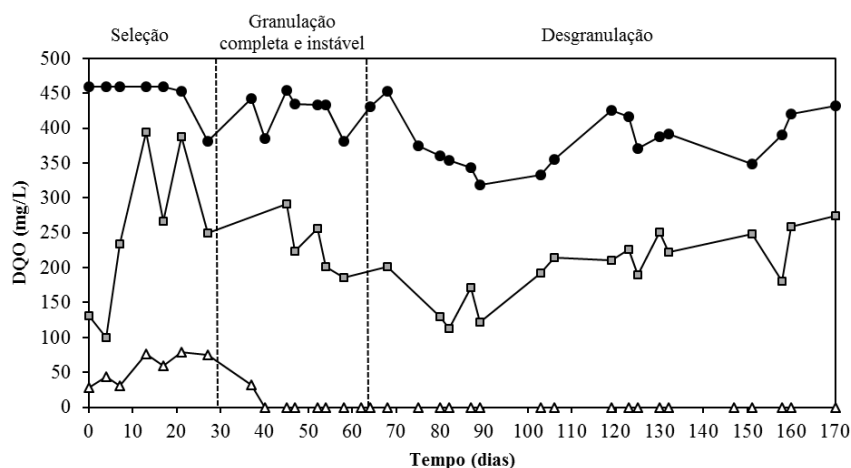


Figura 5.11: DQO no afluente (t_0) (●), após a alimentação em regime anaeróbico (t_{60}) (■) e no efluente (t_{180}) (Δ) durante a operação do reator na Fase I.

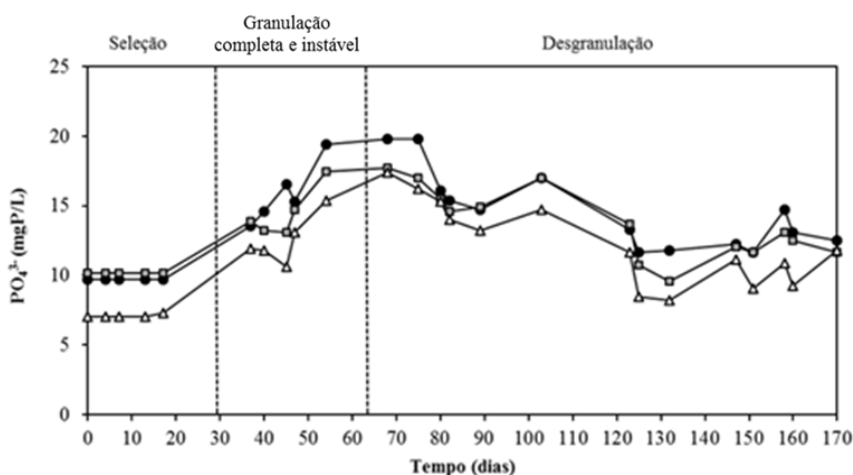


Figura 5.12: Concentrações de PO_4^{3-} (mg PO_4^{3-} -P/L) no t_0 (●), t_{60} (■) e t_{180} (Δ) durante a operação do reator na Fase I.

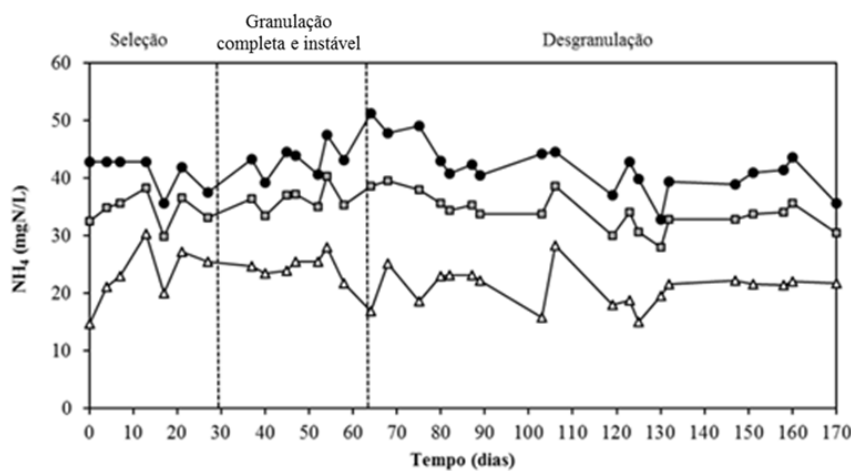


Figura 5.13: Concentrações de NH_4^+ -N no t_0 (●), t_{60} (■) e t_{180} (Δ) durante a operação do reator na Fase I.

5.2 Fase II

Considerando os resultados obtidos na Fase I, na qual observou-se granulação instável seguida de desgranulação, uma estratégia operacional diferente foi implementada. Nessa nova fase de experimentos, designada como Fase II, o lodo floculento utilizado como inóculo foi submetido a um período de aclimação às condições de operação do SBR antes do estágio de seleção de biomassa granular. Portanto, o tempo de sedimentação durante este período de adaptação foi mantido em 40 minutos para prevenir o arraste de biomassa, garantindo que a maior parte dos flocos de lodo ativado permanecesse no reator. A ideia era selecionar organismos heterotróficos de crescimento lento que fossem capazes de armazenar matéria orgânica afluenta na forma de polímeros intracelulares durante o período de alimentação anaeróbia, tais como organismos acumuladores de polifosfato (PAO), bem como bactérias nitrificantes. Conforme relatado na literatura, tais organismos, cujas taxas de crescimento são relativamente baixas, favorecem a obtenção de grânulos densos e estáveis (DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004).

Como evidenciado durante a operação da Fase I, já iniciada pela estratégia de diminuição do tempo de sedimentação para obter o arraste de flocos e seleção de biomassa granular, a atividade nitrificante do lodo desde o começo foi baixa, e a remoção biológica de fósforo não foi observada. Com a aplicação de condições anaeróbias e aeróbias sequenciais, evitando o arraste de sólidos, buscou-se estimular a ocorrência do fenômeno EBPR durante o período de aclimação.

5.2.1 Inóculo e fase de aclimação

Da mesma forma que na Fase I, o lodo utilizado como inóculo para a partida do reator na Fase II foi coletado na estação de tratamento de esgoto municipal Alegria (CEDAE). Uma foto ilustrativa do material biológico de partida está mostrada na Figura 5.14. Pode-se observar que algumas bactérias filamentosas também estão presentes na estrutura dos flocos de lodo.

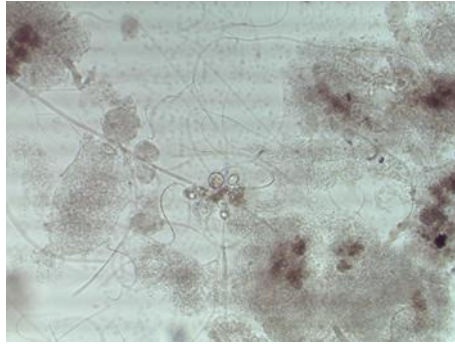


Figura 5.14: Morfologia do lodo de inóculo observada em microscopia óptica de contraste de fase. Aumento de 40x.

5.2.2 *Processo de granulação aeróbia e características dos grânulos formados*

Embora a etapa de aclimação do lodo ao regime anaeróbio-aeróbio tenha sido planejada para estimular o desenvolvimento de um consórcio microbiano constituído por PAO e bactérias nitrificantes e não visando a seleção de partículas de maior tamanho, durante esse período já foi observada alteração na estrutura da biomassa. Alguns flocos de maior tamanho e mais densos foram obtidos, apesar do tempo de sedimentação ter sido mantido elevado (40 min) (Figura 5.15).

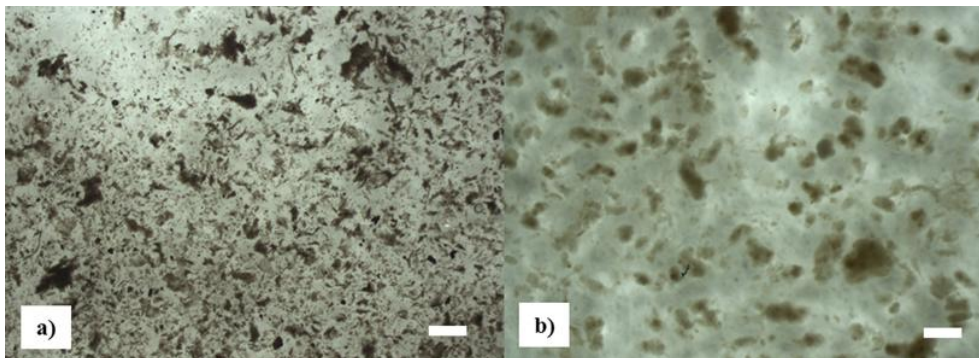


Figura 5.15: a) Lodo de inóculo; b) Aspecto do lodo após a etapa de aclimação. A barra de escala indica 500 μm .

Durante esse período, observou-se uma diminuição gradual do IVL_{30} de 197 para 124 mL/g (Figura 5.17). O tamanho médio dos aglomerados maiores formados neste estágio aumentou de 0,2 a 0,4 mm (Figura 5.18), enquanto a densidade aumentou ligeiramente (Figura 5.19). Consequentemente, observou-se um incremento na velocidade de sedimentação de 1,2 a 15 m/h (Figura 5.20).

A formação gradual de biomassa granular ao longo do estágio de seleção está mostrada na Figura 5.16. No início desse período, quando o tempo de sedimentação estava em 30 min, algumas partículas maiores com tamanho médio de 0,4 mm já haviam começado a aparecer no reator (Figura 5.16a). Ao reduzir o tempo de sedimentação para 20 min, aglomerados microbianos maiores se formaram (Figura 5.16b), embora os primeiros aglomerados com aparência de grânulos, apesar de terem formato irregular, foram observados quando o tempo de sedimentação foi reduzido para 3 minutos (Figura 5.16c). Granulação completa, caracterizada pela presença de grânulos maduros de formato arredondado (Figura 5.16d), foi atingida após 40 dias de operação durante o estágio de seleção. Consequentemente, uma redução no IVL_{30} foi observada quando o tempo de sedimentação foi reduzido de 40 para 3 min. O maior declínio ocorreu entre os dias 40 e 54, durante os quais o tempo de sedimentação foi reduzido de 40 para 20 minutos. O diâmetro médio da biomassa granular em formação aumentou gradualmente (0,4 - 0,75 mm) durante a fase de seleção (Figura 5.18). Ao mesmo tempo, a densidade (Figura 5.19) e a velocidade de sedimentação dos sólidos (Figura 5.20) aumentaram. No fim da fase de seleção, os grânulos apresentaram uma velocidade de sedimentação de 62 m/h.

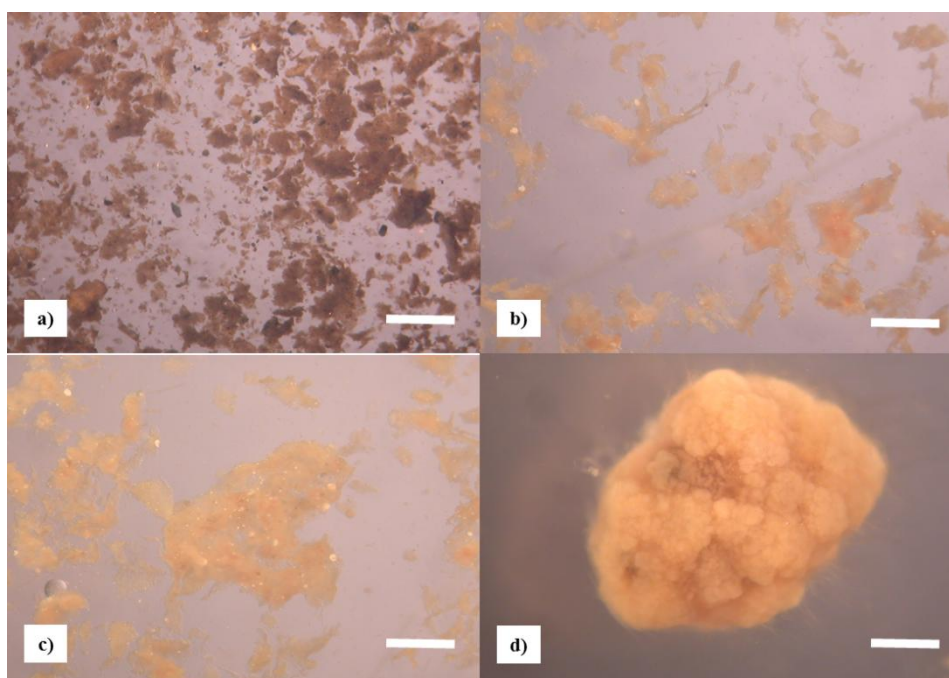


Figura 5.16: Imagens da biomassa em diferentes dias de operação: a) fase de seleção em 30 min de decantação b) fase de seleção em 20 min de decantação c) fase de seleção em 3 min de decantação d) fase de granulação completa. A barra de escala indica 500 μ m.

Após o período de seleção, o IVL_{30} permaneceu estável em cerca de 40 mL/g. Ademais, o IVL_5 praticamente se igualou ao IVL_{30} (Figura 5.17), indicando que se atingiu granulação completa da biomassa (PRONK *et al.*, 2015b; AKKER *et al.*, 2015). O mesmo comportamento foi observado na densidade dos grânulos formados, que permaneceu praticamente invariável durante todo o estágio de granulação. O diâmetro médio da biomassa granular aumentou gradualmente até 1,05 mm (Figura 5.18), enquanto a velocidade de sedimentação alcançou um máximo de 80 m/h. A partir daí o lodo granular desenvolvido permaneceu estável e robusto até o fim da operação do SBR na Fase II.

Segundo Tay *et al.* (2006), o diâmetro médio dos grânulos aeróbios podem variar de 0,2 a 10 mm dependendo de vários fatores: crescimento celular, produção de exopolímeros e desprendimento das células do grânulo devido ao estresse hidrodinâmico pela agitação e aeração. Ni *et al.* (2009) conseguiram formar grânulos aeróbios utilizando um RBS para tratar esgoto sanitário cuja DQO era em torno de 200 mg/L, praticamente a metade da empregada nesse trabalho. Depois de 300 dias de operação, esses autores registraram uma concentração de biomassa de 9,5 gSSV/L, inferior à obtida nesse trabalho, que chegou a 15 gSSV/L. Já os diâmetros dos grânulos formados foram de 0,2 a 0,8 mm de diâmetro, enquanto que os valores obtidos nessa pesquisa situaram-se entre 0,2 e 2,0 mm.

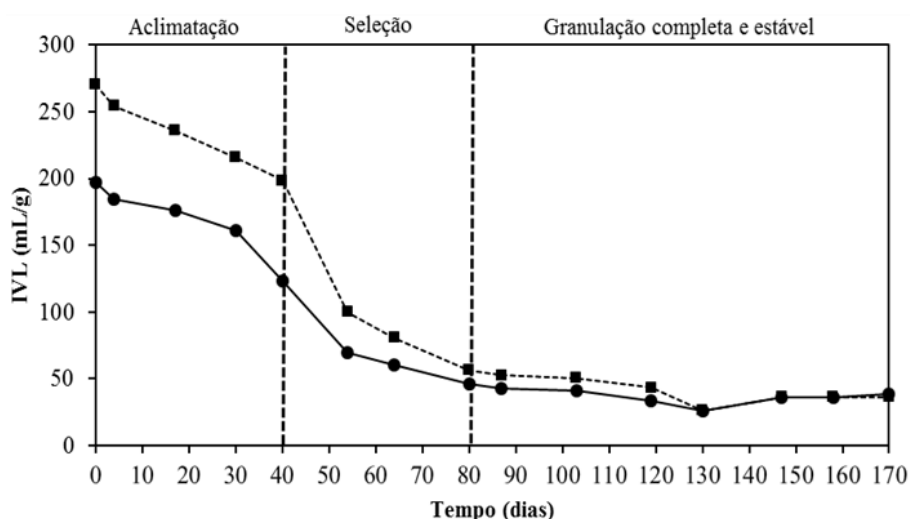


Figura 5.17: Índice volumétrico de lodo (IVL) ao longo da Fase II: IVL_5 (■) IVL_{30} (●).

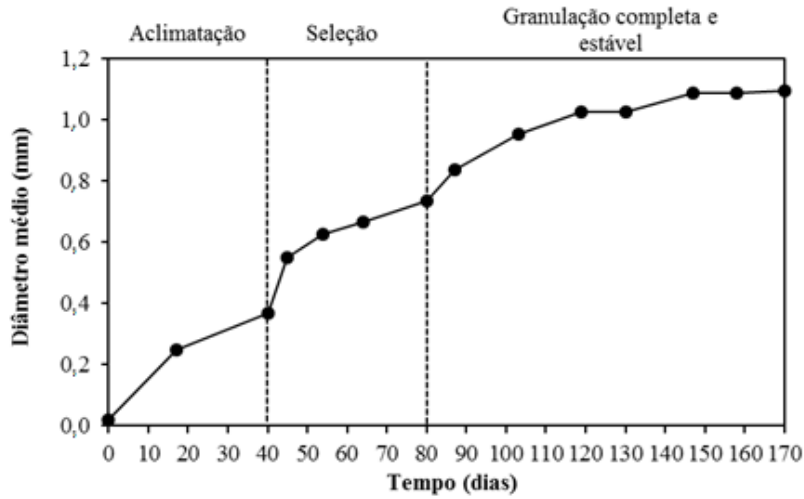


Figura 5.18: Diâmetro médio de partícula ao longo da Fase II.

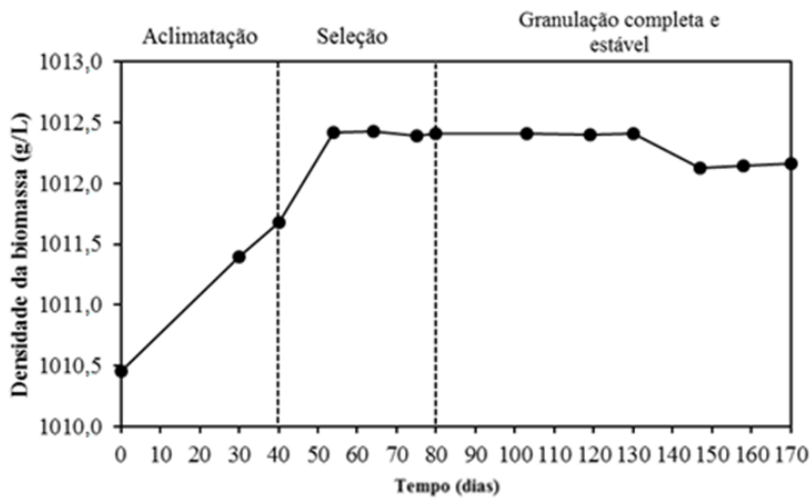


Figura 5.19: Densidade da biomassa ao longo da Fase II.

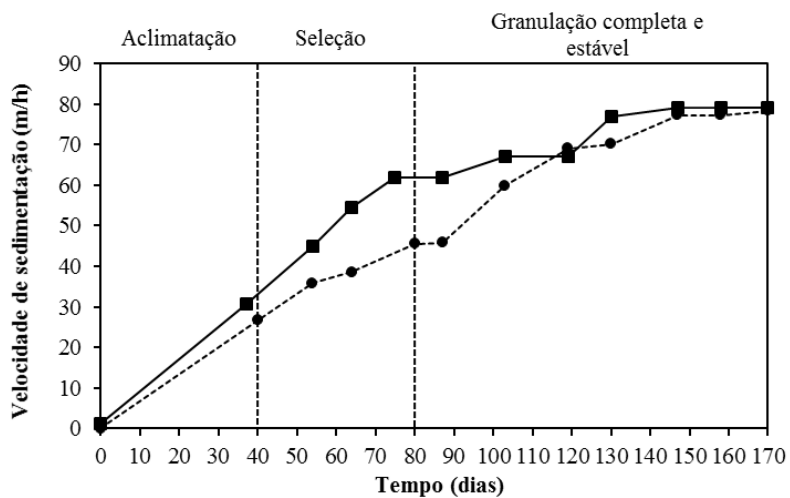


Figura 5.20: Velocidade de sedimentação das partículas ao longo da operação do reator em batelada sequencial: método da proveta (■) e Lei de Stokes (●).

Diferentemente do que foi observado na Fase I, a taxa de sedimentação calculada pela lei de Stokes (Equação 4.2) foi bastante similar àquela obtida experimentalmente, especialmente quando a granulação completa foi atingida durante a Fase II. Este resultado está relacionado à ausência de bactérias filamentosas que, como observado na Fase I, causam uma superestimação do diâmetro de partícula pela técnica de difração a laser. A análise de MEV foi realizada durante a transformação de pequenos flocos em grânulos e os resultados mostraram que a biomassa granular formada exibia uma estrutura densa e compacta, sem cavidades ou rachaduras (Figura 5.22), sugerindo que a introdução de uma fase de aclimatação previamente à etapa de seleção da biomassa granular foi favorável à formação de grânulos estáveis e de formato regular.

As concentrações de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) do reator obtidas ao longo da operação estão mostradas na Figura 5.21. Na fase de aclimatação, a concentração de biomassa sofreu uma diminuição nos primeiros dias, provavelmente em função da mudança de ambiente, de um reator em escala real alimentado com esgoto doméstico para um de bancada alimentado com efluente sintético. Após 40 dias de adaptação, a concentração de biomassa permaneceu próxima à obtida no início da Fase II, logo após a inoculação.

Durante a fase de seleção, observou-se uma tendência de diminuição da concentração de SST em função da redução gradual do tempo de sedimentação, sobretudo quando esse foi de apenas 3 min. Em seguida, uma vez atingida a granulação completa no dia 75, a concentração de SST aumentou gradualmente em função do acúmulo de biomassa granular no reator. A concentração de SST chegou a 20 g/L. (Figura 5.21). A relação SST/SSV média foi de aproximadamente 63 %.

Akker *et al.* (2015) observaram um aumento gradual da concentração de biomassa de 1,5 – 6,0 gSST/L nos primeiros 30 dias de operação do RBS de lodo granular. De acordo com De Kreuk *et al.* (2005b), a concentração de SST nos reatores granulares pode variar entre 0,88 a 16,2 gSST/L, sendo o valor médio usualmente obtido pelos pesquisadores igual a 6,8 gSST/L. Apesar de terem obtidos grânulos com diâmetros semelhantes ao do presente estudo, Ni *et al.* (2009) observaram menores concentrações de SST no reator (valores entre 8,0 e 10,0 gSST/L) após a formação dos grânulos. Liu *et al.* (2010b) também obtiveram elevadas concentrações de biomassa após o processo de granulação (valores acima de 10,0 gSST/L).

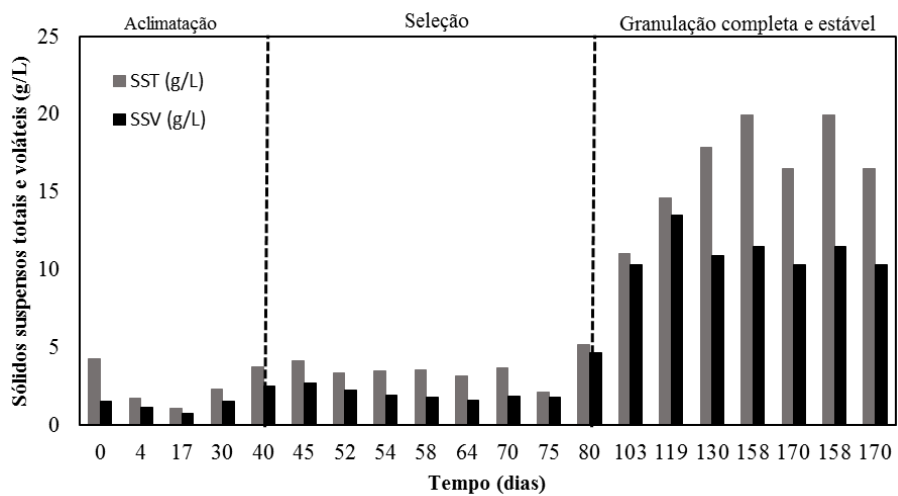


Figura 5.21: Sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) durante a operação do reator da Fase II.

Inóculo

Granulação completa e estável

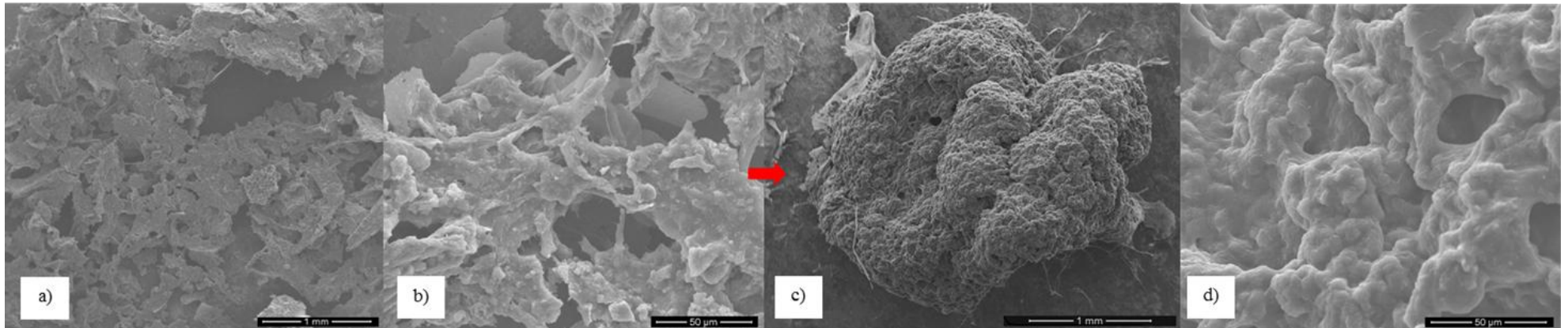


Figura 5.22: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da biomassa ao longo das diferentes fases de operação do reator: (a) e (b) inóculo usado para obtenção de grânulos; (c) aspecto exterior e (d) interior da biomassa granular formada (fase de granulação completa e estável).

5.2.3 Remoção de matéria orgânica e nutrientes

O desempenho do RBS em termos de remoção de matéria orgânica durante a Fase II está apresentado na Figura 5.23. A DQO na entrada no reator foi de aproximadamente 350 mg/L. Remoção completa de DQO foi alcançada apenas no fim do estágio de seleção, quando grânulos maduros estavam estabelecidos no interior do reator. A partir do balanço de massa para a DQO durante um ciclo de operação, observou-se que a maior parte da fração da matéria orgânica afluyente (80% em média) foi convertida durante o período de alimentação anaeróbia. Possivelmente essa conversão tenha sido realizada por PAO e GAO, uma vez que esses organismos, mesmo na ausência de aceptores de elétrons (oxigênio, nitrato ou nitrito), são capazes de armazenar a fonte de carbono externa (acetato) em PHA, utilizando-o posteriormente em condições de ausência de substrato externo. Por outro lado, a fase aerada contribuiu com a remoção de 15-20% da DQO afluyente.

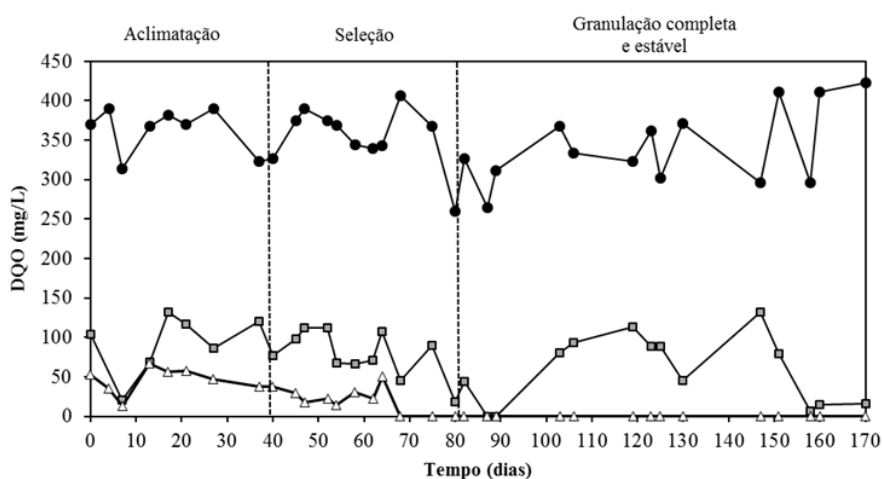


Figura 5.23: DQO no efluente (t0) (●), após a alimentação (t60) (■) e no efluente (t180) (Δ) durante a operação do reator na Fase II.

Os perfis de fosfato ao longo do tempo estão mostrados na Figura 5.24. No decorrer do estágio de aclimação, mas principalmente durante o estágio de seleção de grânulos, a quantidade de fosfato liberado no líquido na fase anaeróbia aumentou. Isso indica um aumento da atividade dos PAO. A quantidade média de fosfato liberado foi de 46 mgPO₄³⁻-P/L. Além disso, o consumo de fósforo durante o período aerado aumentou gradualmente a partir do início da fase de seleção (dia 40) até o dia 60.

A partir do balanço de massa para a DQO durante um ciclo de operação, observou-se que a maior parte da fração da matéria orgânica afluyente (80% em média) foi convertida durante o período de alimentação anaeróbia. Possivelmente essa conversão tenha sido realizada por PAO e GAO, uma vez que esses organismos, mesmo na ausência de aceptores de elétrons (oxigênio, nitrato ou nitrito), são capazes de armazenar a fonte de carbono externa (acetato) em PHA, utilizando-o posteriormente em condições de ausência de substrato externo. Por outro lado, a fase aerada contribuiu com a remoção de 15-20% da DQO afluyente.

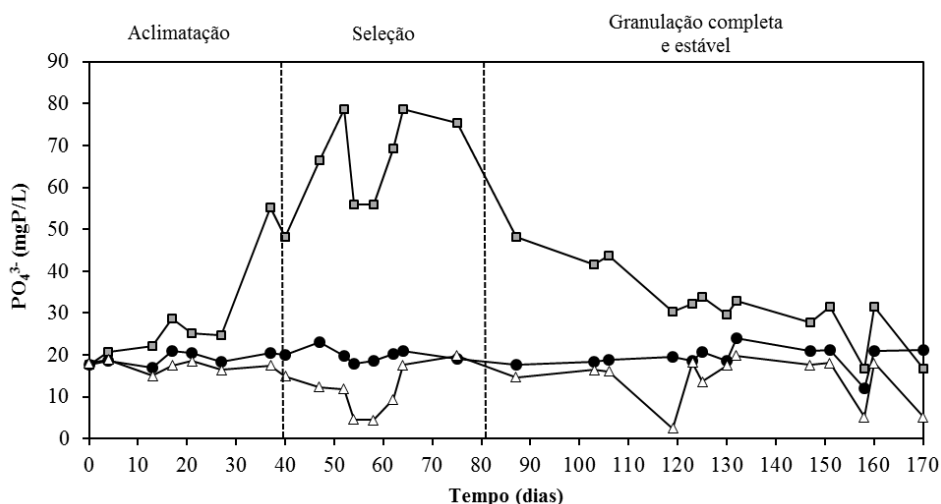


Figura 5.24: Concentrações de PO_4^{3-} -P no afluyente (t_0) (●), após regime anaeróbio (t_{60}) (■) e no efluyente (t_{180}) (Δ) durante a operação do reator na Fase II.

Apesar do baixo desempenho em termos de remoção de fosfato, o metabolismo característico do processo EBPR com liberação de fosfato anaeróbia foi observado durante a operação do RBS na Fase II. Como o PHB é o principal composto intracelular armazenado pelos PAO (MINO *et al.*, 1998 e MESQUITA *et al.*, 2013), sua quantidade na biomassa foi determinada ao longo da granulação aeróbia. A concentração de PHB representou aproximadamente 4,5% da massa seca da biomassa, resultado similar ao obtido por Bassin *et al.* (2012b).

A nitrificação e remoção total de nitrogênio foram também avaliadas ao longo da Fase II (Figura 5.25). A concentração de amônio após a fase de alimentação (em média 24 mg/L) foi menor que aquela do afluyente. Levando em consideração o teor de amônio afluyente e efluyente em um dado ciclo e a diluição do afluyente com o líquido

remanescente do ciclo anterior (troca de volume do RBS de 63%), a concentração teórica esperada após a fase de alimentação anaeróbia foi calculada. Em média, a concentração de amônio obtida foi 23% menor do que o esperado. Essa porcentagem se refere principalmente à adsorção de amônio pela biomassa granular, um fenômeno já investigado em estudos anteriores (BASSIN *et al.*, 2011). A quantidade de amônio adsorvido pela biomassa foi ainda maior (21% da amônia afluente) no estágio de granulação completa, onde a biomassa consistia principalmente de lodo granular.

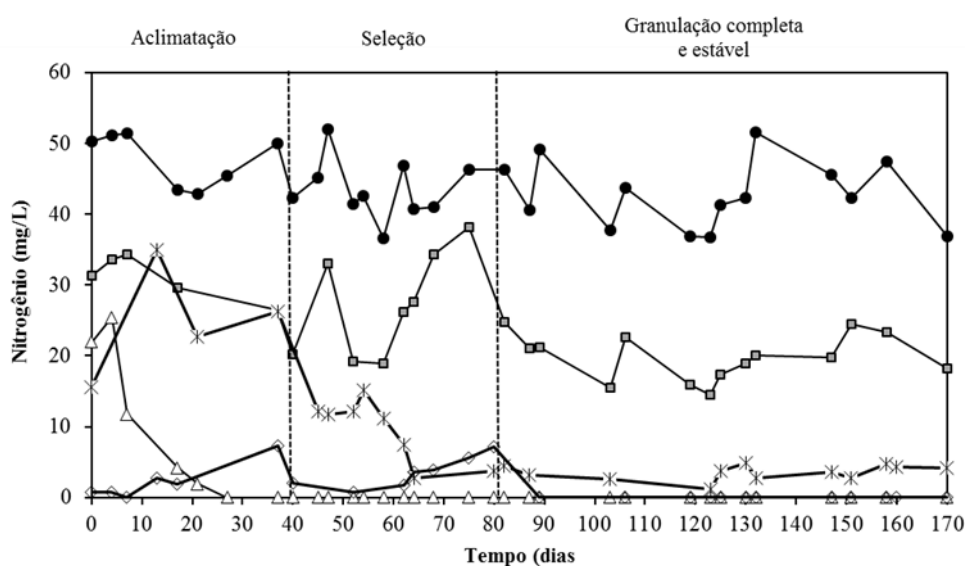


Figura 5.25: Concentrações de amônio no afluente (t_0) (●), após o regime anaeróbio de alimentação (t_{60}) (■) e no efluente (t_{180}) (Δ), nitrato (◇) e nitrito (✕) durante a operação do reator na Fase II.

A capacidade média de adsorção de amônio da biomassa granular foi de 1,4 $\text{mgNH}_4^+\text{-N/gVSS}$ em uma concentração de equilíbrio de amônio de 24 $\text{mgNH}_4^+\text{-N/L}$ (valor médio de várias determinações da concentração de amônio após a fase anaeróbia). Essa capacidade de adsorção está de acordo com aquela reportada na literatura (BASSIN *et al.*, 2011). O amônio adsorvido durante a alimentação anaeróbia é desorvido durante a fase aerada e se torna disponível para nitrificação.

Apenas durante os primeiros 20 dias de operação do reator, durante o estágio de aclimação, amônio residual foi detectado no efluente do RBS. Durante esse período, a remoção de amônio aumentou de 56 para 95%. Nitrificação completa foi obtida ainda antes da fase de seleção de grânulos (dia 40). Esse desempenho foi obtido até o fim da Fase II. A concentração de compostos nitrogenados oxidados (NO_2^- e NO_3^-) no efluente

do RBS declinou gradualmente entre os estágios de aclimação e seleção, período no qual se formaram os primeiros grânulos (Figura 5.25). Como o diâmetro médio da biomassa granular aumentou durante a fase de seleção de grânulos, a remoção de nitrogênio apresentou um aumento acentuado de 65 para cerca de 95% (Figura 5.26). Ao alcançar granulação completa no SBR, o tamanho dos grânulos continuou a aumentar, mas apenas um leve aumento na redução de nitrogênio foi observado.

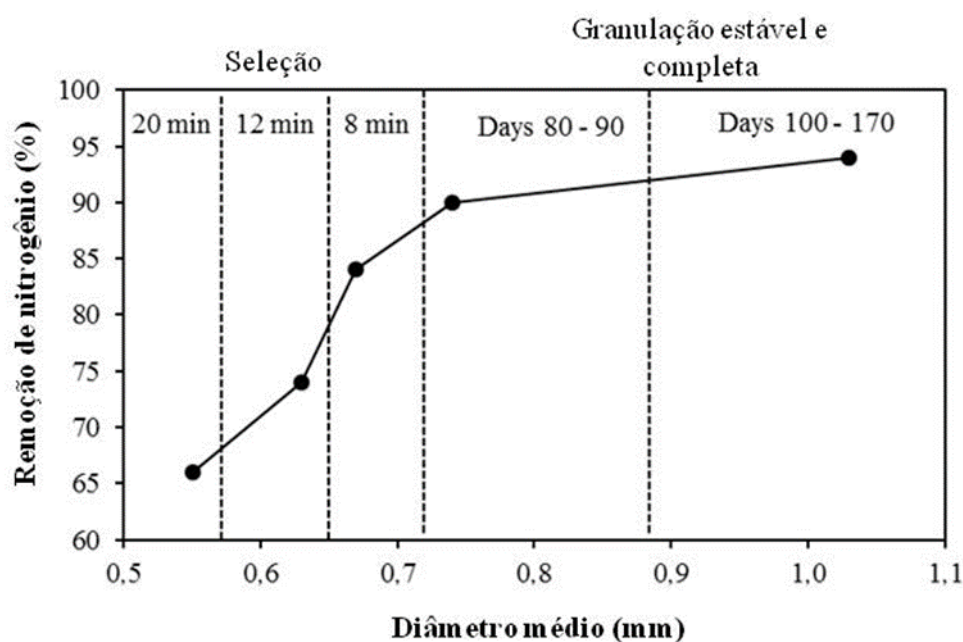


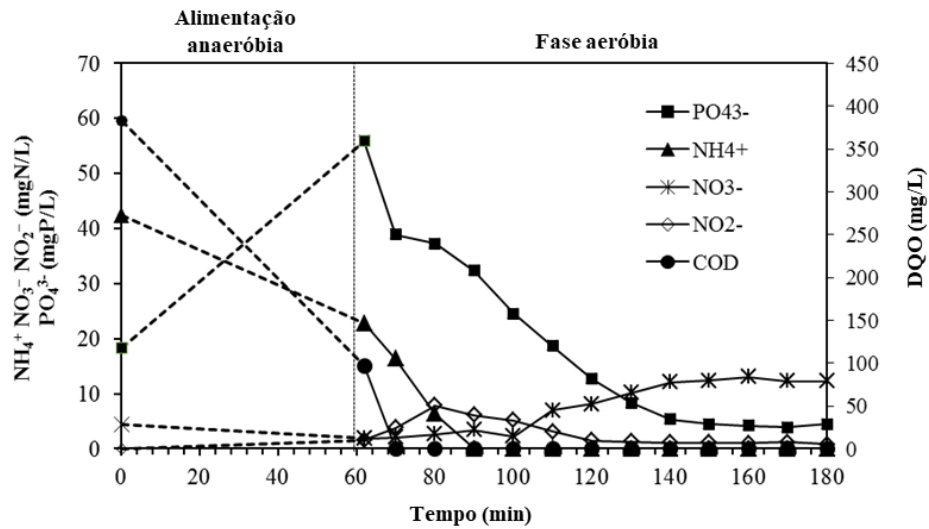
Figura 5.26: Relação entre o diâmetro médio da biomassa granular (mm) e a eficiência de remoção de nitrogênio (%). Os dados apresentados referem-se à fase de seleção (20, 12 e 8 minutos de tempo de assentamento) e durante o estágio de granulação (dias 80 a 90 e dias 100-170).

5.2.4 Testes de ciclo

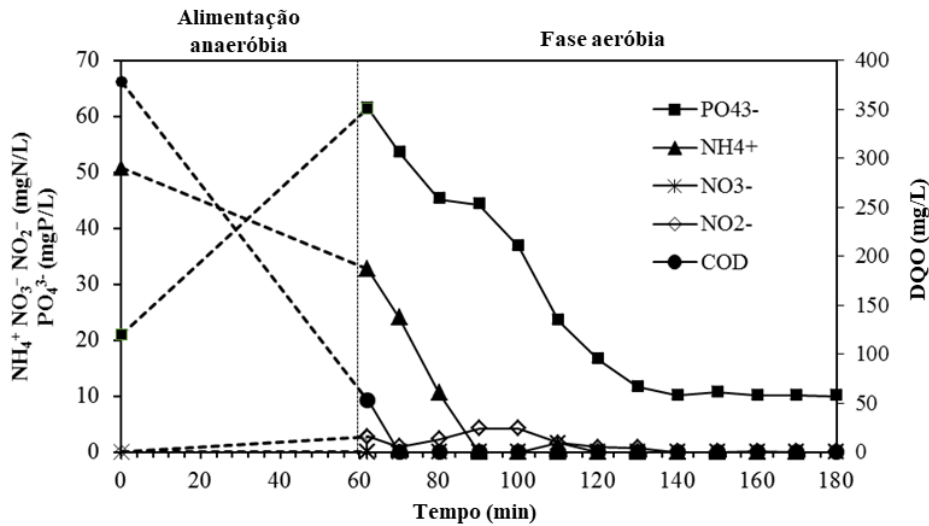
Para acompanhar a dinâmica de DQO, nitrogênio e fósforo ao longo do ciclo operacional do RBS, testes de ciclo foram realizados na Fase II, particularmente na etapa de seleção de grânulos e de granulação completa. Como já relatado na seção 5.2.3, uma grande fração (~ 80%) da matéria orgânica afluenta (na forma de acetato) foi convertida na fase de alimentação anaeróbia e apenas uma pequena quantidade de DQO esteve disponível durante a aeração. Os resultados estão mostrados na Figura 5.27.

Durante o estágio de seleção de grânulos, durante o qual a biomassa granular foi formada a partir de lodo floculento, liberação substancial de fosfato foi observada em condições anaeróbias (Figura 5.27). Esse resultado esteve diretamente associado ao consumo de acetato e sua conversão em polímeros intracelulares (PHA) por PAO. No entanto, fosfato residual sempre foi detectado no efluente. Quando a granulação completa foi alcançada, o consumo anaeróbio de DQO manteve-se alto, indicando o armazenamento de PHA. No entanto, a liberação anaeróbia de fosfato e a absorção de fosfato na fase aerada diminuíram drasticamente (Figura 5.27). A absorção máxima de fosfato observada no estágio de seleção foi de cerca de 15 e 17 $\text{mgPO}_4^{3-}\text{-P}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$ nos ciclos com tempo de decantação de 30 e 20 minutos, respectivamente. Esta taxa foi substancialmente reduzida para 1,5 $\text{mgPO}_4^{3-}\text{-P}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$ quando o processo de granulação foi finalizado.

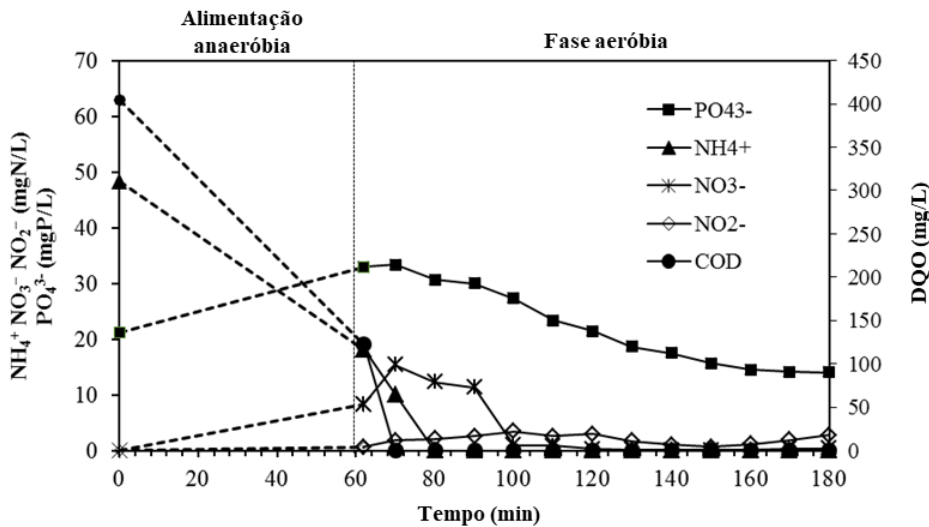
Em relação ao processo de nitrificação, observou-se que o amônio foi completamente removido em menos de 30 minutos ao longo da fase de aeração no estágio de seleção de grânulos (Figura 5.27a). A oxidação do amônio prosseguiu ainda mais rapidamente no estágio com lodo totalmente granulado (dentro de 20 min de aeração). No entanto, a quantidade de SST também foi maior nesta fase. Assim, as taxas específicas de nitrificação foram calculadas para todos os testes de ciclo e os seguintes resultados foram obtidos: 9,4, 13,9 e 6,1 $\text{mgNH}_4\text{-N}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$ para o estágio de seleção de biomassa granular (tempos de sedimentação de 30 e 20 min) e estágio de granulação completa (3 minutos de decantação), respectivamente. Observa-se que a taxa específica de nitrificação aumentou ao longo da fase de seleção de grânulos, o que provavelmente se deve ao enriquecimento da biomassa com nitrificantes. No entanto, assim que os grânulos atingiram diâmetros maiores (dentro do estágio de granulação completo), a atividade específica de oxidação de amônio diminuiu.



(a) Fase de seleção – Tempo de sedimentação de 30 min.



(b) Fase de seleção – Tempo de sedimentação de 20 min



(c) Fase de granulação completa – Tempo de sedimentação de 3 min

Figura 5.27: Testes de ciclo referentes à operação do reator na Fase II.

O acúmulo contínuo de nitrato na fase aerada só foi observado durante o estágio de seleção de grânulos, particularmente quando o tempo de sedimentação foi de 30 min (Figura 5.27a). Embora o acúmulo de nitrato também tenha sido observado no estágio completo de granulação, sua concentração foi reduzida para menos de 0,3 mg/L ao longo da fase de aeração. Um pequeno acúmulo de nitrito também foi observado em todos os testes de ciclo, mas apenas no início do período de aeração. Embora não tenha afetado a oxidação de amônio, a absorção de fosfato foi influenciada negativamente pelo acúmulo de nitrito nos primeiros 20-30 minutos de aeração.

O fato de que a formação de nitrato e nitrito não ocorreu proporcionalmente à oxidação de amônio na fase aerada indica que camadas anóxicas foram estabelecidas dentro dos grânulos, permitindo a ocorrência de nitrificação e desnitrificação simultânea (SND). Esse processo é característico de sistemas de lodo granular (Yan *et al.*, 2016). Como resultado, o substrato armazenado intracelularmente pelos PAO ou GAO funcionaram como doadores de elétrons para desnitrificação, como observado em estudos anteriores (Bassin *et al.*, 2012b). A taxa de desnitrificação observada nos testes de ciclo realizados no estágio de seleção de biomassa granular (tempos de sedimentação de 30 e 20 min) e estágio de granulação completa (tempo de sedimentação de 3 min) foi de, respectivamente, 7,8, 13,5 e 5,8 mgNO_x⁻-N/(gVSS·h).

Levando em conta a concentração de nitrogênio total no afluente e efluente, observou-se que a remoção desse nutriente foi de 43% na etapa de seleção com 30 min de decantação e acima de 95% nas etapas de seleção com 20 min de decantação e de completa granulação aeróbia. Portanto, à medida que os grânulos aumentaram de tamanho, a remoção total de nitrogênio começou a melhorar, provavelmente em função do aumento da zona anóxica, que intensificou o potencial de desnitrificação (DE KREUK *et al.*, 2007;. DE KREUK *et al.*, 2005). AKKER *et al.* 2015 também verificaram esse aumento, reportando valores de remoção de nitrogênio total de 85% após 120 dias de operação do RBS de lodo granular.

5.3 Desafios enfrentados durante o processo de granulação aeróbia: relacionando estratégias operacionais às características da biomassa granular formada

A granulação aeróbia foi o assunto de muitas investigações nos últimos anos. Na maioria dos estudos focados no desenvolvimento de biomassa granular a partir de flocos de lodo ativado, o inóculo foi obtido a partir de plantas de tratamento de águas residuárias com remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo (MORGENROTH *et al.*, 1997; BEUN *et al.*, 1999; DE KREUK *et al.*, 2005; KISHIDA *et al.*, 2009; PRONK *et al.*, 2015A). Isso parece óbvio, uma vez que uma das principais características do lodo granular aeróbio é a sua capacidade de remover DQO e nutrientes em um único reator, devido às diferentes zonas redox estabelecidas ao longo de sua estrutura.

Neste estudo, contudo, o objetivo foi avaliar o desenvolvimento de biomassa granular aeróbia utilizando como inóculo lodo ativado proveniente de uma planta municipal de tratamento de esgoto, projetada apenas para a remoção de matéria orgânica. Essa é a realidade de muitas plantas de tratamento de águas residuárias em países em desenvolvimento, nos quais a remoção de nutrientes muitas vezes não é obrigatória (VON SPERLING, 2008). Como observado em estudos anteriores (BEUN *et al.*, 1999; DE KREUK *et al.*, 2005), os resultados da Fase I mostraram que, ao se reduzir gradualmente o tempo destinado para a sedimentação de biomassa de 20 para 3 minutos no ciclo do RBS, pequenos flocos foram arrastados enquanto partículas de rápida sedimentação foram selecionadas, permitindo o estabelecimento de grânulos maduros no sistema. Entretanto, os grânulos formados apresentaram quantidade significativa de filamentos e, em poucos dias, a biomassa granular não apresentava mais forma arredondada nem estrutura uniforme, adquirindo uma consistência pastosa.

Foi reportado na literatura que baixos níveis de bactérias filamentosas auxiliam nos estágios iniciais de granulação aeróbia, dando suporte à formação de aglomerados maiores (LIU e LIU, 2006). Akker *et al.* (2015) observou a transformação bem sucedida de partículas de lodo pobremente sedimentáveis em aglomerados de rápida sedimentação após 3 semanas de partida do reator. Esses autores reportaram que o IVL reduziu acentuadamente de 240 para 60 mL/g nesse período, de maneira similar ao que foi observado neste estudo. Apesar disso, foi observado o crescimento excessivo de organismos filamentosos ao redor dos grânulos deteriorando o IVL e levando ao

intumescimento do lodo (*bulking*) e lavagem de biomassa do reator. De modo similar, Mosquera-Corral *et al.* (2005) reportou a proliferação de filamentos no interior dos grânulos, levando à instabilidade e à formação de grânulos com estruturas irregulares. No trabalho realizado por Weissbrodt *et al.* (2012), sugeriu-se que lodo obtido a partir de uma planta de tratamento com remoção de nutrientes deveria ser utilizado como inóculo para se obter granulação aeróbia, uma vez que apresentam menor potencial de aglomeração de filamentos do que aqueles provenientes de reatores projetados apenas para remoção de matéria orgânica (como no caso deste estudo).

Os fatores responsáveis pela proliferação de bactérias filamentosas no lodo granular aeróbio foi o objeto de um estudo aprofundado conduzido por Figueroa *et al.* (2015). Os autores observaram que não apenas o inóculo e o tipo de água residuária, mas particularmente as condições de operação do reator, eram responsáveis pelo estabelecimento e desenvolvimento de bactérias filamentosas, que são frequentemente encontradas em sistemas de lodo granular (FIGUEROA *et al.*, 2015). Levando em consideração as evidências reportadas na literatura e os resultados de análises físico-químicas realizadas nessa pesquisa, suspeita-se que a granulação mal sucedida está relacionada a comunidade microbiana do inóculo do lodo, e, portanto, às conversões (aeróbias e anaeróbias) de substrato realizadas no interior do reator. Na Fase I, a remoção de DQO na fase anaeróbia foi consideravelmente baixa, e por conta disso, o aporte de matéria orgânica na fase de aeração foi elevado. A maior fração da DQO afluente (~80%) foi removida aerobicamente. Logo, a competição entre bactérias heterotróficas e nitrificantes por espaço e oxigênio foi intensificada. Além disso, arraste substancial de lodo e conseqüente queda no tempo de retenção de sólidos ocorreram durante a fase de desgranulação, dificultando o crescimento o desenvolvimento de bactérias nitrificantes de crescimento lento, e, conseqüentemente, levando a baixos percentuais de remoção de amônio (<50%).

Quando oxigênio é utilizado com aceptor de elétrons para remoção de matéria orgânica, é esperada a predominância de organismos heterotróficos de crescimento rápido. A proliferação desses organismos frequentemente resulta na instabilidade dos grânulos aeróbios (DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004; OEHMEN *et al.*, 2007). Além disso, como o substrato é consumido na fase aerada, especialmente nas camadas mais externas dos grânulos, onde oxigênio está presente, gradientes de substrato e oxigênio no interior da biomassa granular são intensificados devido a limitações

difusionais (PRONK *et al.*, 2015a; FIGUEROA *et al.*, 2015). Com o rápido consumo de compostos facilmente biodegradáveis nas zonas externas dos grânulos, o crescimento de estruturas filamentosas capazes de causar rápida deterioração da biomassa granular são estimulados (DE KREUK *et al.*, 2010). Ademais, os grânulos formados são mais suscetíveis à quebra por forças de cisalhamento, uma vez que as zonas internas estarão privadas de substrato e conseqüentemente tornam-se inativas, enfraquecendo a estrutura granular (BEUN *et al.*, 2002). Sob essas condições, a obtenção de granulação estável é improvável.

Como observado em estudos anteriores, a estabilidade do lodo granular é melhorada quando bactérias de crescimento lento são preferencialmente selecionadas e o desenvolvimento de organismos heterotróficos de crescimento rápido em ambiente aeróbio é minimizado (PRONK *et al.*, 2015a; DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004; OEHMEN *et al.*, 2007). Para obter baixas taxas de crescimento quando o afluente contém DQO facilmente biodegradável (acetato), o substrato externo deve ser primeiramente convertido em compostos intracelulares de degradação lenta (PHA e glicogênio) sob condições anaeróbias, podendo então ser utilizados para o crescimento bacteriano sob condições aeróbias/anóxicas subsequentes, quando o substrato externo não estiver mais disponível (DE KREUK *et al.*, 2004). Essa conversão é eficientemente realizada por dois diferentes grupos microbianos presentes nos processos de tratamento de águas residuárias: PAO e GAO. Comparados a outros heterotróficos comuns, esses organismos apresentam uma taxa de crescimento bastante reduzida, comparável até mesmo com a de nitrificantes de crescimento lento (BRDJANOVIC *et al.*, 1998; LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2009). Além disso, foi reportado que um curto período de abundância de substrato seguida por um longo período de ausência de substrato orgânico seleciona bactérias que tendem a formar agregados e limita o crescimento de organismos filamentosos (DE KREUK e VAN LOOSDRECHT, 2004; MCSWAIN *et al.*, 2004). A implementação de um regime que alterne fases com ausência e presença de substrato também permite o desenvolvimento de organismos que armazenam rapidamente a matéria orgânica afluente na forma de polímeros intracelulares (FIGUEROA *et al.*, 2015).

Levando em consideração essas informações, o reator foi submetido à alimentação em fluxo ascendente através do leito de lodo sedimentado, em condições anaeróbias, de modo a favorecer o contato entre a biomassa e o substrato e

consequentemente, maximizar a conversão de DQO rapidamente biodegradável em polímeros intracelulares. No entanto, como o inóculo foi obtido de uma planta de tratamento de esgoto destinada apenas à remoção de matéria carbonácea, a presença de PAO e GAO não era esperada. Na realidade, as usuais conversões de EBPR (liberação e consumo de fosfato sob condições anaeróbias e aeróbias, respectivamente) não foram observadas. Mesmo com o regime anaeróbio-aeróbio ao qual o RBS foi submetido, a atividade de PAO não foi observada no sistema. De maneira similar, a atividade de GAO pode também ser negligenciada, uma vez que a conversão de DQO em polímeros intracelulares durante a fase de alimentação anaeróbia (quando nenhum receptor de elétrons estava presente) foi muito baixa (~20%). Isso levou a uma longa fase de abundância de substrato, estimulando o crescimento de estruturas filamentosas. Além disso, a remoção de amônio no decorrer do experimento foi bastante pequena, indicando baixa capacidade de nitrificação. Nesse contexto, a predominância de bactérias heterotróficas de rápido crescimento sobre os organismos de lento crescimento (PAO, GAO e nitrificantes) levou ao crescimento de filamentosos e à desgranulação.

Apesar dos PAO terem se estabelecido no lodo granular desenvolvido por Akker *et al.* (2015), a carga de substrato aplicada excedeu a capacidade de armazenamento anaeróbia desses organismos. Isso resultou na disponibilidade de substrato externo na fase aerada, favorecendo o crescimento de organismos filamentosos de rápido crescimento. Os autores então decidiram aplicar uma menor carga orgânica de modo a que a DQO afluyente fosse convertida o máximo possível durante a alimentação anaeróbia, minimizando a DQO que adentrava o estágio aerado e evitando o crescimento excessivo de filamentos (AKKER *et al.*, 2015). Nesse estudo, contudo, a atividade dos organismos capazes de armazenar DQO sob condições anaeróbias não foi detectada no inóculo do lodo. Por conta disso, para favorecer o crescimento de organismos de crescimento lento buscando obter grânulos estáveis, uma nova estratégia de operação foi implementada (Fase II). Antes de realizar a seleção dos flocos de lodo maiores com vistas à granulação, o que é comumente a primeira etapa em um RBS para formação de grânulos, o inóculo foi submetido a um estágio de pré-adaptação no intuito de estimular o desenvolvimento de PAO e nitrificantes. Durante o estágio de aclimação, que durou 40 dias, o tempo de sedimentação foi mantido elevado (40 minutos) para prevenir o arraste do lodo. Diferentemente do observado na Fase I, ao empregar essas condições de operação, a maior parte da DQO afluyente (na forma de

acetato) foi convertida durante a fase de alimentação anaeróbia, possivelmente devido à atividade de PAO e/ou GAO. Concomitantemente, liberação anaeróbia de fosfato e consumo aeróbio de fosfato por PAO começaram a ser observados. Ao permitir conversão quase completa do substrato orgânico sob condições anaeróbias, um regime alternado de presença e ausência de substrato foi imposta ao biorreator, suprimindo o desenvolvimento de estruturas filamentosas. Além disso, com a reduzida carga orgânica na fase aerada, foi atingida remoção completa de amônio, sugerindo o enriquecimento do lodo com nitrificantes. Uma vez que o estágio de aclimatação foi completado, o tempo de sedimentação foi gradualmente reduzido e os primeiros grânulos foram formados. Ao limitar os heterótrofos de crescimento rápido, obteve-se uma biomassa granular estável, de formato regular, com rápida sedimentação e sem filamentos. A comparação entre os processos de granulação observados nas duas estratégias operacionais (Fase I e Fase II) está ilustrada na Figura 5.28.

Baseando-se nos resultados desse estudo e em dados previamente reportados (PRONK *et al.*, 2015a), uma representação esquemática do processo de granulação nas Fases I e II, apontando as conversões de substrato sob condições anaeróbias e aeróbias e seus efeitos na morfologia da biomassa granular, é apresentada na Figura 5.29.



Figura 5.28: Evolução da estrutura granular ao longo da operação do reator: a) Fase I e b) Fase II.

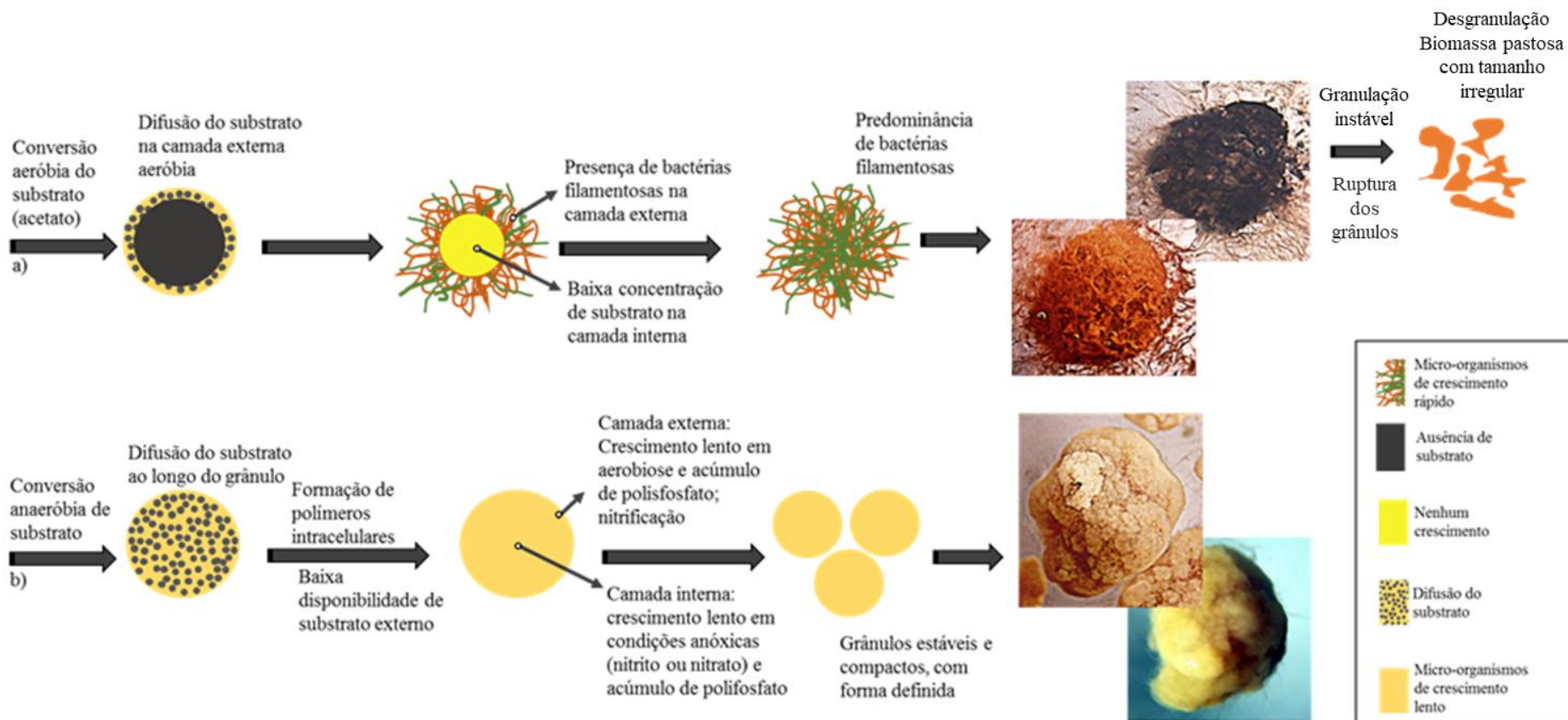


Figura 5.29: Morfologia dos grânulos aeróbios e sua relação com o perfil de consumo de substrato (matéria orgânica) na fase anaeróbia/aeróbia.

5.4 Remoção de nutrientes por biomassa granular em condições de clima tropical: desafios e vantagens

A remoção biológica de fosfato depende da atividade de PAO, selecionados submetendo-se a biomassa às condições aeróbias/anóxicas alternadas. Esses organismos são capazes de acumular polifosfato em níveis superiores àqueles requeridos para satisfazer o anabolismo bacteriano (WENTZEL *et al.*, 2008). Desse modo, fosfato pode ser removido do sistema a partir da retirada de lodo excedente rico em fósforo. A conversão da matéria orgânica por PAO em ambiente anaeróbio está diretamente associada à liberação de fosfato e acúmulo de PHA (MINO *et al.* 1998), como observado apenas na Fase II. Para estimar a quantidade de matéria orgânica (em termos de DQO) consumida por PAO durante a fase de alimentação anaeróbia, a razão entre a liberação de fosfato e consumo de DQO foi calculada. Espera-se que o valor desta razão seja de cerca de 0,5 P-mol/C-mol para uma cultura altamente enriquecida em PAO. Por outro lado, para uma cultura microbiana consistindo apenas em GAO, essa relação deve ser nula (BRDJANOVIC *et al.*, 1997). Nesse estudo, a maior razão entre a liberação de P/consumo de DQO foi de 0,34 P-mol/C-mol, valor obtido durante a fase de seleção de grânulos. Isso implica que a quantidade teórica máxima de matéria carbonácea afluente consumida pelos PAO em ambiente anaeróbio foi próxima a 70%. No entanto, as transformações características de EBPR (isto é, liberação e absorção de fosfato em condições anaeróbias e aeróbias, respectivamente) foram muito instáveis ao longo da operação do reator. Embora o tempo de retenção de sólidos tenha sido mantido em cerca de 30 dias a partir da etapa de granulação completa da biomassa na Fase II, a remoção média de fosfato foi de apenas 30%. Esse desempenho é menor que o relatado em estudos anteriores envolvendo sistemas de lodo granular aeróbio (DE KREUK *et al.*, 2005; BASSIN *et al.*, 2012b; PRONK *et al.*, 2014). Além disso, quando a biomassa do reator se tornou totalmente granulada, a razão entre liberação de fósforo e o consumo de DQO foi de apenas 0,15 P-mol/C-mol, indicando que menos de 30% da DQO afluente foi consumida por PAO.

Dados os resultados obtidos, possivelmente ocorreu uma competição entre PAO e GAO pela DQO afluente, com os GAO sendo favorecidos pelas condições de operação do reator. Tal constatação será melhor discutida no item 5.5, na análise da comunidade microbiana. Suspeita-se que a temperatura tenha influenciado diretamente

essa competição e conseqüentemente o desempenho de remoção de fósforo, uma vez que essa era a única variável durante o experimento. Do fim da fase de seleção de grânulos até o início do estágio de granulação completa, a temperatura ambiente subiu de 27 para 32°C como resultado de uma mudança de estação (de primavera para verão). Estudos prévios reportaram que a remoção de fósforo pode ser prejudicada em altas temperaturas, sob as quais GAO são favorecidos (LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2009; BASSIN *et al.*, 2012b). Similarmente aos PAO, esses organismos são também capazes de armazenar DQO como PHA na ausência de receptores externos de elétrons. No entanto, eles não liberam ou consomem fosfato, e, portanto, não contribuem para a remoção de fósforo do sistema. Ao contrário, eles competem com os PAO pelo substrato orgânico aflúente (BASSIN *et al.*, 2012b). Como a remoção anaeróbia de DQO permaneceu razoavelmente constante durante todo o processo de granulação, sugere-se que os GAO foram os principais organismos a converter anaerobicamente a matéria orgânica em polímeros intracelulares. Dificuldades em obter elevada remoção biológica de fósforo em sistemas de lodo granular aeróbio em condições anaeróbias-aeróbias alternadas foram também reportadas por Thwaites *et al.* (2017), os quais atribuíram a baixa remoção de fosfato (<20%) à predominância de GAO na comunidade microbiana. Logo, a remoção biológica de fósforo pode ser considerada um desafio em sistemas de lodo granular aeróbio em países tropicais.

Em relação à nitrificação, os resultados obtidos na Fase I sugerem que organismos nitrificantes de crescimento lento foram possivelmente superados por heterotróficos devido à presença de DQO externa no período aerado, resultando em um baixo desempenho de nitrificação. Nesse contexto, a pré-adaptação do lodo de inóculo oriundo da planta de tratamento destinada apenas à remoção de DQO e com baixa capacidade de nitrificação foi de extrema importância. O estágio de aclimação permitiu que a maior parte da DQO fosse convertida durante a alimentação anaeróbia, favorecendo a nitrificação na fase aeróbia subsequente. Conseqüentemente, amônio foi removido rapidamente na fase aerada, com taxas superiores a 14 mgNH₄-N/(gSSV.h). Além disso, foi observado que, se o lodo não for enriquecido com nitrificantes antes do estágio de seleção de grânulos (tal como ocorrido na Fase I), é pouco provável que a nitrificação melhore mais adiante, especialmente sob as condições de arraste de lodo comumente empregadas durante a granulação aeróbia.

Neste estudo, a eficiência de remoção de nitrogênio foi positivamente relacionada ao diâmetro médio dos grânulos presentes no interior do reator ao longo dos diferentes estágios de granulação. Grânulos maiores apresentam uma zona anóxica maior, o que favorece a desnitrificação (De KREUK e Van LOOSDRECHT, 2005; CYDZIK-KWIATKOWSKA *et al.*, 2014). Por outro lado, uma vez que partículas maiores se estabeleceram no RBS durante a fase de granulação completa, a taxa específica máxima de nitrificação diminuiu. Esse resultado pode estar relacionado à redução da zona aeróbia dos grânulos (CYDZIK-KWIATKOWSKA *et al.*, 2014) e, por conseguinte, à fração volumétrica dos grânulos que está disponível para a nitrificação (BASSIN *et al.*, 2012b).

5.5 Análise da comunidade microbiana

5.5.1 Caracterização dos perfis bacterianos das Fases I e II

Para investigar a diversidade bacteriana no reator nas Fases I e II, sequências do gene 16S rRNA foram amplificadas por PCR a partir do DNA extraído de diversas amostras de biomassa (lodo de inóculo e biomassa granular em diferentes estágios de operação do reator). As sequências nucleotídicas foram, em seguida, reveladas por pirosequenciamento dos produtos de PCR. Leituras de sequências de baixa qualidade ou tamanho inadequado não foram consideradas na análise, de modo que em torno de 17500 - 45000 leituras satisfatórias foram obtidas a partir do DNA genômico, dependendo da amostra (Tabela 5.1). Como mostrado na Figura 5.30, as curvas de rarefação para todas amostras analisadas se aproximaram da saturação, assegurando que o sequenciamento cobriu a grande maioria da comunidade bacteriana do reator.

A riqueza e diversidade de bactérias no reator em diferentes fases operacionais foram avaliadas com base no número unidades taxonômicas operacionais (UTOs), estimador de riqueza baseado em abundância (índice Chao1) e índices de diversidade de Shannon e Simpson (Tabela 5.1). O número de UTOs foi maior nas amostras de inóculo (lodo floculento) de cada fase operacional em comparação com a biomassa granulada correspondente. Na Fase I, o número de UTOs após a granulação diminuiu cerca de 50% em comparação com o lodo de inóculo. Um comportamento semelhante foi observado na Fase II, para a qual o número de UTOs na amostra do inóculo atingiu 824,

enquanto que para os primeiros grânulos formados e grânulos maduros correspondeu a 480 e 696, respectivamente.

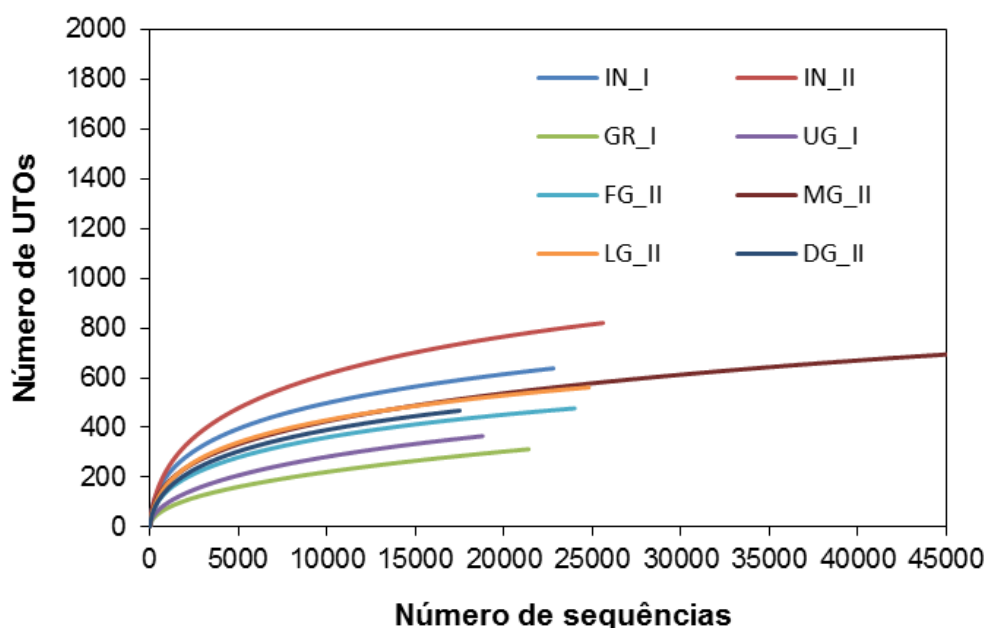


Figura 5.30: Curvas de rarefação para todas as amostras analisadas.

Tabela 5.1: Índices de diversidade α das amostras do reator em diferentes estágios da operação.

Fase	Amostras	Índices de riqueza			Índices de diversidade	
		Número de seqüências	Número de UTOs ^a	Chao I	Shannon (H)	Simpson (D)
Fase I	IN_I	22923	639	853,3	4,838	0,9847
	GR_I	21554	314	543,5	2,932	0,9018
	UG_I	18989	369	541,6	2,931	0,8407
	IN_II	25846	824	1039	4,861	0,9801
Fase II	FG_II	24136	480	639,2	4,111	0,9659
	MG_II	45456	696	911,5	4,424	0,9644
	LG_II	24910	563	692,5	4,211	0,9623
	DG_II	17632	469	604,2	4,000	0,9486

^a Nível de corte de 5%

O índice Chao1 para as amostras de lodo de inóculo em ambas as fases também foi maior do que para a biomassa granular, confirmando que as mesmas apresentaram maior riqueza bacteriana. No que diz respeito à diversidade α , as amostras de inóculo também apresentaram maior diversidade, uma vez que os índices de Shannon correspondentes foram os mais elevados (cerca de 4,8). Da mesma forma, essas amostras também apresentaram maiores valores para o índice de Simpson, indicando que o nível de dominância na comunidade bacteriana foi menor.

5.5.2 Perfis bacterianos em nível do filo

A abundância relativa da comunidade bacteriana em nível de filo é mostrada na Figura 5.31. Filos menos representativos foram agrupados em uma categoria denominada "Outros". A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que a diversidade bacteriana do inóculo foi maior do que a das outras amostras. Quando as amostras de lodo de inóculo utilizadas nas Fases I e II (IN_I e IN_II, respectivamente) são comparadas, observa-se perfis ligeiramente diferentes. Isso era esperado, uma vez que, embora oriundo da mesma planta de tratamento de esgoto sanitário, o lodo de inóculo utilizado nas duas fases de operação foi coletado em tempos diferentes. Em ambas as amostras do inóculo, observou-se uma distribuição mais equitativa entre os diferentes filos. Muitos filos foram detectados nessas duas amostras, sendo os mais dominantes: Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes e Firmicutes. As proporções relativas variaram ligeiramente dependendo da amostra de inóculo (Fase I e II). As principais diferenças foram observadas para Actinobacteria e Bacteroidetes. O primeiro filo foi mais abundante no inóculo da Fase I, enquanto a importância relativa do segundo foi maior no inóculo da Fase II. Nenhum filo não classificado foi detectado na análise.

Apesar das semelhanças entre o lodo de inóculo das diferentes fases operacionais, a atribuição taxonômica das sequências de DNA revelou perfis bem diferentes ao longo do processo de granulação. Proteobacteria foi o filo mais dominante em todas as amostras, embora sua proporção relativa tenha variado dependendo do estágio operacional. Na Fase I, as proteobactérias representaram 33% das sequências do lodo de inóculo (IN_I). Quando a biomassa se tornou totalmente granulada (GR_I), este filo tornou-se ainda mais abundante e correspondeu a cerca de 80% da comunidade bacteriana total. A importância relativa das proteobactérias permaneceu relativamente

constante no estágio de granulação instável (UG_I). Quando a granulação completa foi alcançada na Fase I, a comunidade de bactérias tornou-se dominada por poucos filos. Portanto, muitos filos detectados em alta frequência no inóculo estiveram presentes em pequenas quantidades nos grânulos formados. Este é o caso de Actinobacteria, cuja porcentagem relativa à comunidade geral caiu de 18% para 5% quando ocorreu granulação. No estágio de granulação instável, esse filo particular tornou-se ainda menos importante no perfil bacteriano. Chloroflexi e Acidobacteria são dois filos abundantemente presentes no lodo de inóculo (IN_I), mas detectados em quantidade bastante reduzida na biomassa granular (GR_I e UG_I). A frequência de Planctomycetes aumentou ligeiramente de 8 a 10% com a granulação de lodo, mas praticamente diminuiu para níveis não detectáveis (~ 0,1%) quando apareceram grânulos instáveis. Por sua vez, a frequência relativa de Bacteroidetes na comunidade microbiana diminuiu desde o início de operação reator (lodo de inóculo) até o estágio de biomassa totalmente granulada (GR_I), mas posteriormente aumentou novamente nos grânulos instáveis (UG_I). Na última condição, eles representaram cerca de 11% de todas as leituras de DNA.

Conforme observado na Fase I, o filo Proteobacteria também se tornou mais abundante quando o lodo floculento (IN_II) foi transformado em biomassa granular na Fase II. De fato, a frequência relativa desse filo aumentou dos primeiros grânulos formados (FG_II) para os grânulos maduros (MG_II). Nesse último estágio, as proteobactérias representavam 66% de todas as leituras. No entanto, uma distribuição mais uniforme dos diferentes filos foi observada na Fase II em comparação com a Fase I, na qual a frequência de Proteobacteria atingiu 80% das leituras totais. A abundância de Actinobacteria, Chloroflexi e Acidobacteria diminuiu substancialmente do lodo de inóculo para os grânulos maduros. Por outro lado, a porcentagem de Bacteroidetes tendeu a aumentar ao longo do processo de granulação. A porcentagem relativa dos filos remanescentes não variou muito entre o período de partida (IN_II) e o estágio de biomassa granular madura (MG_II).

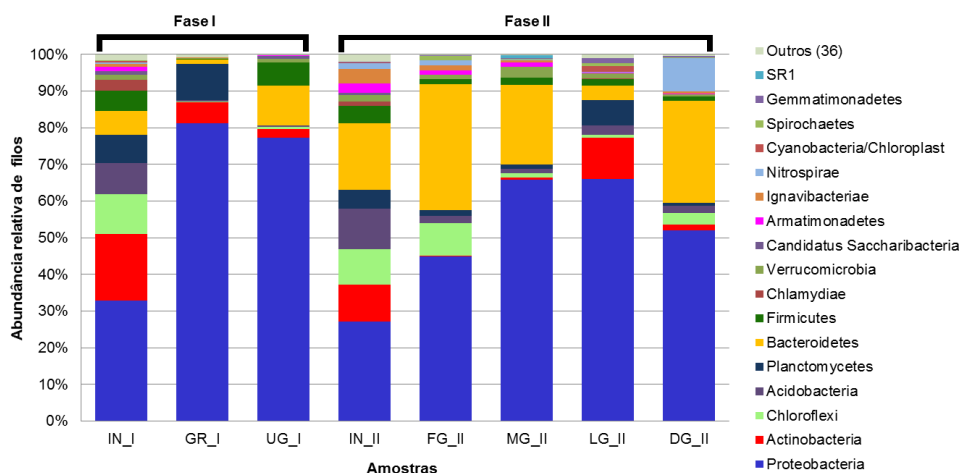


Figura 5.31: Abundância relativa dos filos bacterianos nas amostras coletadas em diferentes estágios da operação do reator ao longo das Fases I e II.

Depois de algum tempo operando em estado pseudo-estacionário com grânulos maduros, alguns grânulos de cor clara e escura (designados como LG_II e DG_II, respectivamente) apareceram no reator. Ambos foram cuidadosamente separados para avaliar a composição da suas comunidades microbianas. Em nível de filo, já havia uma diferença evidente entre os perfis bacterianos das duas amostras. Ambas foram dominados por Proteobacteria, embora alguns filos tenham sido mais abundantes em LG_II ou DG_II. Na amostra LG_II, bactérias do filo Actinobacteria apresentaram a segunda maior frequência (11%), enquanto na DG_II essa posição foi ocupada por Bacteroidetes, que representaram 27% da comunidade bacteriana. O terceiro filo mais abundante em LG_II e DG_II foi, respectivamente, Planctomycetes (7%) e Nitrospirae (9%). Muitos filos detectados na biomassa de cor clara (por exemplo, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Spirochaetes e Gemmatimonadetes) estiveram praticamente ausentes nos grânulos de cor escura, os quais apresentaram menor riqueza e diversidade microbiana.

5.5.3 Perfis bacterianos em nível de classe

O perfil da comunidade bacteriana também foi avaliado em níveis taxonômicos mais específicos, como classe e gênero. A abundância relativa das comunidades microbianas em nível de classe é ilustrada na Figura 5.32. Para uma melhor interpretação dos dados, apenas as primeiras 30 classes classificadas mais importantes foram consideradas na análise, enquanto as classes restantes (52) foram agrupadas em

uma categoria separada designada como "Outros". As classes não classificadas também foram agrupadas separadamente.

Conforme observado no ranking taxonômico de filo, a diversidade bacteriana das amostras de inóculo (IN_I e IN_II) em nível de classe também foi maior do que das outras amostras. Além disso, o perfil bacteriano das duas amostras de inóculo foi semelhante, com pequenas divergências na proporção relativa de algumas classes. As primeiras oito classes classificadas mais dominantes foram as mesmas para as amostras IN_I e IN_II: Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Planctomycetia, Acidobacteria_Gp4, Anaerolineae, Sphingobacteriia e Caldilineae.

Na Fase I, o perfil bacteriano em nível da classe mudou completamente após a granulação do lodo, sendo observado um nível mais alto de dominância de algumas classes específicas. A classe mais abundante no inóculo, ou seja, Alphaproteobacteria, tornou-se ainda mais dominante no estágio de biomassa granulada (GR_I), representando 73% de todas as leituras de DNA fornecidas pelo sequenciamento. No entanto, à medida que as propriedades da biomassa granular deterioraram-se, levando à granulação instável, Betaproteobacteria tornou-se a classe preponderante (59% das leituras) na amostra UG_I, enquanto a porcentagem relativa de Alphaproteobacteria caiu para 14%. Além disso, algumas classes que foram detectadas em IN_I e GR_I, como Planctomycetia, Acidobacteria_Gp4 e Anaerolineae, não foram detectadas na biomassa granular instável (UG_1).

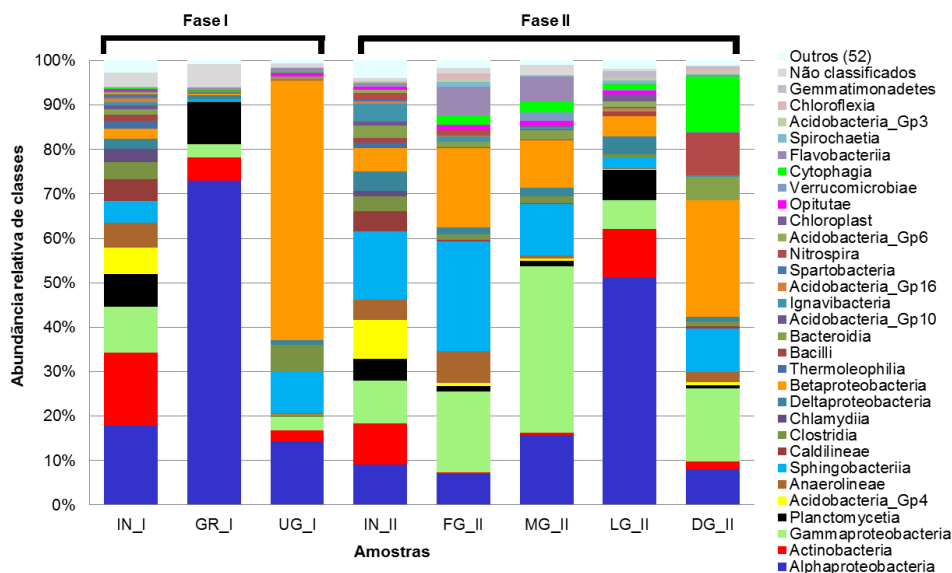


Figura 5.32: Estrutura da comunidade microbiana em nível da classe das amostras coletadas em vários estágios ao longo das Fases I e II.

Ao contrário do observado na Fase I, uma distribuição mais uniforme das diferentes classes ao longo do processo de granulação foi observada na Fase II. Além disso, o perfil bacteriano das amostras de biomassa granular (tanto FG_II como MG_II) foi bastante semelhante ao apresentado pelo inóculo (IN_II). Observou-se uma frequência relativamente alta de Alphaproteobacteria em todas as amostras da Fase II, embora Gammaproteobacteria tenha se tornado a classe dominante nos grânulos maduros. Organismos pertencendo às classes Actinobacteria e Acidobacteria_Gp4, ambos correspondendo a cerca de 9% da comunidade microbiana na amostra IN_II, foram detectados em pequenas quantidades nos estágios subsequentes. Por outro lado, as classes Sphingobacteriia e Betaproteobacteria foram observadas em alta frequência em praticamente todas as amostras da Fase II. Novamente, como observado em nível de filo, a estrutura bacteriana dos grânulos de cor clara foi bastante distinta em comparação com a dos grânulos de cor escura. O perfil dos últimos se assemelha mais ao apresentado pelos grânulos maduros (MG_II), mas os grânulos de coloração clara abrigaram uma comunidade de bactérias completamente diferente (Figura 5.33).

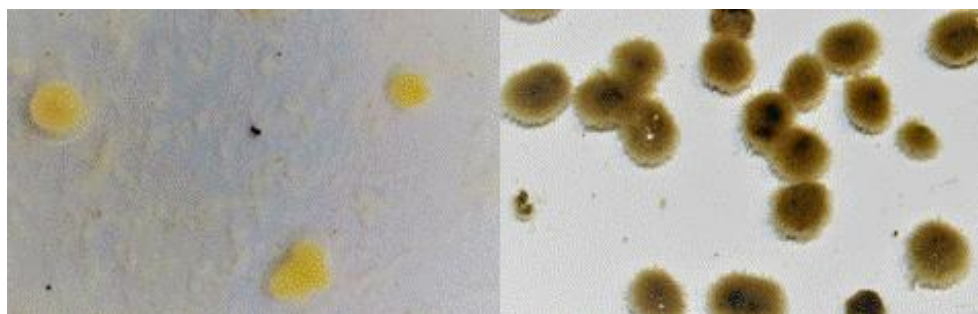


Figura 5.33: Grânulos de coloração clara e escura da Fase II.

5.5.4 Perfis bacterianos das amostras de inóculo em nível do gênero

Em função da comunidade bacteriana do lodo de inóculo ter apresentado uma diversidade muito elevada e ter um perfil completamente diferente das amostras de biomassa granular, a comparação entre a atribuição taxonômica das sequências em nível do gênero foi avaliada separadamente para IN_I e IN_II. Devido ao elevado número de gêneros diferentes (cerca de 940), apenas os 30 mais relevantes foram mostrados na Figura 5.34. Juntos, eles representaram 35% e 54% do total de leituras de DNA das amostras de inóculo das Fases I e II, respectivamente.

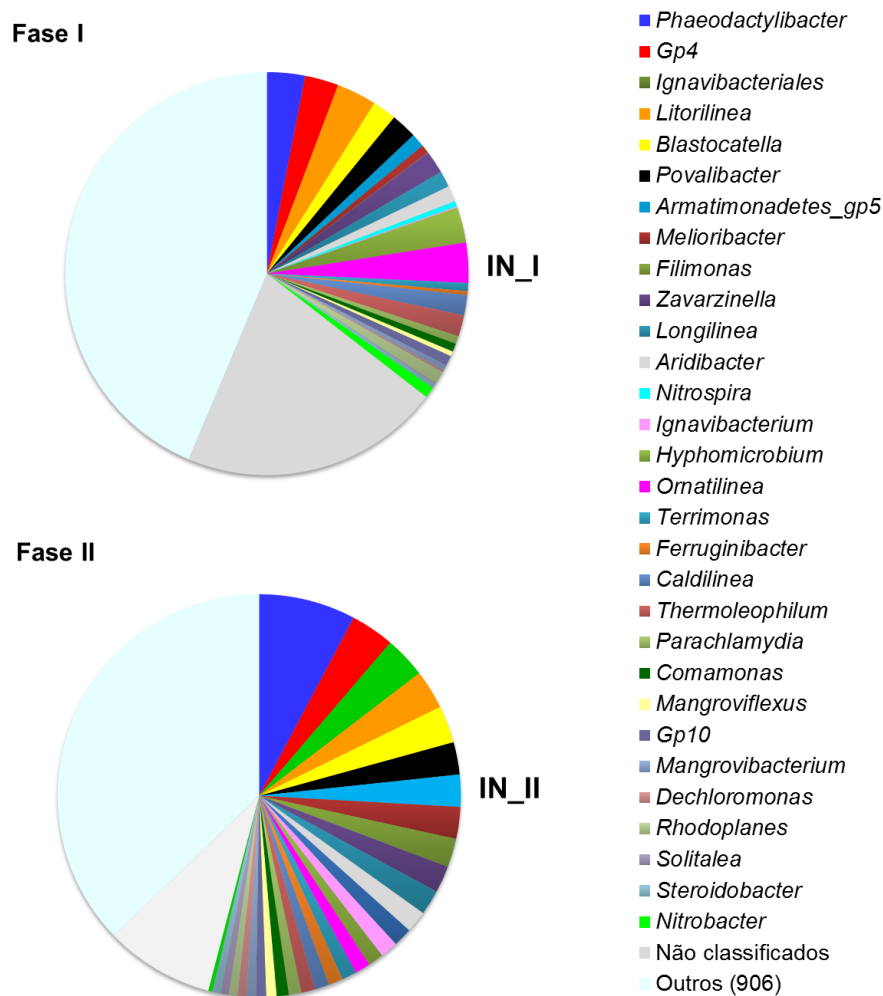


Figura 5.34: Abundância relativa dos 30 gêneros mais abundantes nas amostras IN_I e IN_II. Os gêneros detectados em proporções menores foram agrupados separadamente na categoria "Outros".

De um modo geral, a maioria dos organismos em nível de gênero (525 UTOs) foram compartilhados pelas duas amostras de inóculo, enquanto que 114 e 297 foram encontrados exclusivamente em IN_I e IN_II, respectivamente (Figura 5.35). Representando pelo menos 3% da comunidade bacteriana, os primeiros 5 gêneros mais abundantes nas amostras IN_I e IN_II foram os seguintes: *Ornatilinea*, *Litorilinea*, *Phaeodactylibacter*, *Hyphomicrobium* e *Gp4* (IN_I) e *Phaeodactylibacter*, *Gp4*, *Ignavibacteriales*, *Litorilinea* e *Blastocatella* (IN_II). Cada um dos gêneros restantes representaram menos de 3% da comunidade bacteriana.

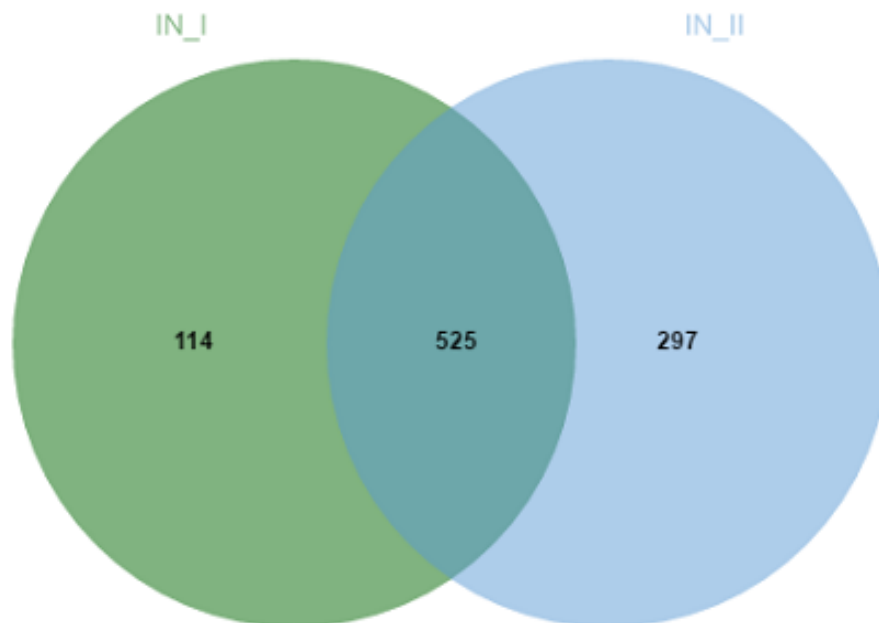


Figura 5.35: Diagrama de Venn ilustrando o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) compartilhadas pelas amostras de inóculo das duas fases e exclusivamente encontradas em cada uma.

5.5.5 Perfis bacterianos da biomassa granular em nível de gênero: Fase I

A comparação entre o perfil bacteriano em nível de gênero para os grânulos maduros (GR_I) e os grânulos instáveis (UG_I) na Fase I pode ser vista na Figura 5.36a-b. Uma vez que apenas dois gêneros foram compartilhados entre os 20 mais abundantes em cada amostra, a descrição das UTOs foi mostrada separadamente para GR_I e UG_I. Portanto, é importante notar que uma determinada cor não representa o mesmo gênero em (a) e (b). Os gêneros restantes (347) não foram considerados na análise, pois cada filotipo individual correspondeu a menos de 0,5% de todas as leituras das sequências de DNA.

Em GR_I, *Devosia* foi o gênero predominante e representou 16% de todas as sequências. *Shinella*, *Bosea* e *Pseudolabrys* foram, respectivamente, o segundo, terceiro e quarto gêneros mais frequentes, representando cerca de 12%, 12% e 10% da comunidade bacteriana global. Na amostra UG_I, no entanto, o *Azonexus* foi o gênero mais frequente, correspondendo a 30% da comunidade. O segundo gênero mais

importante foi *Dechloromonas*, que representou 13% das leituras totais. A proporção de *Sediminibacterium*, *Soehngenia* e *Zoogloea* na comunidade bacteriana foi muito similar, representando entre 4 e 5% da comunidade bacteriana.

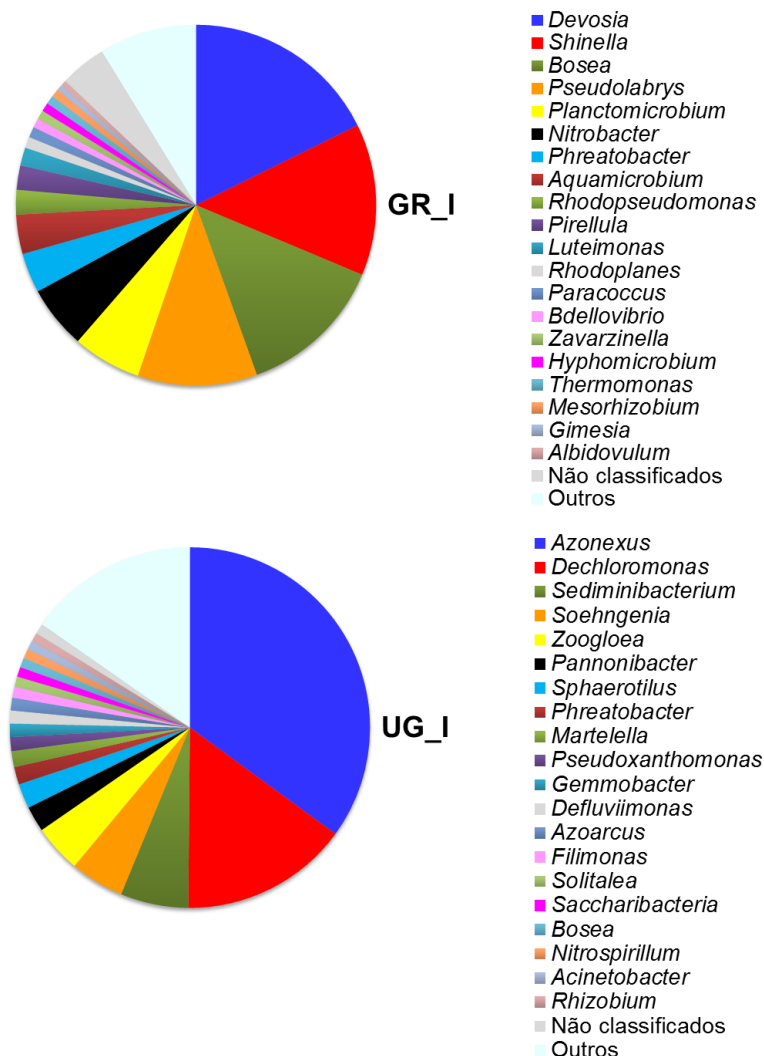


Figura 5.36: Abundância relativa dos 20 gêneros classificados mais abundantes nas amostras GR_I e UG_I. Os gêneros restantes (347) foram detectados em proporções menores e foram agrupados na categoria 'Outros'.

5.5.6 Perfis bacterianos gerais de biomassa granular em nível de gênero: Fase II

A análise dos 30 gêneros mais abundantes em todas as amostras da Fase II está mostrada na Figura 5.37. Os gêneros que foram detectados em quantidades menores foram agrupados na categoria "outros". Dado o número considerável de gêneros

diferentes (cerca de 1000), esta categoria constituiu uma fração significativa do total de leituras de DNA.

O perfil bacteriano mudou consideravelmente dos primeiros grânulos formados (FG_II) para os grânulos maduros (MG_II), embora o intervalo de tempo envolvido na transformação de FG_II para MG_II correspondeu a aproximadamente 40 dias. Tanto a riqueza como a diversidade bacteriana foram mais pronunciadas na amostra de grânulos maduros em comparação com os primeiros grânulos formados, conforme indicado pelos índices de Chao I e Shannon (H) (Tabela 5.1). Para melhor ilustrar a dinâmica das principais UTOs na comunidade microbiana nos diferentes estágios da granulação, um mapa de calor (*heatmap*) é mostrado na Figura 5.39.

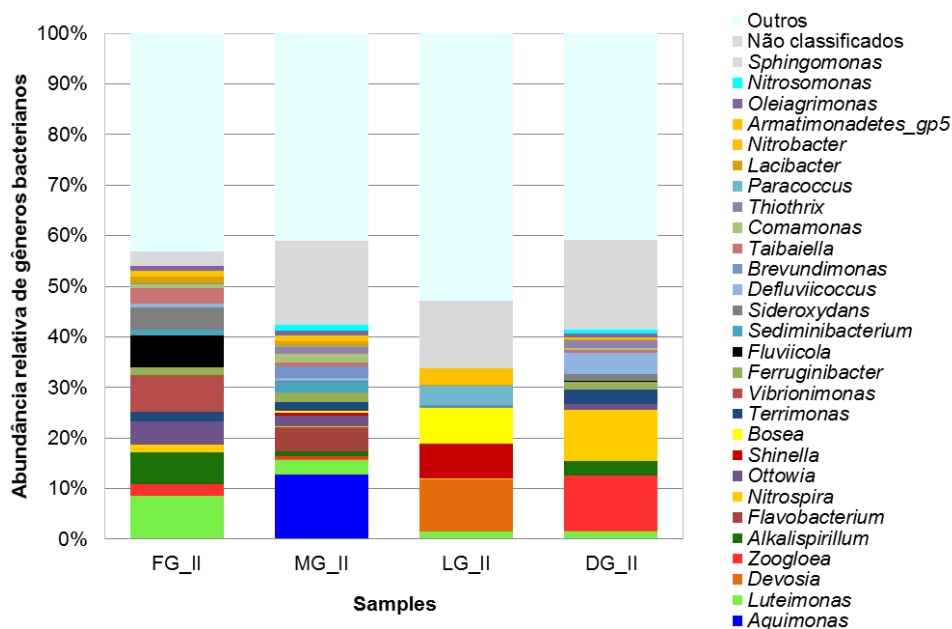


Figura 5.37: Abundância relativa dos 30 gêneros classificados mais relevantes nas amostras na Fase II (FG_II, MG_II, LG_II, DG_II).

Levando em consideração todas as amostras analisadas, o gênero mais abundante em toda a comunidade bacteriana foi *Aquimonas*. Contudo, esse gênero específico foi detectado apenas nos grânulos maduros, nos quais correspondeu a 12.6% de todas as sequências de DNA. *Luteimonas* foi o segundo gênero mais abundante, e sua importância relativa foi maior nos primeiros grânulos formados. *Alkalispirillum*, *Ottowia*, *Vibrionimonas*, *Fluviicola*, *Sideroxydans* e *Taibaiella* também são exemplos de UTOs presentes em maior número na amostra FG_II e que apresentaram abundância

relativamente baixa em MG_II. Por outro lado, *Flavobacterium*, *Brevundimonas* e *Thiothrix* foram detectados em maiores quantidades na amostra MG_II.

Diferenças consideráveis também foram evidentes quando os grânulos de diferentes coloração (isto é, amostras LG_II e DG_II) são comparados com a amostra MG_II. Ambos os tipos de biomassa foram desenvolvidos após algum tempo a partir dos grânulos maduros (MG_II), embora a estrutura da comunidade bacteriana dos mesmos tenha sido bastante diferente da observada para MG_II. De fato, como ilustrado na Figura 5.38, 362 UTOs foram compartilhadas por MG_II e LG_II, enquanto que 334 e 200 UTOs foram detectadas exclusivamente nas amostras MG_II e LG_II, respectivamente. Da mesma forma, cerca de 358 UTOs foram compartilhadas por MG_II e DG_II, enquanto que 338 e 111 UTOs foram detectadas apenas em MG_II e DG_II, respectivamente.

Se as amostras LG_II e DG_II forem comparadas, o número de UTOs compartilhadas por essas duas amostras foi de 284, embora muitas delas (278 e 185) tenham sido detectadas somente em LG_II e DG_II, respectivamente (Figura 5.38).



Figura 5.38: Diagrama de Venn mostrando o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) compartilhadas pelas amostras MG_II, LG_II e DG_II e exclusivamente encontradas em cada uma.

Muitos gêneros abundantemente presentes na primeira amostra (por exemplo, *Devosia*, *Shinella*, *Bosea*, *Paracoccus*, *Nitrobacter* e *Sphingomonas*), foram detectados apenas em pequenas quantidades nos grânulos com coloração escura. Por outro lado, *Dechloromonas*, *Zoogloea*, *Nitrospira* e *Defluviicoccus* foram mais abundantes na amostra DG_II em comparação com LG_II (Figura 5.39).

Para fins comparativos, os dados do lodo de inóculo (IN_II) também são exibidos. A abundância média de leitura de uma UTO específica em todas as amostras analisadas também é indicada. Os organismos pertencentes à categoria "Outros" (Figura 5.37) foram excluídos da análise.

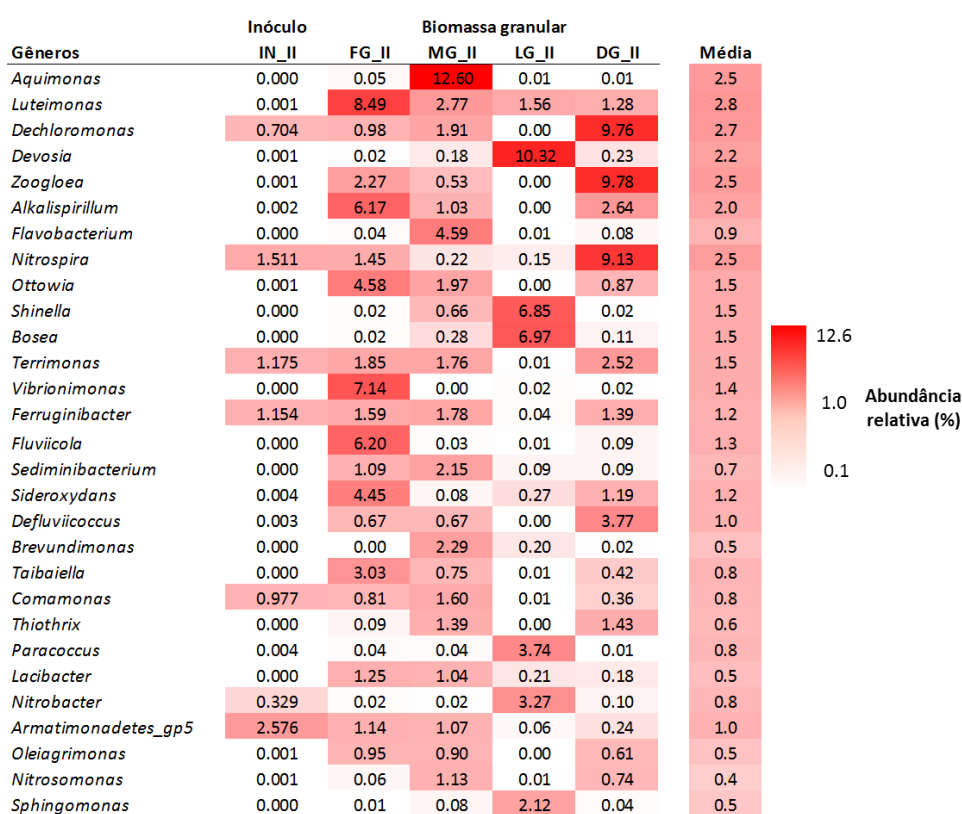


Figura 5.39: *Heatmap* ilustrando a proporção relativa dos 20 gêneros mais abundantes da comunidade bacteriana dos grânulos. Para esta análise, foram consideradas todas as amostras de lodo granular da Fase II (FG_II, MG_II, LG_II e DG_II).

5.5.7 Análise de PAO, GAO e bactérias nitrificantes nas Fases I e II

O objetivo principal da operação do sistema de lodo granular aeróbio foi a remoção combinada de matéria orgânica (DQO), fósforo e nitrogênio do esgoto doméstico sintético. Portanto, a análise dos micro-organismos envolvidos nos processos

de remoção de nitrogênio e fosforo é particularmente relevante para entender a funcionalidade do sistema. Para entender melhor a distribuição desses organismos, foi realizada uma análise separada para PAO, GAO e bactérias nitrificantes. Um mapa de calor (*heatmap*) descrevendo o percentual relativo de diferentes gêneros pertencentes a cada grupo funcional em toda a comunidade bacteriana é mostrado na Figura 5.40.

A porcentagem dos membros dos diferentes grupos funcionais nas amostras de lodo de inóculo das Fases I (IN_I) e II (IN_II) foram bastante semelhantes, o que está de acordo com os resultados de sequenciamento para os níveis de filo e classe (Figura 5.31 e Figura 5.32). Na Fase I, a proporção relativa de PAO relacionados ao gênero *Rhodocyclus* nas diferentes amostras foi muito pequena. No entanto, PAO pertencentes ao gênero *Dechloromonas* já foram detectados no lodo de inóculo, mas foi na biomassa granular instável (UG_I) que este grupo foi surpreendentemente abundante, correspondendo a 13,1% de todas as leituras de DNA. Na Fase II, PAO relacionados ao gênero *Rhodocyclus* foram detectados em quantidades menores em comparação com outros PAO, mas sua proporção relativa aumentou de níveis praticamente nulos para cerca de 0,1% quando lodo na forma de flocos (IN_II) foi transformado em pequenos grânulos (FG_II). Estes organismos, no entanto, não se desenvolveram mais nos grânulos maduros (MG_II).

Conforme observado na Fase I, bactérias do gênero *Dechloromonas* foram os principais PAO. Estes organismos já foram detectados em quantidades mais elevadas no lodo de inóculo e tornaram-se gradualmente mais abundantes ao longo do processo de granulação. Sua proporção relativa na comunidade bacteriana aumentou de 0,7% para cerca de 1% do estágio IN_II para FG_II. O desenvolvimento dos grânulos para MG_II também foi acompanhado por um aumento na proporção de organismos relacionados com *Dechloromonas* para aproximadamente 2%. A estratificação da biomassa em grânulos de cor clara e escura ao longo do estágio completo de granulação revelou resultados interessantes. Curiosamente, organismos do gênero *Dechloromonas* não foram detectados em LG_II, mas constituíram uma grande fração da comunidade bacteriana (9,7%) na amostra DG_II (Figura 5.40).

No que diz respeito aos organismos acumuladores de glicogênio (GAO), dois gêneros principais foram detectados: *Defluviococcus* e *Propionivibrio*. O primeiro foi mais abundante em praticamente todas as amostras analisadas. Na Fase I, a contribuição relativa de *Defluviococcus* diminuiu consideravelmente ao longo do processo de

granulação, de 0,01% (IN_I) para cerca de 0,004% (GR_I). Por outro lado, observou-se que sua importância relativa aumentou gradualmente ao longo dos diferentes estágios de granulação na Fase II. Partindo de níveis praticamente não detectáveis em IN_II, esses organismos representaram cerca de 1% da comunidade bacteriana em MG_II. Diferenças significativas também foram observadas entre amostras de LG_II e DG_II. No primeiro caso, as bactérias relacionadas ao gênero *Deffluviococcus* não foram encontradas, mas representaram cerca de 3,8% de todas as leituras da amostra DG_II. Bactérias do gênero *Propionivibrio* foram raramente detectadas na Fase I, mas sua proporção aumentou para cerca de 0,15% nos grânulos maduros na Fase II (MG_II). Ao contrário de outros PAO e GAO, organismos pertencendo ao gênero *Propionivibrio* foram mais abundantes nos grânulos de cor clara.

No que diz respeito à comunidade nitrificante, *Nitrosomonas* foi o gênero de AOB dominante. *Nitrospira* constituiu uma fração muito pequena da comunidade nitrificante, especialmente na Fase I. Na Fase II, a porcentagem relativa de *Nitrosomonas* aumentou de níveis quase não detectáveis no lodo de inóculo até cerca de 1,1% em grânulos maduros. Além disso, estes organismos estavam mais abundantemente presentes nos grânulos de cor escura.

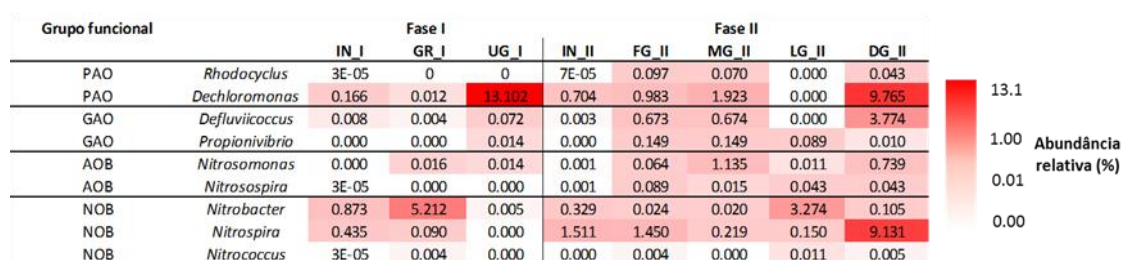


Figura 5.40: Mapa de calor mostrando os percentuais relativos de diferentes grupos funcionais importantes envolvidos nas transformações de fósforo e nitrogênio no reator.

Os resultados de sequenciamento também revelaram que *Nitrobacter* dominou a comunidade de NOB na Fase I. Seu percentual relativo aumentou de 0,9% para 5,2% ao longo do processo de granulação (de IN_I para GR_I), mas diminuiu acentuadamente para valores extremamente baixos (<0,01%) na biomassa instável (UG_I). *Nitrospira* e *Nitrococcus* representaram uma fração pequena da comunidade bacteriana nessa fase operacional. Na Fase II, no entanto, *Nitrobacter* e *Nitrospira* foram detectados em quantidades relativamente semelhantes. As maiores divergências foram observadas para as amostras LG_II e DG_II. Na primeira, *Nitrobacter* correspondeu a 3,3% de todas as

leituras, enquanto *Nitrospira* compreendeu uma pequena fração da comunidade NOB. Na segunda, por outro lado, *Nitrospira* alcançou a marca de 9,1% de todas as sequências, enquanto *Nitrobacter* foi praticamente inexistente na amostra LG_II. Conforme observado na Fase I, *Nitrococcus* quase não foi detectado em todas as amostras da Fase II.

5.5.8 *Avaliando a riqueza e a diversidade bacteriana e outras características dos flocos de lodo ativado e da biomassa granular nas Fases I e II*

Como ambas as amostras de lodo de inóculo foram obtidas a partir da mesma planta de tratamento de esgoto sanitário, embora em diferentes períodos, esperava-se que o perfil da comunidade bacteriana do inóculo em ambas as fases (IN_I e IN_II) fosse semelhante. De fato, isso foi confirmado pelos resultados de sequenciamento (Figura 5.31 e Figura 5.34), os quais revelaram que a maioria das UTOs foram compartilhadas pelas duas amostras (Figura 5.35). A maior riqueza e diversidade do lodo de inóculo é possivelmente atribuída ao fato de que o mesmo foi coletado a partir de um reator de grande escala tratando esgoto doméstico real, que compreende uma ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos cujas concentrações podem variar muito ao longo do tempo (METCALF E EDDY, 2002). Por outro lado, a biomassa coletada a partir do sistema de laboratório foi submetida à alimentação com água residuária sintética, contendo acetato como fonte de carbono, o que pode ter contribuído para selecionar organismos específicos. Observou-se um perfil bacteriano completamente diferente para a biomassa granular nas Fases I e II em comparação com o respectivo lodo de inóculo. De fato, das 30 UTOs mais abundantes em nível do gênero nos grânulos formados nas Fases I e II, apenas 4 (para GR_I) e 6 (para FG_II) também estavam entre os 30 UTOs mais relevantes no inóculo (Figura 5.31). Além disso, é muito provável que as condições operacionais do reator, como a fase de alimentação em fluxo pistonado sob condições anaeróbias seguida de fase de aeração tenham desempenhado um papel importante no estabelecimento de diferentes grupos funcionais no sistema (DE KREUK E VAN LOOSDRECHT, 2004). Também não se pode excluir que, durante o estágio de granulação do lodo em ambas as fases (isto é, a transformação de IN_I em GR_I e IN_II em FG_II), ocorreu uma seleção natural de bactérias, como apontado em estudos anteriores (WEISSBRODT *et al.*, 2012). Isso pode ter levado a uma menor diversidade e maior nível de dominância na comunidade bacteriana da

biomassa granular formada, como demonstrado pelos menores valores do índice de Shannon (H) e de Simpson, respectivamente (Tabela 5.1).

É interessante ressaltar que, apesar da riqueza e da abundância relativamente menor apresentada pela biomassa granular em comparação com a do lodo floculento utilizado como inóculo, as características da biomassa mudaram consideravelmente dos primeiros grânulos formados aos grânulos maduros na Fase II. O número de UTOs e, portanto, o índice de riqueza de Chao I, aumentaram substancialmente da amostra FG_II para a MG_II. Isso sugere que, à medida que a granulação evoluiu ao longo do tempo, e o tamanho das partículas aumentou gradualmente, novas camadas bacterianas foram desenvolvidas. Outros micro-organismos puderam então colonizar o biofilme granular, contribuindo para expandir a comunidade bacteriana destes aglomerados microbianos. Além disso, mesmo sob uma operação estável do reator, a biomassa granular desenvolvida é susceptível a mudanças, como demonstrado pelo aparecimento de grânulos de cor escura (DG_II) e clara (LG_II) na Fase II, cada qual mostrando um perfil bacteriano distinto (Figura 5.31 - Figura 5.32). Como a riqueza e a diversidade da comunidade microbiana dessas amostras de lodo granular de diferente coloração foram menores quando comparadas com a biomassa a partir da qual foram originadas (ou seja, MG_II), é possível inferir que alguns grupos microbianos preferem se estabelecer em determinados aglomerados microbianos, levando a um maior nível de dominância na comunidade bacteriana (Tabela 5.1) e segregação de biomassa dentro do reator.

5.5.9 Compreendendo o processo de granulação nas Fases I e II com base nos perfis bacterianos

Os resultados mostraram que a riqueza e a diversidade da comunidade microbiana foram reduzidas quando o processo de granulação do lodo ocorreu nas Fases I e II. Além disso, quando a composição da comunidade de bactérias das amostras de lodo granular das Fases I e II é comparada, observa-se que as primeiras apresentaram uma distribuição mais desigual dos diferentes filos e classes, levando a um maior nível de dominância e menor diversidade (Tabela 5.1). Com base apenas nestes resultados e sem uma análise adicional acerca das UTOs presentes na biomassa granular ao longo dos diferentes estágios de operação do reator, torna-se difícil explicar os principais motivos da ocorrência de instabilidade do lodo granular e posterior desgranulação na Fase I. No entanto, esses dados sugerem preliminarmente que uma maior riqueza e

diversidade da comunidade bacteriana favorece a obtenção de granulação estável durante um período de tempo prolongado, como observado na Fase II.

Para uma melhor compreensão do processo de granulação em cada fase experimental, é necessário rastrear o perfil da comunidade microbiana ao longo do tempo. Os dados de sequenciamento revelaram que, ao longo das transformações dos flocos de lodo ativado em grânulos em ambas as fases, a frequência relativa das proteobactérias aumentou substancialmente e esses organismos representaram a maioria da comunidade bacteriana. De maneira oposta, outros filos como Actinobacteria, Chloroflexi e Acidobacteria tornaram-se gradualmente menos importantes conforme a granulação prosseguiu nas Fases I e II, sugerindo que estes organismos desempenham um papel menos importante no desenvolvimento de grânulos. Na maioria das plantas de tratamento de águas residuárias municipais, predomina o filo Proteobacteria, sendo Betaproteobacteria a classe mais abundante, desempenhando um papel fundamental na remoção de matéria orgânica e nutrientes (NIELSEN *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2012; CYDZIK-KWIATKOWSKA E ZIELINSKA, 2016). Nessa pesquisa, Alphaproteobacteria (77% de todas as leituras) foi a classe dominante durante a granulação instável na Fase I, mas a porcentagem relativa de Betaproteobacteria foi muito maior no estágio de desgranulação. Na Fase II, no entanto, Alpha, Beta e Gammaproteobacteria juntamente com Sphingobacteriia foram classes altamente abundantes nos grânulos maduros (MG_II). Zhu *et al.* (2013) observaram que os grânulos estáveis foram dominados por Betaproteobacteria (mais de 60% da comunidade bacteriana). No entanto, o trabalho desses autores envolveu o tratamento de águas residuárias contendo compostos químicos específicos.

Conforme mencionado anteriormente, a instabilidade dos grânulos e a desgranulação na Fase I estiveram possivelmente associadas aos micro-organismos presentes na biomassa. De fato, vários estudos reportaram problemas na remoção de nutrientes e instabilidades operacionais durante a granulação aeróbia (DE KREUK, *et al.*, 2005; GONZALEZ-GIL E HOLLIGER, 2011). De acordo com De Kreuk e van Loosdrecht (2004), a granulação estável é alcançada quando são selecionadas bactérias de crescimento lento, como PAO e GAO. Esses organismos são capazes de absorver a matéria orgânica, de preferência ácidos graxos voláteis (acetato nesse estudo) em condições anaeróbias (isto é, na ausência de aceptores de elétrons externos, como oxigênio e nitrato/nitrito). Nessas condições, os polímeros de armazenamento (por

exemplo, PHA) são produzidos a partir da matéria orgânica facilmente biodegradável e armazenados intracelularmente, tornando-se disponível para serem utilizados quando a DQO externa não está mais presente (MINO *et al.*, 1998). Isso fornece uma vantagem competitiva a esses organismos em relação a outros heterotróficos de crescimento rápido, que requerem o acoplamento de doadores de elétrons (fonte de carbono orgânico) e aceptores de elétrons (oxigênio ou espécies de nitrogênio oxidado) para o seu metabolismo celular (BARNARD E COMEAU, 2014). Conforme relatado em estudos anteriores (DE KREUK E VAN LOOSDRECHT, 2004; PRONK *et al.*, 2015), o crescimento filamentosos e o aparecimento de grânulos de forma irregular são mais susceptíveis de ocorrer quando os substratos facilmente biodegradáveis não são convertidos anaerobicamente em polímeros de armazenamento e o desenvolvimento de bactérias heterotróficas de rápido crescimento é favorecido.

Como o lodo utilizado para inocular o reator foi oriundo de um sistema de lodo ativado projetado apenas para remoção de DQO de esgoto municipal, era esperado que a fração relativa de PAO e GAO na sua comunidade microbiana fosse pequena. De fato, os resultados do sequenciamento mostraram que ambos os grupos funcionais foram pouco detectados na amostra do inóculo (Figura 5.40).

Para a seleção desses organismos cuja taxa de crescimento é relativamente lenta, empregou-se um longo período de alimentação em condições anaeróbias para maximizar o consumo de DQO na ausência de aceptores de elétrons. No entanto, a estratégia operacional empregada para selecionar grânulos por redução gradual do tempo de decantação imediatamente após a inoculação não favoreceu o estabelecimento da comunidade bacteriana pretendida. De fato, a frequência relativa de PAO e GAO na comunidade microbiana foi pequena nos grânulos estáveis (GR_I) (Figura 5.40), mesmo após cerca de 65 dias de operação. Isso explica por que apenas um pequeno percentual da DQO afluente (10 - 20%) foi convertido anaerobicamente. Consequentemente, a fase aerada do reator desempenhou um papel importante na remoção de DQO, e outros organismos heterotróficos de crescimento rápido foram enriquecidos na biomassa granular. Representando mais de metade de todas as leituras, *Devosia* (18%), *Shinella* (13%), *Bosea* (13%) e *Pseudolabrys* (10%) foram os organismos dominantes na Fase I. Song *et al.* (2010) também relataram o domínio de *Devosia* em grânulos maduros cultivados em um reator *airlift* operado em bateladas sequenciais inoculado com lodo de uma estação de tratamento que trata efluente de cervejaria. *Shinella* e *Devosia* também

foram relatados por Luo *et al.* (2014) como organismos relevantes da biomassa granular submetida à relação DQO/N em torno de 4, semelhante às condições aplicadas neste estudo. O gênero *Bosea* ainda não foi relatado em sistemas de lodo granular aeróbio, mas algumas espécies pertencentes a este gênero foram isoladas de digestores anaeróbios (OUTTARA *et al.*, 2003), enquanto outras foram detectadas em reatores anaeróbios de leito fluidizado, onde atuaram como consumidores de sulfato (BRAGA *et al.*, 2015).

A presença desses organismos dominantes não conseguiu sustentar a granulação estável durante a operação do reator, levando à instabilidade do lodo granular e posterior desgranulação (UG_I). No último estágio, quando os grânulos exibindo certa consistência pastosa e sem forma definida proliferaram (UG_I), a comunidade microbiana era completamente diferente dos grânulos maduros (GR_I) (Figura 5.31, Figura 5.34 e Figura 5.36). Esse resultado é bastante interessante, já que a operação do reator permaneceu inalterada. A amostra UG_I foi dominada por organismos do gênero *Azonexus*, que representaram mais de um terço da comunidade bacteriana. Algumas espécies de *Azonexus*, classificadas como bactérias desnitrificantes, foram isoladas de tanques aeróbios de plantas de tratamento de esgoto municipal (QUAN *et al.*, 2006). Dada a importância relativa desses organismos na amostra UG_I, acredita-se que os mesmos estiveram relacionados à consistência pastosa da biomassa nessas condições. Surpreendentemente, os PAO pertencentes ao gênero *Dechloromonas* se tornaram a segunda população mais abundante (13% de todas as leituras de DNA), embora a liberação anaeróbia e o consumo aeróbio de fosfato não foram observadas nessa fase (Figura 5.40). Além disso, a conversão de DQO no período de alimentação anaeróbia foi consideravelmente baixa. Esses dados indicam que os PAO não foram ativos durante este período e o desenvolvimento de grânulos instáveis sem forma definida provavelmente está relacionado a outros organismos dominantes presentes na biomassa.

Outros gêneros relevantes abundantemente presentes na biomassa instável (> 4% do total de leituras) foram *Sediminibacterium*, *Soehngenia* e *Zoogloea*. Espécies de *Sediminibacterium* foram isoladas de amostras de lodo ativado (AYARZA *et al.*, 2014), enquanto organismos do gênero *Soehngenia* são mais frequentemente detectados em ambientes anaeróbios (PARSHINA *et al.*, 2003; JOSHI *et al.*, 2016). Um dado interessante a ser destacado é a abundância relativamente alta de *Zoogloea*, organismos capazes de produzir substâncias exopoliméricas (SEVIOUR *et al.*, 2012). Weissbrodt *et*

al. (2012) relataram que o crescimento excessivo da população filamentosa ou *Zoogloea* causou deterioração das características de sedimentação dos grânulos aeróbios. Esses autores observaram que, independentemente do padrão de alimentação, o tempo de retenção de sólidos insuficiente e a presença de substrato orgânico (acetato) na fase aerada levaram à proliferação de *Zoogloea*, que se tornaram predominantes em grânulos densos.

Nesse estudo, particularmente durante a Fase I, a maior parte da DQO foi removida aerobicamente, o que pode ter favorecido a ocorrência desses organismos heterotróficos de crescimento rápido. Os organismos filamentosos pertencentes ao gênero *Sphaerotilus* também foram relativamente abundantes (2%) na biomassa instável. Esses organismos também foram relatados como causadores de intumescimento de lodo (bulking) (WILLIAMS E UNZ, 1985). Sua presença em grânulos aeróbios alimentados com águas residuárias sintéticas e industriais já foi relatada em trabalhos anteriores (WEBER *et al.*, 2007; FIGUEROA *et al.*, 2015). O crescimento excessivo desses organismos provavelmente esteve envolvido na proliferação de estruturas filamentosas, fazendo com que os grânulos perdessem sua forma definida e, em última instância, levando à ruptura e desgranulação.

A estratégia empregada na Fase II para selecionar os organismos capazes de converter acetato em condições anaeróbias (por exemplo, PAO e GAO) a partir do lodo de inóculo antes de diminuir o tempo de sedimentação foi bem sucedida. Grande parte da DQO afluenta foi removida na alimentação anaeróbia antes do aparecimento dos primeiros grânulos (FG_II). Esse resultado sugeriu que o crescimento das bactérias heterotróficas de crescimento rápido foi limitado, enquanto os PAO e GAO foram enriquecidos no reator. De fato, a proporção de ambos grupos funcionais na comunidade bacteriana aumentou substancialmente em FG_II e especialmente MG_II em comparação com IN_II (Figura 5.40), levando à granulação estável. No entanto, outros organismos também se tornaram dominantes nos grânulos e podem ter desempenhado um papel importante na estabilidade da biomassa granular. Este é o caso de *Aquimonas*, apenas detectado na amostra de grânulos maduros (MG_II), nos quais consistiu no gênero mais abundante. Organismos desse gênero foram encontrados em fontes de águas termais (SAHA *et al.*, 2005) e também em reatores aeróbios tratando águas residuárias reais em altas temperaturas (NAZ *et al.*, 2016). Como esses organismos são considerados estritamente aeróbios (SAHA *et al.*, 2005), ao que tudo indica eles podem

ter contribuído para a remoção de DQO na fase aerada do ciclo do RBS. Como a fração de compostos orgânicos remanescente do período de alimentação anaeróbia foi limitada, os organismos relacionados com o gênero *Aquimonas* podem também ter sobrevivido à custa da biomassa em decaimento celular nos grânulos maduros.

Os organismos pertencentes ao gênero *Luteimonas* parecem ter sido importantes para o processo de granulação, pois sua frequência relativa tornou-se substancialmente maior nos primeiros grânulos formados na Fase II (FG_II). Esses organismos já foram detectados em um processo anóxico-óxico (A/O) composto por um filtro anóxico e um contactor biológico em quatro estágios, conforme relatado por Li e Lu (2017). *Alkalispirillum*, *Zoogloea*, *Ottowia*, *Vibrionimonas*, *Fluviicola* e *Sideroxydans* também estiveram abundantemente presentes em FG_II em comparação com o lodo de inóculo. Algumas espécies do gênero *Ottowia* isoladas a partir de lodo ativado são consideradas bactérias formadoras de flocos (FELFOLDI *et al.*, 2011) e o papel desses organismos na granulação aeróbia em altas temperaturas (30 - 35 °C) foi relatado anteriormente (CANÇÃO *et al.*, 2009). Conforme discutido anteriormente, os organismos relacionados ao gênero *Zoogloea* estão relacionados à produção de polímeros extracelulares semelhantes e têm a capacidade de unir células (LI *et al.*, 2008; SEVIOUR *et al.*, 2012), desempenhando um papel importante na formação de grânulos. Estes organismos também podem armazenar ácidos graxos voláteis na forma de PHA intracelular (WEISSBRODT *et al.*, 2010). Os organismos do gênero *Zoogloea* são encontrados em quantidades significativas ao longo do processo de granulação em reatores alimentados com águas residuárias contendo glicose (LI *et al.*, 2008). WEISSBRODT *et al.* (2014) relataram que *Zoogloea* proliferou no estágio inicial do desenvolvimento de grânulos, mas não nos grânulos maduros. Esses autores mencionaram que a predominância de *Zoogloea* levou à formação de biomassa granular homogênea dispersa em uma matriz de gel, permitindo o crescimento adicional de grupos densos de bactérias de crescimento lento, tais como nitrificantes, PAO e GAO, que se estabeleceram sobre os organismos *Zoogloea* a partir do centro dos grânulos para a sua extremidade (WEISSBRODT *et al.*, 2014). De fato, a proporção relativa desses organismos aumentou substancialmente ao longo do estágio inicial do processo de granulação, mas diminuiu quando os grânulos maduros foram formados (Figura 5.39). Para ser uma ideia, esses organismos atingiram 4% do total de bactérias nos grânulos instáveis na Fase I, e podem ter tido efeito adverso na manutenção da estabilidade dos

grânulos. Também é interessante ressaltar o aumento gradual da abundância de organismos pertencentes ao gênero *Thiothrix* na granulação aeróbia durante a Fase II. Essas bactérias são frequentemente relacionadas à ocorrência de *bulking* filamentoso em processos de lodos ativados (WILLIAMS e UNZ, 1985a). Apesar do regime anaeróbio-aeróbio alternado aplicado ao reator, o qual provavelmente não é favorável aos organismos do gênero *Thiothrix* pois os mesmos não acumulam biopolímeros durante o período de alimentação anaeróbia (HENRIET *et al.*, 2017), a frequência relativa dessas bactérias filamentosas atingiu quase 2% nos grânulos maduros (MG_II). A presença de *Thiothrix* em reatores de lodo granular aeróbio foi relatada em investigações anteriores (FIGUEROA *et al.*, 2015). Verificou-se que o comprimento dos seus filamentos em grânulos varia entre 75 e 300 µm (FIGUEROA *et al.*, 2015). A presença de organismos relacionados com *Thiothrix* pode ter contribuído para aumentar a força da biomassa granular, embora não tenha ocasionado perda de forma nos grânulos maduros.

5.5.10 Avaliando os PAO e GAO dominantes

Com base em técnicas moleculares independentes de cultivo, tem sido amplamente aceito que os PAO mais relevantes em sistemas EBPR de laboratório e em escala plena são aqueles relacionados ao grupo *Rhodocyclus*, pertencente à família Rhodocyclaceae e classe Betaproteobacteria (ZILLES *et al.*, 2002; KONG *et al.*, 2004; YILMAZ *et al.*, 2008, MCMAHON *et al.*, 2010; TERASHIMA *et al.*, 2016). Na literatura, esse grupo de organismos ainda não cultivados compõem muitas espécies diferentes, e são comumente referidos como PAO relacionados com *Rhodocyclus* e também como *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis' ou simplesmente Accumulibacter (HASSELMANN *et al.*, 1999; MCMAHON *et al.*, 2010).

Nesse estudo, no entanto, as bactérias anaeróbias facultativas com potencial de redução de nitrato do gênero *Dechloromonas* (COATES *et al.*, 2001), também pertencentes à família Rhodocyclaceae, consistiram nos organismos acumuladores de polifosfato dominantes. Essas bactérias foram frequentemente detectadas em plantas de tratamento de águas residuárias com estágios alternados anaeróbios/aeróbios, incluindo aqueles que com remoção biológica de fósforo (GOEL *et al.*, 2005; TERASHIMA *et al.*, 2016; SAUNDERS *et al.*, 2016). Tais evidências sugeriram que esses organismos apresentam o potencial de acumular polifosfato em grandes quantidades, tendo papel

importante em processos EBPR (TERASHIMA *et al.*, 2016). Alguns estudos também confirmaram que algumas espécies de *Dechloromonas* apresentam alguns genes necessários para o acúmulo de polifosfato, tais como a polifosfato quinase e a exopolifosfatase (SALINERO *et al.*, 2009). A capacidade desses organismos em armazenar poli-P também foi revelada em outros estudos anteriores (KONG *et al.*, 2007).

Da mesma forma, os resultados deste estudo mostraram que os organismos relacionados com *Defluviicoccus* corresponderam aos GAO dominantes, ao contrário de outros estudos que mostram a predominância de organismos da classe Gammaproteobacteria, particularmente *Candidatus Competibacter phosphatis* (CROCETTI *et al.*, 2002).

5.5.11 Distribuição PAO-GAO e desempenho de remoção de fosfato na Fase II

Devido à granulação instável e a não constatação das conversões típicas do processo EBPR ao longo da Fase I, na Fase II o reator foi inicialmente submetido ao regime anaeróbio-aeróbio alternado sem ocasionar arraste (*washout*) da biomassa (fase de aclimação) para selecionar os PAO. Essa estratégia teve sucesso, uma vez que a proporção de PAO aumentou do inóculo aos primeiros grânulos formados. Concomitantemente, a liberação de fosfato começou a ser observada desde o período de aclimação, tornando-se mais intensa quando os primeiros grânulos (FG_II) foram formados (Figura 5.31). No mesmo período, a absorção de fosfato na fase aerada do ciclo aumentou, levando a uma maior remoção de fosfato do líquido. No entanto, apesar da crescente população de PAO (especialmente *Dechloromonas*) dos primeiros grânulos formados à biomassa granular madura, a liberação anaeróbia de fosfato a sua absorção aeróbia subsequente diminuíram gradualmente ao longo do estágio de granulação completa e estável. Como a quantidade de DQO removida em condições anaeróbias permaneceu praticamente invariável ao longo do tempo, o desempenho instável do processo EBPR foi possivelmente relacionado à proliferação de GAO (principalmente *Defluviicoccus*) durante o processo de granulação. Esses organismos apresentam um metabolismo semelhante ao dos PAO, podendo acumular PHA a partir de AGV em condições anaeróbias (na ausência de aceptores de elétrons externos) e crescer nesses polímeros de armazenamento em condições aeróbias subsequentes (ZENG *et al.*, 2003). Portanto, eles competem com PAO pela matéria orgânica afluyente, mas não contribuem

para o processo biológico de remoção de fósforo, sendo portanto considerados organismos indesejáveis em processos EBPR (LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2009). A competição entre PAO e GAO em sistemas de remoção biológica de fósforo foi estudada em diversos trabalhos anteriores (ERDAL *et al.*, 2003; LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2009). Uma variável que influencia diretamente essa competição é a temperatura. A partir de estudos anteriores, sabe-se que os PAO são psicrófilos (ERDAL *et al.*, 2003) e, portanto, altas temperaturas são favoráveis para os GAO (ERDAL *et al.*, 2003; LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2009), podendo levar à deterioração do processo EBPR nessas condições (BASSIN *et al.*, 2012b). Na verdade, essa era a única condição de operação susceptível à variação no reator em estudo. Do final da fase de seleção de grânulos até o início do estágio de granulação completo, observou-se um aumento na temperatura ambiente de 27 a 32°C resultante da mudança de estação (primavera para verão). Conforme apontado por Erdal (2002), a maior eficiência do EBPR em temperaturas mais baixas deve-se à mudança no metabolismo de PAO em detrimento a mudanças na comunidade microbiana. De acordo com o estudo realizado por Lopez-Vazquez *et al.* (2008, 2009), altas temperaturas (> 25°C) são mais favoráveis aos GAO, pois, nessas condições, esses organismos apresentam uma maior taxa de absorção de AGV em comparação com os PAO. A condição de temperatura mais favorável para GAO na competição com PAO foi determinada como sendo 30°C (LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2008).

Levando em consideração essas observações, os resultados obtidos nesse estudo indicam que os GAO, em especial os pertencendo ao gênero *Defluviicoccus*, podem ter tido vantagem sob as temperaturas relativamente altas em relação a PAO (especialmente do gênero *Dechloromonas*), embora a abundância relativa do primeiro grupo fosse menor do que a do segundo (Figura 5.40). Os GAO relacionados ao gênero *Defluviicoccus* poderiam ter utilizado a maior parte da matéria orgânica afluyente em condições anaeróbias nas condições de temperatura prevalecentes, o que pode explicar por que a liberação e absorção de fosfato em condições anaeróbias e aeróbias, respectivamente, tornou-se pequena ao longo do estágio de granulação completa (Figura 5.40). Também não pode ser excluído que alguns outros GAO putativos com a capacidade de consumir DQO durante a alimentação anaeróbia estiveram presentes na biomassa granular em virtude das altas temperaturas de operação do reator. Adicionalmente, a reduzida remoção de fosfato do líquido observado nesse estudo

conduzido em altas temperaturas pode não só estar relacionada à proliferação de GAO, mas também ser resultado do uso eficiente da via glicolítica por PAO, resultando em mais armazenamento de glicogênio e menor absorção de fosfato do líquido (ERDAL *et al.*, 2007).

Por outro lado, em temperaturas mais baixas (inferiores a 20°C), nas quais os GAO apresentam uma manutenção celular mais onerosa, resultando em maior consumo de energia e menor rendimento de biomassa, o desempenho do processo EBPR é mais satisfatório (LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2008). Como a intenção do estudo foi avaliar o processo de granulação utilizando lodo de inóculo de sistema de tratamento sem remoção biológica de nutrientes e sob condições de clima tropical, a temperatura do reator não foi controlada para favorecer PAO.

Além dos efeitos de temperatura, o tempo de retenção de sólidos relativamente elevado (20 - 30 dias) aplicado ao reator também pode ter favorecido os GAO. Conforme descrito por Whang e Park (2006), os PAO podem competir mais facilmente com GAO em idades de lodo reduzidas (~ 3 dias), o que não ocorre em longos tempos de retenção de sólidos.

5.5.12 *Relacionando o desempenho de nitrificação e a comunidade bacteriana nitrificante*

A planta de tratamento de águas residuárias a partir da qual o lodo de inóculo foi coletado apresentava baixo desempenho de nitrificação. De fato, a quantidade de AOB no lodo de inóculo foi insignificante (Figura 5.40). Com a estratégia operacional aplicada para a seleção de grânulos na Fase I, caracterizada pelo arraste gradual de biomassa floculenta desde a inoculação do reator, as bactérias nitrificantes (especialmente as AOB) se desenvolveram pouco no sistema (Figura 5.40). Nessas condições, baixa remoção de amônio (~ 40%) foi alcançada ao longo da Fase I (Figura 5.40).

Por outro lado, com a aclimação do inóculo previamente ao estágio de seleção de grânulos em condições de operação evitando o arraste de células por meio da aplicação de tempos de sedimentação elevados, a abundância relativa dos organismos oxidadores de amônio (*Nitrosomonas* e *Nitrospira*) aumentou ao longo do tempo (Figura 5.40), levando à nitrificação estável e completa na Fase II (Figura 5.27). Estes dois gêneros de AOB também foram relatados em grânulos aeróbios cultivados em

baixas cargas orgânicas (CYDZIK-KWIATKOWSKA E WOJNOWSKA-BARYLA *et al.*, 2011). No entanto, embora a abundância relativa de ambos os gêneros AOB tenha sido bastante semelhante nos primeiros grânulos formados (FG_II), a evolução da biomassa granular para grânulos maduros (MG_II) levou à predominância de *Nitrosomonas*. Esse gênero é o mais relevante nos sistemas nitrificantes (DAIMS *et al.*, 2009), incluindo reatores de lodo granular aeróbio (BASSIN *et al.*, 2011; FRAVAZQUEZ *et al.*, 2016).

Nitrobacter foi o principal gênero de NOB na Fase I, enquanto *Nitrospira* constituiu a maioria da população de NOB na Fase II. Embora essa diferenciação também possa ser atribuída às diferentes condições operacionais aplicadas no período de partir de cada reator (ausência ou presença do período de aclimatação em condições operacionais evitando o arraste de lodo), as características do inóculo também podem ter influenciado a distribuição das NOB ao longo do tempo. Na Fase I, *Nitrobacter* (0,9%) já era o gênero de oxidadoras de nitrito dominante no inóculo, enquanto que na Fase II *Nitrospira* foi o gênero mais frequente (1,5%). Os resultados indicam que, tanto a estratégia de seleção de grânulos como a qualidade do lodo de inóculo influenciam a comunidade nitrificante nos grânulos formados. *Nitrospira* é relatado como o gênero de NOB mais importante nos processos de lodos ativados (DAIMS *et al.*, 2001; GIESEKE *et al.*, 2003), embora estudos com sistemas de lodo granular aeróbio relatem predomínio de *Nitrobacter* (WINKLER *et al.*, 2012).

Os resultados ainda indicaram que a proporção de *Nitrobacter* na Fase I aumentou substancialmente quando os grânulos maduros foram formados. A proporção de NOB também aumentou consideravelmente na Fase II, particularmente quando se observou a segregação de biomassa em grânulos e coloração clara (LG_II) e escura (DG_II). Levando em conta as leituras de sequências de DNA referentes às AOB e NOB nas amostras GR_I, LG_II e DG_II, a relação NOB/AOB foi muito superior a 1. Com base na oxidação autotrófica de amônio e nitrito, espera-se que a relação entre NOB e AOB deva estar por volta de 0,5 (FERGUSON, 1982; HOOPER *et al.*, 1997). Esse resultado inesperado já foi relatado e investigado em um estudo anterior (WINKLER *et al.*, 2012). Esses autores propuseram dois mecanismos possíveis para explicar essa observação: 1) capacidade mixotrófica dos organismos do gênero *Nitrobacter*, que podem se tornar independentes do fornecimento de nitrito a partir das AOB; e 2) "loop de nitrito", pelo qual ocorre um ciclo de oxidação de nitrito/redução de

nitrito nos grânulos, permitindo que as NOB reutilizem o nitrito e, portanto, desacoplem parcialmente o seu crescimento a partir do nitrito gerado pelas AOB (WINKLER *et al.*, 2012). Ambas as teorias podem ser particularmente relevantes em processos com biofilmes, nos quais é possível a oxidação de nitrito a nitrato por oxidadores de nitrito e redução de nitrato a nitrito por bactérias desnitrificantes (ou NOB com metabolismo mixotrófico). Como a relação entre as NOB puramente autotróficas (como *Nitrospira*) e as AOB também foi observada como sendo consideravelmente elevada na Fase II (especialmente na amostra DG_II), a teoria do *loop* nitrito parece explicar melhor os resultados.

6- CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, algumas considerações podem ser feitas.

Os experimentos mostraram que o uso de um inóculo desprovido de organismos acumuladores de polifosfato (PAO), oriundo de uma planta de tratamento projetada apenas para a remoção de matéria orgânica, acarretou no consumo desprezível de matéria orgânica na fase de alimentação anaeróbia do ciclo do reator em batelada sequencial (RBS). Por conseguinte, a remoção de DQO foi realizada integralmente na fase aerada, o que levou à proliferação de bactérias filamentosas (Fase I). O aporte de elevadas concentrações de matéria orgânica na fase aerada também prejudicou o desenvolvimento das bactérias nitrificantes e, por conseguinte, a oxidação de amônio. A ausência de bactérias de crescimento de lento (PAO e nitrificantes), associada à presença de filamentosas, levou à instabilidade da biomassa granular e posterior desgranulação.

O emprego de uma etapa de aclimação para selecionar os organismos capazes de converter acetato em condições anaeróbias (por exemplo, PAO e GAO) a partir do lodo de inóculo antes de diminuir o tempo de sedimentação (Fase II) permitiu que quase a totalidade da DQO afluyente fosse removida na alimentação anaeróbia antes do aparecimento dos primeiros grânulos. Esse resultado limitou o crescimento das bactérias heterotróficas de crescimento rápido, enquanto os PAO e GAO foram enriquecidos no reator. De fato, conforme evidenciado pela caracterização da comunidade bacteriana por sequenciamento de DNA genômico extraído de amostras de lodo durante a Fase II, a proporção de ambos grupos funcionais na comunidade bacteriana aumentou durante formação dos grânulos, levando à granulação estável.

A despeito da crescente população de PAO (especialmente *Dechloromonas*) dos primeiros grânulos formados (Fase II), a liberação anaeróbia de fosfato a sua absorção aeróbia subsequente, reduziram gradualmente ao longo do estágio de granulação completa e estável. Como a quantidade de DQO removida em condições anaeróbias permaneceu praticamente invariável ao longo do tempo, o desempenho instável do processo EBPR foi atribuído à proliferação de GAO (principalmente *Defluviococcus*)

durante a granulação aeróbia. Tais resultados estão possivelmente ligados às altas temperaturas de operação do reator, favorecendo a atividade desses últimos organismos.

Os resultados de sequenciamento revelaram um perfil bacteriano bastante distinto para a biomassa granular nas Fases I e II em comparação com o respectivo lodo de inóculo. Apesar das condições operacionais do reator terem desempenhado um papel importante no estabelecimento de diferentes grupos funcionais no sistema, acredita-se ter ocorrido uma seleção natural de bactérias, levando a uma menor diversidade e maior nível de dominância na comunidade bacteriana do lodo granular formado. A desgranulação ocorrida na Fase I foi acompanhada por mudança completa da comunidade microbiana no reator em relação aos estágio de granulação completa e instável. Por sua vez, na fase II, as características da biomassa mudaram consideravelmente dos primeiros grânulos formados aos grânulos maduros em função da colonização do biofilme por novas bactérias, repercutindo em maior riqueza microbiana.

De modo geral, esse estudo enfatiza os desafios que podem ser encontrados durante a granulação aeróbia sob condições de clima tropical. Os resultados revelaram que, dependendo do lodo utilizado como inóculo, um estágio de adaptação antes do estágio de seleção de grânulos favorece uma granulação bem-sucedida. Através do estabelecimento de um regime com presença e ausência de substratos, a etapa de aclimação da biomassa permitiu a seleção de organismos de crescimento lento, conhecidos por favorecer a formação de grânulos e sua estabilidade. Além disso, possibilitou a remoção simultânea de DQO, nitrogênio e fósforo. Altos percentuais de remoção de amônio (>95%) e de nitrogênio total (>90%) foram observados, apesar da remoção de fosfato ter se mostrado instável nas condições de temperatura prevalentes.

7- RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os seguintes tópicos podem ser investigados mais detalhadamente em trabalhos futuros:

- Emprego de estratégias para melhorar o desempenho de remoção de fósforo, sobretudo em reatores operados em altas temperaturas;
- Estabelecimento de outras estratégias operacionais para obtenção dos organismos desejados;
- Estudo da granulação aeróbia com efluente real para efeito de comparação com os resultados obtidos nessa pesquisa utilizando efluente sintético.

8- REFERÊNCIAS

ABUFAYED, A.A.; SCHROEDER, C.D., 1986, “Kinetics and stoichiometry of SBR denitrification with a primary sludge carbon source”, *Journal Water Pollution Control Federation*, Washington, v.58, n.5, p.398 - 405.

ADAV, S. S., LEE, D. J. and TAY, J. H., 2008, “Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule.”, *Water Research*, 42(6-7), 1644-1650.

ADAV, S. S.; LEE, D.J.; LAI, J.Y., 2009, “Treating Chemical Industries Influent Using Aerobic Granular Sludge: Recent Development”, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 40, p. 333–336.

ADAV, S.S., LEE, D.J., SHOW, K.Y., TAY, J.H., 2008. “Aerobic granular sludge: recent advances”, *Biotechnol. Adv.* 26, 411–423.

AKKER, B. van D., REID, K., MIDDLEMISS, K., KRAMPE J., 2015, “Evaluation of granular sludge for secondary treatment of saline municipal sewage”, *Journal of Environmental Management*, v. 157, p. 139-145.

AL DEL RÍO, M. A., 2008, Obtención de biomasa granular en reactores en SBR con un efluente industrial. Trabajo de Investigación Tutelado de la Universidad de Santiago de Compostela.

ANGELAKIS, A.N, SNYDER, S.A, 2015. Wastewater treatment and reuse: past, present, and future. *Water* 7, 4887–4895.

APHA – American Public Health Association, 2005. Standard methods for examination of water and wastewater, Twenty- first ed., Washington D.C., USA.

APHA, AWWA, WEF., 2008, “Standard methods for the examination of water and wastewater”, 21ed., Washington.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L., 2005, “Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle”, *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, p. 152-161.

ARROJO, B.; MOSQUERA-CORRAL, A.; GARRIDO, J. M.; MÉNDEZ, R., 2004. “Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors”, *Water Research*, v. 38, p. 3389-3399.

AYARZA J. M. , FIGUEROLA E. L. M., ERIJMAN L., 2014, “Draft Genome Sequences of Type Strain *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44 and *Sediminibacterium* sp. Strain C3, a Novel Strain Isolated from Activated Sludge”, *Genome Announc*, v.107, p. 3-13.

BAETENS D., VANROLLEGHEM P.A., VAN LOOSDRECHT M.C.M., HOSTEN L., 1999, “Temperature effects in Bio-Pre-removal”, *Wat. Sci. Tech.*, 39(1), 215-225.

- BAETENS, D., 2000, Enhanced biological phosphorus removal: Modelling and experimental design. Thesis PhD, Universiteit Gent, Belgium, 256 p.
- BARBOSA, S. R., 2004, Tratamento de efluentes em reator de leito fluidizado sequencial em batelada. Dissertação de mestrado, Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis, SC, 165 p.
- BARNARD J., COMEAU Y., 2014, Phosphorus removal in activated sludge. In: JENKINS D., WANNER J., Activated Sludge: 100 Years and Counting, London, Vol. 1, Ed. IWA publishing.
- BARR, J.J., COOK, A.E., BOND, P.L., 2010. Granule formation mechanisms within an aerobic wastewater system for phosphorus removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (22), 7588–7597.
- BASSIN J. P., PRONK M., MUYZER G., KLEEREBEZEM R., DEZOTTI M., VAN LOOSDRECHT M. C. M., 2011, “Effect of Elevated Salt Concentrations on the Aerobic Granular Sludge Process: Linking Microbial Activity with Microbial Community Structure”, *Appl. Environ. Microbiol.* V. 77, p. 7942-7953.
- BASSIN, J. P., 2012, Remoção Biológica de Nutrientes em Sistemas Compactos e Estudo da Diversidade Microbiana por Técnicas de Biologia Molecular. Tese de D.Sc., PEQ/UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro.
- BASSIN, J. P., KLEEREBEZEM, R., DEZOTTI, M., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., 2012, “Simultaneous nitrogen and phosphate removal in aerobic granular sludge reactors operated at different temperatures”, *Water Research*, v. 46, n. 12, p. 3805–3816
- BASSIN, J. P., 2011a, *Novos processos de remoção de nitrogênio*. In: DEZOTTI, M., SANT’ANNA JR, G. L., BASSIN, J. P. (Org.) Processos biológicos avançados para tratamento de efluente e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana, Rio de Janeiro: Editora Interciência.
- BASSIN, J. P., 2011b, *Tecnologia de granulação aeróbia (lodo granular aeróbio)*. In: DEZOTTI, M., SANT’ANNA JR, G.L., BASSIN, J.P (Org.) Processos biológicos avançados para tratamento de efluente e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana. Rio de Janeiro: Editora Interciência.
- BASSIN, J. P., DEZOTTI, M., 2008, Tratamento primário, secundário e terciário de efluentes In: DEZOTTI M., Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos. Rio de Janeiro: E-papers.
- BASSIN, J. P., PRONK, M., KRAAN, R., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2011c, “Ammonium adsorption in aerobic granular sludge, activated sludge and anammox granules”, *Water Research*, v. 45, p. 5257-5265.
- BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, R., DEZOTTI, M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2012a. Measuring biomass specific ammonium, nitrite and phosphate uptake rates in aerobic granular sludge. *Chemosphere* 89, 1161–1168.

BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, R., DEZOTTI, M., VAN LOOSDRECHT, M.C., 2012b. Simultaneous nitrogen and phosphate removal in aerobic granular sludge reactors operated at different temperatures. *Water Res.* 46, 3805–3816.

BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, R., ROSADO, A.S., VAN LOOSDRECHT, M.C., DEZOTTI, M., 2012c. Effect of different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1546–1555.

BASSIN, J.P., PRONK, M., KRAAN, R., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C., 2011. Ammonium adsorption in aerobic granular sludge, activated sludge and anammox granules. *Water Res.* 45, 5257–5265.

BELMONTE, M., VÁZQUEZ-PADÍN, J. R., FIGUEROA, M., FRANCO, A., MOSQUERA-CORRAL, A., CAMPOS, J. L. and MÉNDEZ, R., 2009, “Characteristics of nitrifying granules developed in an air pulsing SBR”, *Process Biochemistry*, v. 44, n. 5, 602-606.

BEUN J.J., VAN LOOSDRECHT M.C.M. and HEIJNEN J.J., 2001, “Nitrogen removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor.”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 75, n. 1, 82-92.

BEUN, J. J.; HENDRIKS, A., VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; MORGENROTH, E.; WILDERER, P. A.; HEIJNEN, J. J., 1999, “Aerobic granulation in a sequencing batch reactor.”, *Water Research*, v. 33, n. 10, 2283-2290.

BEUN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J., 2002, “Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor”, *Water Research*, v. 36, n. 3, 702-712.

BEUN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M.C.; HEIJNEN, J. J., 2000, “Aerobic granulation.”, *Water science and technology*, v. 41, n. 4-5, p. 41-48.

BEUN, J.J., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2002b, “N-removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor”, *Biotechnology and Bioengineering*, v.75, p. 82-92.

BEUN, J.J., HENDRIKS, A., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., MORGENROTH, E., WILDERER, P.A., HEIJNEN, J.J., 1999. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Water Res.* 33, 2283–2290.

BEUN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 2002a, “Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor”, *Water Research*, v. 36, pp. 702-712.

BORTOLLOTTO NETO, A. F. 2004, Estratégias para a nitrificação em reator de leito fluidizado sequencial em batelada. Dissertação de Mestrado, Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis - SC,.

BRADFORD, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

BRAGA J. K., MOTTERAN F., SILVA E. L., VARESCHE M. B. A., 2015, "Evaluation of bacterial community from anaerobic fluidized bed reactor for the removal of linear alkylbenzene sulfonate from laundry wastewater by 454-pyrosequence", *Ecological Engineering*, v. 82, p. 231-240.

BRASIL., 2011, Resolução CONAMA n° 430/11, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, Oficial da União, 18 de março de 2005, p. 58-63.

BRAUNEGG, G. E BONGENSBERGER, B., 1978, "A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass", *Acta Biotechnol.*, v. 6, pp. 29-37.

BRDJANOVIC, D., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HOOIJMANS, C.M., ALAERTS, G.J., HEIJNEN, J.J., 1997. Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal, *J. Environ. Eng.* 123, 144–153.

BRDJANOVIC, D., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HOOIJMANS, C.M., ALAERTS, G.J., HEIJNEN, J.J., 1998. Minimal aerobic sludge retention in biological phosphorus removal systems. *Biotechnol. Bioeng.* 60, 326–332.

CAMPOS, R. H. 2009, Utilização de reator de leito fluidizado trifásico aeróbio em sistema de tratamento combinado de águas residuárias. Dissertação de Mestrado, Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis -SC.

CAMPOS, R. H., 2006, Estudo da remoção de carbono e nitrogênio de efluentes urbanos em um reator de leito fluidizado operado em bateladas sequenciais. Tese de Doutorado, Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis, SC.

CARUCCI, A.; MILIA, S.; DE GIOANNIS, G.; PIREDDA, M. 2008, Acetate-fed aerobic granular sludge for the degradation of chlorinated phenols. *Water Science & Technology*, v.58, n.2, 309-315. ISSN 0273- 1223.

CECCHI, H. M. 2003, Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Editora da UNICAMP: 2° Ed. rev.- Campinas, SP, editora da UNICAMP, 207p.

CHUDOBA, J.; OTTOVA, V.; MADERA, V. 1973, Control of activated sludge filamentous bulking: I. Effect of the hydraulic regime or degree of mixing in an aeration tank. *Water Research* 7(8), 1163-1182.

CHUNG, J.; BAE, W. 2002, Nitrite reduction by a mixed cultura under conditions relevant to shortcut biological nitrogen removal. *Biodegradation*, Dordrecht, v.13, p. 163-70.

COATES J. D., CHAKRABORTY R., LACK J. G., O'CONNOR S. M., COLE K. A., BENDER K. S., ACHENBACH L. A., 2001, "Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*", *Nature*, v. 10, p. 39-43.

- COLE, J. R., Q. WANG, J. A. FISH, B. CHAI, D. M. MCGARRELL, Y. SUN, C. T. BROWN, A. PORRAS-ALFARO, C. R. KUSKE, AND J. M. TIEDJE. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucl. Acids Res.* 42(Database issue):D633-D642; doi: 10.1093/nar/gkt1244
- COLLINS, J. M., CHAVES R. R.; MARQUES D V. DA S., 2009, “Temperature variability over South America”, *J. Clim.*, 22, 5854–5869.
- COLLIVER, B.B., STEPHENSON, T., 2000, “Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers”, *Biotechnology Advances*, v. 18, n. 3, p. 219-32.
- COMA, M., VERAWATY, M., PIJUAN, M.; YUAN, Z., BOND, P. L., 2012, “Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater”, *Bioresource Technology*, v. 103, n. 1, p. 101-108.
- COSTA M. S. 2010, Utilização de lodo proveniente de ETE como adubo para plantas. Dissertação, Universidade regional de Blumenau. Centro de ciências exatas e naturais, Blumenau.
- COSTA, A. P. J., SILVA, A. L., MARTINS, R. S., 2009, Um estudo sobre estações de tratamento de efluentes industriais e sanitários da empresa Dori Alimentos LTDA. Regrad, Marília-SP, v.1, n 2, p. 6-22.
- COSTA, R. H. R.; SOUTO, V. S.; PRELHAZ, A. T. S.; LAMEGO, NETO. L. G., 2008, Utilization of hybrid sequencing batch reactor (HSBR) as a decentralized system of domestic wastewater treatment. *Water Science & Technology*, v. 57, n.12, p. 1951-1956.
- CROCETTI G. R., BANFIELD J. F., KELLER J., BOND P. L., BLACKALL L. L., 2002, “Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes”, *Microbiology*, v. 148, p. 3353-3364.
- CYDZIK-KWIATKOWSKA A., WOJNOWSKA-BARYŁA I., 2011, “Nitrifying granules cultivation in a sequencing batch reactor at a low organics-to-total nitrogen ratio in wastewater”, *Folia Microbiol (Praha)*, v. 56, p. 201–208.
- CYDZIK-KWIATKOWSKA A., ZIELIŃSKA M., 2016; “Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems”, *World J Microbiol Biotechnol*, v. 32, p. 66.
- CYDZIK-KWIATKOWSKA, A., BERNAT, K., ZIELIŃSKA, M., WOJNOWSKA-BARYŁA, I., 2014. Cycle length and COD/N ratio determine properties of aerobic granules treating high-nitrogen wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng.* 17, 1305–1313.
- DANGCONG, P., BERNET, N., DELGENES, J.-P., MOLETTA, R., 1999, “Aerobic granular sludge--a case report”, *Wat. Res.*, v. 33, n. 3, p. 890-893.
- DE KREUK, M. K.; BRUIN, L. M. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M., 2004, “Aerobic granular sludge: From idea to pilot plant”, *IWA workshop Aerobic Granular Sludge*. Wilderer, P.A. (ed), IWA, London. p. 1-12.

- DE KREUK, M.K., 2006. Aerobic Granular Sludge: Scaling up a New Technology. PhD thesis. Delft University of Technology, Delft, p. 199.
- DE KREUK, M.K., BRUIN, L.M.M. 2004, “Aerobic granule reactor technology”, *Water and Wastewater Practitioner Series*, STOWA Report. London: IWA Publishing.
- DE KREUK, M.K., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2005c, “Simultaneous COD, nitrogen and phosphate removal by aerobic granular sludge”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 90, n. 6, p. 761-769.
- DE KREUK, M.K., KISHIDA, N., TSUNEDA, S., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2010. Behavior off polymeric substrates in an aerobic granular sludge system, *Water Res.* 44, 5929–5938.
- DE KREUK, M.K., MCSWAIN, B.S., BATHE, S., Tay, S.T.L., Schwarzenbeck, N., Wilderer, P.A., 2005a, *Discussion outcomes*. In: Aerobic granular sludge, water and environmental management series. Munich: IWA Publishing.
- DE KREUK, M.K., PICIOREANU, C., HOSSEINI, M., XAVIER, J.B., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2007. “Kinetic model of a granular sludge SBR: influences on nutrient removal”. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 97, n. 4, p. 801- 815.
- DE KREUK, M.K., PRONK, M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2005b, “Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures”, *Water Research*, v. 39, p. 4476-4484.
- DE KREUK, M.K., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2004, “Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability”, *Water Scienceand Technology*, v. 49, p. 9-17.
- DE KREUK, M.K., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2006, “Formation of aerobic granules with domestic sewage”. *Journal of Environmental Engineering*, 132(6): 694-697.
- DE KREUK, M.K., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2006, “Formation of aerobic granules with domestic sewage”, *Journal of Environmental Engineering*, v. 132, n. 6, p. 694-697.
- DE OLIVEIRA, A.S., 2006, Tratamento de esgoto pelo sistema de lodos ativados no Município de Ribeirão Preto, SP: Avaliação da remoção de metais pesados. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. “Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003)”. *Water Research*, Amsterdam, v. 38, n.19, p. 4222-4246, 2004.
- DEORSOLA, A. B. 2006, Influência dos cátions (sódio, potássio, cálcio e magnésio) no tratamento biológico de efluentes. Tese de doutorado. COOPE, Rio de Janeiro. 126p.

DERKS, Y. M., 2007, Uso da respirometria para avaliar a influência de fatores operacionais e ambientais sobre a cinética de nitrificação. 100 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

DEZOTTI, M.; LIPPEL; BASSIN J. P., 2011, Processos Biológicos Avançados. Editora Interciência. Rio de Janeiro.

DI IACONI, C., RAMADORI, R., LOPEZ, A., PASSINO, R. 2007, Aerobic granular sludge systems: the new generation of wastewater treatment technologies. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 46, p. 6661-6665.

DI IACONI, C.; DE SANTIS, M.; ROSSETI, S.; RAMADORI, R., 2008, “Technological transfer to demonstrative scale of sequencing batch biofilter granular reactor (SBBGR) technology for municipal and industrial wastewater treatment”, *Water Science & Technology*, v.58, n.2, 367-372.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.

EBRAHIMI, S., GABUS, S., ROHRBACH-BRANDT, E., HOSSEINI, M., ROSSI, P., MAILLARD, J., HOLLIGER, C., 2010, “Performance and microbial community composition dynamics of aerobic granular sludge from sequencing batch bubble column reactors operated at 20°C, 30°C and 35°C”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, p. 155-1568.

ECKENFELDER W. e MUSTERMAN J., 1995, “Activated sludge treatment of industrial wastewater”, *Water Environment*. vol. 46, p. 145-147.

ECKENFELDER, W.W., GRAU, P., 1998. The activated sludge process design and control: theory and practice. *Technomic Publishing Company*, first ed., Lancaster, PA, USA.

EIKELBOOM, D. H., 2000. Process control of activated sludge plants by microscopic investigation, *IWA Publishing*, First ed., London.

EPA - United States Environmental Protection Agency, 1983, Ambient Monitoring Guidelines for prevention of Significant Deterioration (PSD) – a promising biological process. 832/R-83-102.

EPA - United States Environmental Protection Agency, 1987, Biological criteria for the protection of aquatic life. Division of Water Quality Monitoring Assessment. Columbus, Ohio, v. 1-III, 120 p.

EPA - United States Environmental Protection Agency, 1993, Manual Nitrogen Control. Technomic Publishing, Washington, USA, p.311.

EPA - United States Environmental Protection Agency, 2010, Nutrient Control Design Manual. p. 369.

ERDAL U. E., 2002, “The Effects of Temperature on System Performance and Bacterial Community Structure in a Biological Phosphorus Removal System”, PhD dissertation Civil and Environmental Engineering Department, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

ERDAL U. G., ERDAL Z. K., RANDALL C. W., 2003; “The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance”, *Water Sci Technol.*, v. 47, p. 1-8.

ERDAL U. G., ERDAL Z. K., DAIGGER G. T., RANDALL C. W., 2007, “Is it PAO-GAO competition or metabolic shift in ebpr system? Evidence from an experimental study”, *Water Environment Federation*, v. 70, p. 4966-4976.

ERDAL, Z. K., MENDENHALL, T. C., NEELY, S. K., WAGONER, D. L., E QUIGLEY, C, 2003, Implementing Improve mentsina North Carolina Residuals Management Program. Proceedings, WEF/AWW A Joint Residualsand Biosolids Management Conference.

ETTERER, T.; WILDERER, P. A., 2001, “Generation and properties of aerobic granular sludge”, *Water Science & Technology*, v. 43, n. 3, p. 19-26.

FELFÖLDI T., KÉKI Z., SIPOS R., MÁRIALIGETI K., TINDALL B. J., SCHUMANN P, TÓTH E. M. 2011, “*Ottowia pentelensis* sp. nov., a floc-forming betaproteobacterium isolated from an activated sludge system treating coke plant effluent”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p. 2146-2150.

FERGUSON S. J. , 1982, “Is a proton-pumping cytochrome oxidase essential for energy conservation in *Nitrobacter*?”, *Full-length article*, v. 146, p.239-243.

FERREIRA, E. S., 2000, “Cinética química e fundamentos dos processos de nitrificação e desnitrificação biológica”, In: *Congresso Interamericano De Engenharia Sanitária e Ambiental*, Porto Alegre. Anais. ABES:Rio de Janeiro, CD-ROM.

FIGUEROA, M., VAL DEL RÍO, A., CAMPOS, J.L., MÉNDEZ, R., MOSQUERA-CORRAL, A., 2015. Filamentous bacteria existence in aerobic granular reactors. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 841–51.

FIGUEROA, M.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R. 2008, “Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors”, *Water Science & Technology*, v.58, n.2, 479-485.

FIGUEROA, M.; VAL DEL RÍO, A.; MORALES, N.; CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MENDEZ, R., 2009, “Nitrogen removal in aerobic granular systems”, In: *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution, Principles and Engineering*. Cervantes, F.J. (ed), IWA Publishing, London. p. 373-401.

FLOWERS, J.J., HE S., YILMAZ, S., NOGUERA D.R., MCMAHON, K.D., 2009, “Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated

by different 'Candidatus Accumulibacter' clades, Environ", *Microbiol. Rep.* v. 1, p. 583–588.

FRANCA, R.D.G., VIEIRA, A., MATA, A.M.T., CARVALHO, G.S., PINHEIRO, H.M., LOURENÇO, N.D., 2015. Effect of an azo dye on the performance of an aerobic granular sludge sequencing batch reactor treating a simulated textile wastewater. *Water Res.* 85, 327–336.

FRA-VAZQUEZ A., MORALES N., FIGUEROA M., VAL DEL RIO A., REGUEIRO L., CAMPOS J. L. MOSQUERA-CORRAL A., 2016, "Bacterial community dynamics in long-term operation of a pilot plant using aerobic granular sludge to treat pig slurry", *Biotechnology Progress*, v. 32, p. 1212–1221.

GAUDY, A. F.; GAUDY, E. T. 1988. Elements of Bioenvironmental Engineering. San Jose, California: Engineering Press, Inc., p. 592.

GERARDI, M.H. 2006. Wastewater Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

GOEL R., SANHUEZA P., NOGUERA D., 2005, "Evidence of Dechloromonas sp. participating in enhanced biological phosphorous removal (EBPR) in a bench-scale aerated-anoxic reactor". *Proc Water Environ Fed.*, v. 41, p.3864–3871.

GONÇALVES, R. F.; JORDÃO, E. P.; SOBRINHO, P. A, 2003, Desinfecção de efluentes sanitários. Vitória: Departamento de Saneamento Ambiental da UFES.

GONZALEZ-GIL G., HOLLIGER C., 2011, "Dynamics of microbial community structure of and enhanced biological phosphorus removal by aerobic granules cultivated on propionate or acetate", *Appl Environ Microbiol*, v. 80, p. 41-51.

GONZALEZ-GIL, G., HOLLIGER, C., 2011. Dynamics of microbial community structure of and enhanced biological phosphorus removal by aerobic granules cultivated on propionate or acetate. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (22), 8041–8051.

GONZALEZ-GIL, G., HOLLIGER, C., 2014. Aerobic granules: microbial landscape and architecture, stages, and practical implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (11), 3433–3441.

GRADY, C.P.L.; LIM, H., 1980, "Biological wastewater treatment: theory and application", New York: Marcel Dekker.

GUIMARÃES, A.C., 2002, *Respirometria aplicada ao sistema de lodo ativado: Influência de interrupções da oxigenação sobre a viabilidade do lodo ativado.* Dissertação de Mestrado. 84p. Campina Grande-PB: UFCG.

HAGOPIAN, D.S., RILEY, J.G., 1998, "A closer look at the bacteriology of nitrification" *Aquacultural Engineering*, v.18, p. 223-244.

HALIM, M.H.A., ANUAR, A.N., JAMAL, N.SA., AZMI, S.I., UJANG, Z., BOB, M.M., 2016. Influence of high temperature on the performance of aerobic granular sludge in biological treatment of wastewater. *J. Environ. Manag.* 271–280.

- HALING-SORENSEN, B; JORGENSEN, S.E. 1993. *The removal of nitrogen compounds from wastewater*. Amsterdam, London, New York, Tokio: Elsevier, 443p.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D., 2001. “PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis”. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 1998. Method for Acquiring Grain-Shaped Growth of a Microorganism in a Reactor, US and European patent - WO 98/37027, Technische Universiteit Delft, The Netherlands.
- HENRIET O., MEUNIER C., HENRY P., MAHILLON J. 2017, “Filamentous bulking caused by *Thiothrix* species is efficiently controlled in full-scale wastewater treatment plants by implementing a sludge densification strategy”, *Sci Rep.*; 7: 1430.
- HENRIET O., MEUNIER C., HENRY P., MAHILLON J., 2016. Improving phosphorus removal in aerobic granular sludge processes through selective microbial management. *Bioresource Technology* . 211, 298–306.
- HIGA, M. F. 2005, Estudo de tratabilidade de efluentes de indústria de catalisadores químicos por lodos ativados por batelada. Dissertação. Universidade de Campinas. Campinas.
- HOOPER A. B., VANNELLI T., BERGMANN D. J., ARCIERO D. M., 1997, “Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria”, *Antonie van Leeuwenhoek*, v.71, p. 59–67.
- HORAN, N. J., 1990, Biological wastewater treatment systems. Theory and operation.:Jhon Wiley & Sons. Chichester,
- HU M., WANG X., WEN X., XIA Y., 2012, “Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis”, *Bioresour Technol*, v. 7,p. 2-9.
- HÜBNER, A.P., 2008, Reator aeróbico de biogrânulos e lagoa de aguapé como biotecnologia para o tratamento de águas residuais dasuicultura. Tese. Curso de Doutorado em Ciência do Solo da Universidade Federal de Santa Maria, RS.
- IRVINE, R.L. & BUSH, A. W., 1979, “Sequencing batch biological reactors – an overview”, *Journal of the Water Pollution Control Federation*, v.51, n.2, p. 264-273.
- IVANOV, V., WANG, X.H. TAY, S.T., TAY, J.H., 2006. Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 374–381.
- IVANOV, V.; TAY, S. T. L.; LIU, Q. S.; WANG, X. H.; WANG, Z. W.; TAY, J. H., 2005, “Formation and structure of granulated microbial aggregates used in aerobic wastewater treatment”, *Water Science &Technology*, v. 52, n. 7, p. 13-19.

IVANOV, V.; WANG, X. H.; TAY, S. T. L.; TAY, J.H., 2006, “Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 70, p. 374-381.

IWPC, 1987, Institute of Water Pollution Control Unit processes activated sludge. Maidstone, IWPC, p. 137.

JONES, W., SCHROEDER, E., WILDERER, P., 1990a, “Denitrification In A Batch Wastewater Treatment System Using Sequestered Organic Substances”. *Research Journal WPCF*, v. 62, Nn. 3, p. 259-267.

JONES, W., WILDERER, P., SCHROEDER, E., 1990, “Operation of three-stage SBR System for nitrogen removal from wastewater”, *Research Journal WPCF*, v. 62, n. 3, p. 268-274.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A., 1995, Tratamento de esgotos domésticos. 3ª ed. São Paulo: ABES-Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.

JORDAO, E. P.; PESSOA, C. A., 2005, Tratamento de Esgotos Domésticos. 4. ed. Belo Horizonte: Segrac Editora, v. 1, 906 p.

JOSHI D. R., ZHANG Y., TIAN Z., GAOY., YANG M., 2016, “Performance and microbial community composition in a long-term sequential anaerobic-aerobic bioreactor operation treating coking wastewater”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 8191–8202.

JUNGLES, M. K.; FIGUEROA, M.; MORALES, N.; RÍO, A. Val., COSTA, R. H. R.; Campos, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A. ; MÉNDEZ, P., 2011, “Start up of a pilot scale aerobic granular reactor for organic matter and nitrogen removal”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 86, n. 5, p. 763–768.

JVENN, P. B, JÉRÔME M., FRÉDÉRIC E., CHRISTOPHE D. AND CHRISTOPHE K. J. 2014. An interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, 15:293 doi:10.1186/1471-2105-15-293-Abstract/FREE Full Text

KAMIYAMA, H.; TSUTIYA, M. T., 1992, Lodo ativado por batelada; um processo econômico para o tratamento de esgotos em estações de grande porte. *Revista DAE*. v.52, n.165, p.1-7.

KETCHUM, L. H., 1996, “Design and physical features of SBR reactors”, In: *First IAWQ Specialized Conference on Sequencing Batch Reactor Technology*. Munich, Germany, p. 7-14.

KISHIDA, N., TSUNEDA, S., KIM, J.H., SUDO, R., 2009, “Simultaneous nitrogen and phosphorus removal from high-strength industrial wastewater using aerobic granular sludge”, *Journal of Environmental Engineering*, v. 135, pp. 153-158.

KISHIDA, N., TSUNEDA, S., KIM, J.H., SUDO, R., 2009. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal from high-strength industrial wastewater using aerobic granular sludge. *J. Environ. Eng.* 135, 153–158.

KONG Y., NIELSEN J. L. , NIELSEN P. H., 2004, “Microautoradiographic study of Rhodocyclus-related polyphosphate-accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants”, *Appl Environ Microbiol*, v. 53, p. 83-90.

KONG Y., XIA Y., NIELSEN J.L., NIELSEN P.H., 2007, “Structure and function of the microbial community in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant”, *Microbiology*, v. 153, p. 4061–4073.

LEMAIRE, R., WEBB, R.I., YUAN, Z., 2008, “Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater”, *The ISME J.* 2, 528–541.

LI, A.-J., YANG, S.-F., LI, X.-Y., GU, J.-D., 2008, “Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates”, *Water Research*, v.42, p. 3552-3560.

LI, Z., KUBA, T., KUSUDA T., 2006, “The influence of starvation phase on the properties and the development of aerobic granules”, *Enzyme Microb. Technol.* 38 670–674.

LIN, L.H., JIAN, L.W., XIANG, H.W., YI, Q., 2005, “The formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactor (SBR) by seeding anaerobic granules”, *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1-7.

LIN, Y.M., BASSIN, J.P., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2012, “The contribution of exopolysaccharides induced struvites accumulation to ammonium adsorption in aerobic granular sludge”, *Water Research*, v. 46, n. 4, p. 986-992.

LIU, Y., LIU, Q.-S., 2006. Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Biotechnol. Adv.* 24, 115–127.

LIU, Y., SHI, H., XIA, L., SHI, H., SHEN, T., WANG, Z., WANG, G., WANG, Y., 2010, “Study of operational conditions of simultaneous nitrification and denitrification in a Carrousel oxidation ditch for domestic wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 901-906.

LIU, Y., SHU, F.Y., TAY, J.-H., 2002, “Aerobic granules novel zinc biosorbent”, *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p. 548-551.

LIU, Y., TAY, J.-H., 2002, “The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge”, *Water Research*, v. 36, pp. 1653-1665. Referências 196.

LIU, Y., TAY, J.-H., 2004, “State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment”, *Biotechnol. Adv.* , v. 22, p. 533-563.

LIU, Y., XU, H., YANG, S.F., TAY, J.-H., 2003, “A general model for biosorption of Cd²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ by aerobic granules”, *Journal of Biotechnology*, v. 102, p. 233-239.

- LIU, Y.Q, MOY, B.Y.P., TAY J.H., 2007, “COD removal and nitrification of low-strength domestic wastewater in aerobic granular sludge sequencing batch reactors”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 23-28.
- LOCHMATTER, S., GONZALEZ-GIL, G., HOLLIGER, C., 2013. “Optimized aeration strategies for nitrogen and phosphorus removal with aerobic granular sludge”, *Water Res.* v. 47, n. 16, p. 6187 - 6197.
- LOPEZ-VAZQUEZ, C.M., HOOIJMANS, C.M., BRDJANOVIC, D., GIJZEN, H.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2009, “Temperature effects on glycogen accumulating organisms”, *Water Research*, v. 43, p. 2852-2864.
- LOPEZ-VAZQUEZ, C.M., SONG, Y.I., HOOIJMANS, C.M., BRDJANOVIC, D., MOUSSA, M.S., GIJZEN, H.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2008, “Temperature effects on the aerobic metabolism of glycogen accumulating organisms”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, p. 295-306.
- LUO J. HAO T., WEI L., MACKEY H. R., LIN Z., CHEN G. H., 2014, “Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge”, *Water Research*, v. 62, p. 127-135.
- MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J., 1997, *Brock biology of microorganisms*. 8^a ed., New York: Prentice Hall.
- MARA, D., 2004. Domestic wastewater treatment in developing countries, first ed., Earthscan, London.
- MARCHETTO, M. , 2001, Remoção de nutrientes do efluente de reator anaeróbio utilizando reatores microaeróbio e com aeração intermitente seguidos de flotação por ar dissolvido São Carlos. 238 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B., 1999, Bioquímica Básica. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 360p.
- MCMAHON C. D., HE S., OEHMENA., 2010, “The microbiology of phosphorus removal”, in: SEVIOUR R., NIELSEN P. H., “Microbial Ecology of Activated Sludge”, *IWA Publishing, London, New York*.
- MCSWAIN, B. S.; IRVINE, R. L.; HAUSNER, M.; WILDERER, P. A., 2005, Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1051-1057.
- MCSWAIN, B.S., IRVINE, R.L., WILDERER, P.A., 2004. Effect of intermittent feeding on aerobic granule structure. *Water Sci. Technol.* 49, 19–25.
- MESQUITA, D. P., LEAL, C., CUNHA, J. R., OEHMENC, A., AMARAL, L., REIS, M. A. M., FERREIRA, E. C., 2013, “Prediction of intracellular storage polymers using quantitative image analysis in enhanced biological phosphorus removal systems”, *Analytica Chimica Acta*, v. 770, n. 3, p. 36 – 44.

- METCALF & EDDY, 1991, *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse*. 3^aed., New York: McGraw Hill.
- METCALF & EDDY, 2003, *Wastewater engineering: treatment and reuse*, 4^a ed., New York: McGraw Hill.
- MINO, T., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1998. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* 32, 3193–3207.
- MISHIMA, K., NAKAMURA, M., 1991, Self-immobilization of aerobic activated sludge - a pilot study of the aerobic upflow sludge blanket process in municipal sewage treatment. *Water Science & Technology*, 23: 981–990.
- MORALES, N., 2006, Obtención de biomasa granular en reactores en continuo. Trabajo de Investigación Tutelado de la Universidad de Santiago de Compostela.
- MORGENROTH, E., SHERDEN, T., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., WILDERER, P.A., 1997, “Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor”, *Water Research*, v. 31, pp. 3191-3194.
- MORGENROTH, E., SHERDEN, T., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., WILDERER, P.A., 1997. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 31, 3191– 3194.
- MOSQUERA-CORRAL, A. DE KREUK, M.K., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2005. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor, *Water Res.* 39, 2676–2686.
- MOSQUERA-CORRAL, A., DE KREUK, M.K., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2005, “Effects of oxygen concentration on N-removal in anaerobic granular sludge reactor”, *Water Research*, v. 39, pp. 2676-2686.
- MOSQUERA-CORRAL, A.; MONTRAS, A.; HEIJNEN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M., 2003, “Degradation of polymers in a biofilm airlift suspension reactor”, *Water Research*, v. 37, n. 3, p. 485-492.
- MOTA, F. S. B., VON SPERLING, M., 2009, Nutrientes de esgoto sanitários: utilização e remoção. Rio de Janeiro: ABES, 425p.
- MOUSSA, M.S., HOOIJMANS, C.M., LUBBERDING, H.J., GIJZEN, H.J., VAN LOOSDRECHT M.C.M., 2005, “Modelling nitrification, heterotrophic growth and predation in activated sludge”, *Water Research*, v. 39, pp. 5080-5098.
- MUNSON, B. R., YOUNG, D. F., OKIISHI, T. H., 1997, Fundamentos da Mecânica dos Fluidos – tradução da 2^a edição americana, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, Brasil, v.1, 418p.
- NAZ I., HODGSON D., SMITH A., MARCHESI J., AHMED S., AVIGNONE-ROSSA C., SAROJ D., 2016, “Effect of the chemical composition of filter media on the

microbial community in wastewater biofilms at different temperatures”, *RSC Adv.* v. 6, p. 104345–104353.

NG, W.J., SIM, T.S., ONG, S.L., NG, K.Y., RAMASAMY, M., TAN, K.N., 1993, “Efficiency of sequencing batch reactor (SBR) in the removal of selected microorganisms from domestic sewage”, *Water Research*, v. 27, p. 1591-1600.

NI, B.J., YU, H.Q., SUN, Y.J., 2008, “Modeling simultaneous autotrophic and heterotrophic growth in aerobic granules”, *Water Research*, 42: 1583-1594.

NI, B., XIE, W., LIU, S., YU, H., WANG, Y., WANG, G., DAI, X., 2009, “Granulation of activated sludge in a pilot-scale sequencing batch reactor for the treatment of low-strength municipal wastewater”, *Water Research*, 43: 751-761.

NIELSEN P.H., MIELCZAREK A. T., KRAGELUND C., NIELSEN J. L., SAUNDERS A. M., KONG Y., HANSEN A. A., VOLLERSEN J., 2010, “A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants”, *Water Res.* v.44, p. 70-88.

NOGUEIRA, R.; LAZAROVA, V.; MANEM, J.; MELO, L.F., 1998, “Influence of Dissolved Oxygen on the Nitrification Kinetics in a Circulating Bed Biofilm Reactor”, *Bioprocess Engineering*, n.19, p. 441 –449,

OEHMEN, A., LEMOS, P.C., CARVALHO, G., YUAN, Z., KELLER, J., BLACKALL, L.L., REIS, M.A.M., 2007, “Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale”, *Water Research*, v. 41, p. 2271- 2300.

OEHMEN, A., SAUNDERS, A.M., VIVES, M.T., YUAN, Z., KELLER, J., 2006, “Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources”, *Journal of Biotechnology*, v. 123, pp. 22-32.

OEHMEN, A., VIVES, M.T., LU, H., YUAN, Z., KELLER, J., 2005, “The effect of pH on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms”, *Water Research*, v. 39, pp. 3727-3737.

OEHMEN, A., YUAN, Z., BLACKALL, L.L., KELLER, J., 2004, “Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms”, *Water Science and Technology*, v. 50, pp. 139-144.

OLESZKIEWICZ, J.A., BARNARD, J.L., 2006. Nutrient removal technology in North America and the European Union: a review. *Water Qual. Res. J. Canada.* 41, 449–462.

PAN, S. 2003, Inoculation of microbial granular sludge under aerobic conditions. Ph. D. Thesis. Nanyang Technological University, Singapore.

PAN, Y., YE, L., NI, B.J., YUAN, Z., 2012, “Effect of pH on N₂ O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers”, *Water Research*, V.46, pp. 4832-4840.

PARSHINA S. N, KLEEREBEZEM R., SANZ J. L., LETTINGA G., NOZHEVNIKOVA A. N, KOSTRIKINA N. A, LYSENKO A. M., STAMS A. J., 2003, “Soehngenia saccharolytica gen. nov., sp. nov. and Clostridium amygdalinum sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria”, *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 53, p. 1-9.

PICKBRENNER, K., 2002, Uso de reator sequencial em batelada (RSB) para pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

PIJUAN, M., GUIASOLA A., BAEZA J. , CARRERA J., 2005, “Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake: Influence of PAO intracellular storage compounds”, *Biochemical Engineering Journal*, Manchester, v. 26, n. 2-3, p. 184-190.

PITA, F. A. G. ,2002, Tratamento de águas residuais domésticas. Coimbra: Apostila volume II; Universidade de Coimbra.

PORTO, A. L., 2007, Uso da respirometria para caracterização da atividade metabólica de bactérias heterotróficas. Dissertação de Mestrado. 76 p. Campina Grande-PB: UFCG.

PRONK, M., ABBAS, B., AL-ZUHAIRY, S.H., KRAAN, R., KLEEREBEZEM, R., van Loosdrecht, M. C., 2015. Effect and behaviour of different substrates in relation to the formation of aerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (12), 5257–5268.

PRONK, M., BASSIN, J.P., DE KREUK, M.K., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C., 2014. Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1339–1348.

PRONK, M., BASSIN, J.P., KREUK, M.K., KLEEREBEZEM, R., LOOSDRECHT, M.C.M., 2013, “Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1e10.

PRONK, M., DE KREUK, M.K., DE BRUIN, B., KAMMINGA, P., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C., 2015b. Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment, *Water Res.* 84, 207–217.

PUJOL, R., HAMON, M., KANDEL, X., LEMMEL, H., 1994, “Biofilters: flexible, reliable biological reactors”, *Water Science and Technology*, v. 29, pp. 33-38.

QIN, L., LIU, Y., 2008, “Aerobic granulation at different settling times. Wastewater purification: aerobic granulation in sequencing batch reactors”, *Boca Raton: CRC Press*, 51-67.

QIN, L., TAY, J.-H., LIU, Y., 2004, “Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors”, *Process Biochemistry*, v. 39, pp. 579-584.

- QUAN Z., IM W., LEE S., 2006, "Azonexus caeni sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1043-1046.
- RANDALL, C. W., 1992, Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal, Lancaster: Ed Lancaster Technomic Publishing Inc. 420 p.
- REDDY, M., 1998, Biological and Chemical Systems for Nutrient Removal: A Special Publication, Alexandria. WEF, 1998. 399 p. ISBN 1-57278-123-8.
- RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HANDLEY, P.S., 2004, "Influence of growth environment on coaggregation between freshwater biofilm bacteria", *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 1367-1373.
- RIIS, V., E MAI, V. , 1988, "Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis", *Journal of Chromatography*, v. 445, pp. 285-289.
- SAHA P., KRISHNAMURTHI S., MAYILRAJ S., PRASAD G. S., BORA T. C., CHAKRABARTI T., 2005, "Aquimonas voraii gen. nov., sp. nov., a novel gammaproteobacterium isolated from a warm spring of Assam, India", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 1491-1495.
- SALINERO K. K., KELLER K., FEIL W. S., FEIL H., TRONG S., DI BARTOLO G., LAPIDUS A., 2009, "Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation", *BMC Genomics*, v. 10, p. 351.
- SANT'ANNA JR., G.L., 2010, Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 398 p.
- SAUNDERS A. M., ALBERTSEN M., VOLLERTSEN J., NIELSEN P. H., 2016, "The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms", *Isme J.*, v. 10, p. 11-20.
- SCHMIDELL, W., SOARES, H. M., ETCHEBEHERE, C., MENES, R. J., BERTOLA, N. C., CONTRERAS, E. M., 2007, "Tratamento biológico de águas residuárias". Editora Tribo da ilha: Florianópolis.
- SCHROEDER, E. D. , 1982, "Design of sequencing batch reactor activated sludge process". *Civil Engineering for Practicing and Design Engineers*, v. 2, p. 33-44.
- SCHWARZENBECK, N., BORGES, J.M., WILDERER, P.A., 2005, "Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, pp. 711-718.
- SCHWARZENBECK, N., ERLEY, R., WILDERER, P.A., 2004, "Aerobic granular sludge in an SBR- system treating wastewater rich in particulate matter", *Water Science & Technology*, v. 49, n. 11-1, p. 41-46.

- SEDLAK, R., 1991, *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater*. 2ªed., New York: Lewis Publishers.
- SEVIOUR T., YUAN Z., VAN LOOSDRECHT M. C. , LIN Y., 2012, Aerobic sludge granulation: a tale of two polysaccharides?, *Water Res.*, v. 48, p. 03-13.
- SILVA, C. L.; BASSI, N. S. S.; NASCIMENTO, D. E., 2011, A implementação de políticas públicas pelas instituições públicas de pesquisa: um estudo sobre pesquisas e tecnologias da Embrapa suínos e aves para mitigação do impacto ambiental da suinocultura no oeste catarinense. *Espacios*, Caracas, v. 32, n. 4, p. 10.
- SONG Z., PAN Y., ZHANG K., REN N., WANG A., 2010, “Effect of seed sludge on characteristics and microbial community of aerobic granular sludge”, *J Environ Sci*, v. 22,p. 2-8.
- SOUSA, J. T. e FORESTI, E., 1995, “Domestic Sewage Treatment in a UASB-SBR Reactor system.International Symposium on Technology Transfer” *IAWQ*, Salvador, BA, pp. 129-140.
- SOUZA, C. F., 2001, Biodigestão anaeróbia de dejetos de suínos: obtenção de dados e aplicação no desenvolvimento de um modelo dinâmico de simulação da produção de biogás. 2001. 140f. Tese (Doutorado em Produção Animal) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- STEINBUCHER, A., FUCHTENBUSCH, B., 1998, “Bacterial and other biological systems for polyester production”, *Trends Biotechnol*, v16, pp. 419-427.
- SUN, F.Y., YANG, C.Y., LI, J.Y., YANG, Y.J., 2006, “Influence of different substrates on the formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactors”, *Journal of Environmental Sciences*, 18 (5): 864-871.
- TAY, J.-H., TAY, S.T.-L., YU L., YEOW, S.K. e IVANOV, V., 2006, Structure of aerobically grown microbial granules En: *Biogranulation technologies for wastewater treatment*, Waste management series. Elsevier, Oxford. 115-134.
- TAY, J.-H., JIANG, H.L., TAY, S.T.L., 2004, “High-rate biodegradation of phenol byaerobically grown microbial granules”, *Journal of Environmental Engineering*, v. 130,pp. 1415-1423.
- TAY, J.-H., LIU, Q.S., LIU, Y., 2001, “Microscopic observation of aerobic granulationin sequential aerobic sludge blanket reactor”, *Journal of Applied Microbiology*, v. 91,pp. 168-75.
- TAY, J.-H., LIU, Q.S., LIU, Y., 2002, “Aerobic granulation in sequential sludgeblanket reactor”, *Water Science and Technology*, v. 46, pp. 13-18.
- TAY, J.H., YAN, Y.G., 1996, “Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of upflow anaerobic sludge blanket reactor”, *Water Environment Research*, v. 68, n. 7, p. 1140-1150.

TCHOBANOGLIOUS, G., BURTON, F., 1991, Wastewater Engineering Treatment, Disposal, and Reuse. Metcalf & Eddy, Inc. Series: McGraw-Hill Series in Wastewater Resources and Environmental Engineering. 3rd Edition, McGraw-Hill, Inc., New York N. Y. USA.

TERASHIMA M., YAMA A., SATO M., YUMOTO I., KAMAGATA Y., KATO S., 2016, “Culture-Dependent and -Independent Identification of Polyphosphate-Accumulating *Dechloromonas* spp. Predominating in a Full-Scale Oxidation Ditch Wastewater Treatment Plant”, *Microbes Environ*, v. 31, p. 449–455.

THANS, F.C., 2008, Controle operacional de reator em bateladas seqüenciais (RBS): ajustes na concentração de oxigênio dissolvido visando à remoção de nutriente. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

THWAITES, B.J., REEVE, P., DINESH, N., SHORT, M.D., VAN DEN AKKER, B., 2017. Comparison of an anaerobic feed and split anaerobic-aerobic feed on granular sludge development, performance and ecology. *Chemosphere* 172, 408–417.

TIJHUIS, L., REKSWINKEL, E., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1994a, “Dynamics of population of biofilm structure in the biofilm airlift reactor for carbon and nitrogen removal”, *Water Science and Technology*, v. 29, pp. 337-384.

TIJHUIS, L., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., 1994b, “Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms in small suspended particles in airlift reactors”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 595-608.

TOH, S.K., TAY, J.-H., MOY, B.Y.P., TAY, S.T.L., 2003, “Size-effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, pp. 687-695.

TSUNEDA, S., NAGANO, T., HOSHINO, T., EJIRI, Y., NODA, N., HIRATA, A., 2003, “Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor”, *Water Research*, v. 37, pp. 4965- 4973.

UEMOTO, H.; SAIKI, H., 2000, “Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*”, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 4224-4228.

VALADÃO, G.S., 2004, Separação sólido líquido. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia de Minas da UFMG, 77p.

VAN HAANDEL, A. C. e VAN DER LUBBE, J., 2007, Handbook Biological Wastewater Treatment, design and optimization of activate sludge systems.

VAN HAANDEL, A.; LETTINGA, G., 1994, Tratamento anaeróbio de esgotos: Um manual para regiões de clima quente. Campina Grande.

VAN HAANDEL, A.C., MARAIS, G.O., 1999, O comportamento do sistema de lodo ativado – teoria e aplicação para projeto e operação, Campina Grande: Epgraf, 472 p.

- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., BRANDSE, F.A.M., DE VRIES, A.C., 1998, "Upgrading of wastewater treatment processes for integrated nutrient removal – The BCFS process", *Water Science and Technology*, v. 37, pp. 209-217.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HOOIJMANS, C.M., BRDJANOVIC, D., HEIJNEN, J.J., 1997, "Biological phosphate removal processes", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, pp. 289-296.
- VAZOLLER, R. F.; GOMES, L. P.; VILLAS-BOAS, D. M., BALDOCHI, V. M. Z.; BADRA, R. J.; POVINELLI, J., 2001, "Biodegradability potential of two experimental landfills in Brazil", *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 87-92.
- VILLASEÑOR, J.C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., PICIOREANU, C., HEIJNEN, J.J., 2000, "Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor", *Water Science and Technology*, v. 41, pp. 323-330.
- VILLASEÑOR, J.C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., PICIOREANU, C., HEIJNEN, J.J., 2000, "Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor", *Water Science and Technology*, v. 41, pp. 323-330.
- VISHNIAC, W., SANTER, M., 1957. The thiobacilli, *Bacteriol. Revs.* 21, 95–213.
- VON SPERLING, M. 2005. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Vol. 1, 3ª edição, DESA, Ed. UFMG.
- VON SPERLING, M., 1996, Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos, Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. 2ª ed., v. 1, Belo Horizonte: Editora UFMG.
- VON SPERLING, M., 1997, Lodos ativados. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, v. 4. Belo Horizonte, 116 pg.
- VON SPERLING, M., 2001, Dimensionamento de lodos ativados por batelada utilizando os princípios da teoria do fluxo de sólidos. Eng. Sanitária e Ambiental, Vol. 6, Nº 3.
- VON SPERLING, M., 2002, Lodos Ativados – Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v.4. 2.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade de Minas Gerais. 428 p.
- VON SPERLING, M., 2008. Standards for Wastewater Treatment in Brazil in: Schmidt, M., Glasson, J., Emmelin, L., Helbron, H. (Eds.) Standards and Thresholds for Impact Assessment, first ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, pp. 125-132.
- WANG, F., LIU, Y.H., YANG, F.L., ZHANG, X.W., ZHANG, H.M., 2004, "Study on the stability of aerobic granules in SBAR-effect of superficial upflow air velocity and carbon source" In: *IWA Workshop on Aerobic Granular Sludge*, 1, Munich, Germany.
- WANG, F., LU, S., WEI, Y., JI, M., 2009, "Characteristics of aerobic granule and nitrogen and phosphorus removal in a SBR", *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, p. 1223-1227.

WANG, F., YANG, F.L., ZHANG, X.W., LIU, Y.H., ZHANG, H.M., ZHOU, J., 2005, "Effects of cycle time on properties of aerobic granules in sequencing batch airlift reactor", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 1379-1384.

WANG, J., PENG, Y., WANG, S., GAO, Y., 2008, "Nitrogen removal by simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in a sequence hybrid biological reactor", *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 16, n. 5, p. 778-784.

WEBER S. D., LUDWIG W., SCHLEIFER, K.-H. e FRIED, J. , 2007, "Microbial Composition and Structure of Aerobic Granular Sewage Biofilms", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n.19, 6233–6240.

WEISSBRODT, D., GABUS, S., LOCHMATTER, S., ROHRBACH, E. ROSSI, P., EBRAHIMI, S., HOLLIGER., CHRISTOF., , 2010, "Predominance of zoogloea sp. during aerobic granular sludge biofilms development for wastewater treatment", *Ecole polytechnique eederale delausanne*, v 69, p. 24-25.

WEISSBRODT, D.G., LOCHMATTER, S., EBRAHIMI, S., ROSSI, P., MAILLARD, J., HOLLIGER, C., 2012. Bacterial selection during the formation of early-stage aerobic granules in wastewater treatment systems operated under wash-out dynamics. *Front. Microbiol.* 3, 1–22.

WEISSBRODT, D.G., SCHNEITER, G.S., FURBRINGER, J.M., HOLLIGER, C., 2013b. Identification of trigger factors selecting for polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Water Res.* 47 (19), 7006–7018.

WENTZEL M.C., DOLD P.L., EKAMA G.A. AND MARAIS G.V.R., 1990, "Biological excess phosphorus removal - Steady state process design", *Water SA*, v.16, n. 1, 29-48.

WENTZEL, M.C., COMEAU, Y., EKAMA, G.A., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., BRDJANOVIC, D., 2008. Enhanced biological phosphorus removal, in: Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M. Ekama, G.A., Brdjanovic, D. (Eds.), *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*, IWA Publishing, London, pp.154–220.

WHANG L. M., PARK J. K., 2006, "Competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in enhanced-biological-phosphorus-removal systems: effect of temperature and sludge age", *Water Environ Res.*, v. 78, p. 4-11.

WILLIAMS T. M., UNZ R. F., 1985, "Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 273–282.

WILLIAMS T. M., UNZ R. F., 1985a, "Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: characterization of Thiobrix, Beggiatoa, and Eikelboom type 021N strains. *Appl Environ Microbiol.* v. 49, p. 887-898.

WINKLER, M.K., BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, R., VAN DER LANS, R.G., VAN LOOSDRECHT, M.C., 2012. "Temperature and salt effects on settling velocity in granular sludge technology", *Water Res.* v. 46, p. 897–902.

WINKLER, M.-K.H., BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, R., DE BRUIN, L.M.M., VAN DEN BRAND, T.P.H., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2011, "Selective sludge removal in a segregated aerobic granular biomass system as a strategy to control PAO/GAO competition at high temperatures", *Water Research*, v. 45, pp. 3291-3299.

WINKLER, M.-K.H., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., 2012, "Integration of anammox into the granular sludge process for main stream wastewater treatment at ambient temperatures", *Water Research*, v. 46, pp. 136-144.

WRC, Water Research Commission, 1984, Theory, design and operation of nutrient removal activated sludge processes. África do Sul: WRC, 116 p.

WUERTZ, S. BISHOP, P., WILDERER, P., 2003. *Biofilms in wastewater treatment an interdisciplinary approach*, IWA publishing, London.

YAN, L. ZHANG, S., HAO, G., ZHANG, X., REN, Y., WEN, Y., GUO, Y. ZHANG, 2016. Simultaneous nitrification and denitrification by EPSs in aerobic granular sludge enhanced nitrogen removal of ammonium-nitrogen-rich wastewater. *Biores. Technol.* 202, 101–106.

YANG, S.F., LIU, Q.S., TAY, J.H., LIU, Y., 2004, "Growth kinetics of aerobic granules developed in sequencing batch reactor", *Letters in Applied Microbiology*, v.38, p. 106-112.

YARLAGADDA, V. N.; JOSHI, H. M.; MOHAN, T. V. K.; VENUGOPALAN, V. P.; NARASIMHAN, S. V., 2008, Formation of Aerobic Granules in the Presence of a Synthetic Chelating Agent. *Environmental Pollution*, v. 153, p. 37-43.

YILMAZ, G., LEMAIRE, R., KELLER, J., YUAN, Z., 2008, "Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, pp. 529-541.

ZENG, R.J., LEMAIRE, R., YUAN, Z., KELLER, J., 2003, "Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 84, pp. 170-178.

ZENG, R.J., YUAN, Z., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., KELLER, J., 2002, "Proposed modifications to metabolic model for glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, pp. 277-279.

ZHANG, B., JI, M., LUI, H., WANG, J., LI, J., 2011. Microbial population dynamics during sludge granulation in an anaerobic-aerobic biological phosphorus removal system, *Biores. Technol.* 102, 2474–2480.

ZHANG, C., ZHANG, H., YANG, F., 2015, "Diameter control and stability maintenance of aerobic granular sludge in an A/O/A SBR", *Separation and Purification Technology*, v.149, p. 362–369.

ZHANG, C., ZHANG, H., YANG, F., 2015. Diameter control and stability maintenance of aerobic granular sludge in an A/O/A. *Sep. Purif. Technol* 149, 362–369.

- ZHANG, C.Y., ZHANG, H.M., 2013, "Analysis of aerobic granular sludge formation based on grey system theory", *J. Environ. Sci.*, v 25, pp. 710–716.
- ZHANG, D., LI, W., HOU, C., SHEN, J., JIANG, X., SUN, X., LI, J., HAN, W., WANG, L., LIU, X., 2017. Aerobic granulation accelerated by biochar for the treatment of refractory wastewater, *Chem. Eng. J.* 314, 88–97.
- ZHANG, H.M., DONG, F., JIANG, T., WEI, Y., WANG, T., YANG, F.L., 2011, "Aerobic granulation with low strength wastewater at low aeration rate in A/O/A SBR reactor", *Enzyme Microb. Technol.* v. 49, pp. 215–222.
- ZHENG, Y.M., YU, H.Q., LIU, S.J., 2006, "Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions", *Chemosphere*, v. 63, pp. 1791-1800.
- ZHENG, Y.M., YU, H.Q., SHENG, G.P., 2005, "Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor", *ProcessBiochemistry*, v. 40, pp. 645-650.
- ZHENG, Y.M., YU, H.Q., SHENG, G.P., 2005. Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochem.* 40, 645–650.
- ZHU L., DAI X., XU X., CAO D., 2013, "Microbial community analysis for aerobic granular sludge reactor treating high-level 4-chloroaniline wastewater", *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 11, p. 1845–1854.
- ZILLES J. L., PECCIA J., KIM M. W., HUNG C. H., NOGUERA D. R., 2002, "Involvement of Rhodocyclus-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants", *Appl Environ Microbiol*, v. 276, p. 3-9.