

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Jamile Wagner

**PROCESSO DE GRANULAÇÃO AERÓBIA EM REATORES EM
BATELADAS SEQUENCIAIS EM CONDIÇÕES DE BAIXA
CARGA ORGÂNICA**

Florianópolis

2015

Jamile Wagner

**PROCESSO DE GRANULAÇÃO AERÓBIA EM REATORES EM
BATELADAS SEQUENCIAIS EM CONDIÇÕES DE BAIXA
CARGA ORGÂNICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Helena Ribeiro da Costa

Co-orientadores: Prof. Dr. Eberhard Morgenroth e Dr. Nicolas Derlon

Florianópolis

2015

Wagner, Jamile

PROCESSO DE GRANULAÇÃO AERÓBIA EM REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS EM CONDIÇÕES DE BAIXA CARGA ORGÂNICA / Jamile Wagner ; orientadora, Rejane Helena Ribeiro da Costa ; coorientador, Eberhard Morgenroth Nicolas Derlon. - Florianópolis, SC, 2015.

191 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. grânulos aeróbios. 3. reator em bateladas sequenciais. 4. remoção de nutrientes. 5. tratamento de esgoto doméstico. I. Ribeiro da Costa, Rejane Helena. II. Nicolas Derlon, Eberhard Morgenroth. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Jamile Wagner

**PROCESSO DE GRANULAÇÃO AERÓBIA EM REATORES EM
BATELADAS SEQUENCIAIS EM CONDIÇÕES DE BAIXA
CARGA ORGÂNICA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Ambiental”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Florianópolis, 30 de março de 2015.

Prof. Willian Gerson Matias, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Rejane H. R. da Costa, Dr.^a
Orientadora
UFSC

Prof. Paulo Belli Fillo, Dr.
UFSC

Prof. Pablo Heleno Sezerino, Dr.
UFSC

Prof. Maria Eliza Nagel
Hassemer, Dr.^a
UFSC

Prof. João Paulo Bassin, Dr.
UFRJ

Prof. Mário T. Kato, Dr.
UFPE

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, que sempre acreditaram e investiram em mim.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, em especial:

À minha eterna orientadora Rejane Ribeiro da Costa, por todos esses anos de orientação e amizade. Como sempre, foi um prazer imenso trabalhar no seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança depositada e pela paciência e motivação nos momentos difíceis. Por ser muitas vezes mais do que uma orientadora, uma verdadeira mãezona, sempre pronta para proteger e aconselhar os seus orientandos.

Aos meus pais, Alvaro e Tania, por terem investido TANTO na minha educação e por me apoiarem e acreditarem nos meus sonhos. Eu nunca serei capaz de retribuir tudo o que vocês me proporcionaram. Faltam-me palavras! Obrigada por tornarem isso possível. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Janine e Juliano, aos meus sobrinhos, Nicholas e Isadora, e ao meu cunhado, Flávio, por todo carinho, paciência e apoio durante esses longos anos de doutorado.

À melhor equipe que já existiu: Tiago Vitor, Lorena, e os bolsistas de iniciação científica Natália, Maurício, Patrícia, Augusto e Ana Beatriz. Obrigada por dividirem comigo os cuidados com o Bob (reator); por se alegrarem a cada grânulo formado e chorarem a cada grânulo perdido (que foram muitos!); por tornarem o ambiente de trabalho sempre alegre e divertido, mesmo nas intermináveis e famintas horas de coletas de ciclo; enfim, sem vocês essa tese não seria possível!

As minhas queridas e loucas amigas do PPGEA: Isabela, Pauline, Fran, Beda, Ju Muller, Carol, Cris e Fer, que foram extremamente importantes ao longo do doutorado, especialmente na reta final do trabalho. Meninas, sem vocês eu com certeza teria surtado! Obrigada por todos os conselhos, risadas e companheirismo.

Aos colegas do LABEFLU: Cláudia, Wanderli, Viviane, Hugo, Heloísa, Daniele, Rodrigo, Jorge, por toda a amizade e bons momentos vividos ao longo desses anos, e em especial ao Murilo pelo companheirismo e parceria, incluindo as inúmeras ajudas com o reator.

Aos meus grandes amigos de longa data: especialmente a Luana, Miny, Mari Bin, Beth, Binha, Cado, Ramon, Fernanda, e Marina Coelho, por entenderem os meus períodos de estresse e ausência.

Às minhas amigas brasileiras em Zurique: Dani, Vivi, Nara e Ana Paula, por me trazerem um pouco do calor brasileiro à vida mega certinha e fria da Suíça. Sem vocês, teria sido bem menos divertido.

Aos queridos funcionários do LIMA, Eliani e Vitor, por toda assistência no laboratório.

À Profa. Dra. Elenara Teixeira Lemos Senna e ao Msc. Luis Felipe Costa Silva do Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC pela realização das análises granulométricas.

Ao Edevaldo e ao Seu Hélio, por construírem e montarem com tanto esmero o sistema experimental da UFSC.

Aos colegas, professores e funcionários do PPGEA, em especial ao Lucas, por ser sempre tão prestativo e competente, e quebrar um galho nos momentos de maior apuro.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela bolsa de doutorado concedida durante a pesquisa.

À CAPES pela bolsa concedida durante o doutorado sanduíche Brasil/Suíça.

À FINEP e FAPESC por financiarem esta pesquisa.

Aos professores Paulo Belli Filho, Pablo Heleno Sezerino, Maria Eliza Nagel, João Paulo Bassin e Mário Kato pela disponibilidade e sugestões para o aprimoramento desta tese.

English part:

To my co-advisors: Eberhard and Nico, for the opportunity given to work at EAWAG, one of the most distinguished water research Institutes. I am very grateful for all the advices and fruitful discussions. Thank you for guiding, inspiring, and teaching me. It was a real honor to work with both of you.

To the best office mates EVER: Alma, Constanze, Michele, and Basil, for all the amazing moments in the room C16. Thanks for creating a very pleasant and friendly environment. It was a pleasure to share the office with you, guys!

To Domi, for the encouragement and unconditional support. For being so patient and optimist, and always finding a way to cheer me up in the moments of doubt and disbelief. Thanks for giving me confidence and motivation to finish this thesis.

To the EAWAG ladies: Theresa, Ania S., Gosia, Kristin, Ania C., and Ann-Kathrin for all the girlie dinners, Mövenpick ice-creams,

Proseccos, coffee breaks, and parties. I really hope we manage to meet every year!

To all the amazing people I had the pleasure to get to know during my time in Switzerland: Corine, Peter, Bastian, David Machac, Orlane, Dariusz, João Mimoso, David Weissbrodt, Alexandra Fumasoli, Hanspeter, Jonathan, Albino, Georgi, Vincent, Ingrid, Pascal, and Manuel. I had an incredible time with you guys!!!

To the technical support: Richi, Jacqueline, Brian, Karin, Claudia, and Ilona, for all the help and assistance in the lab.

To Ariane, for providing much needed assistance with all the administrative paperwork.

To my flat mates, Stefan and Didi, for making me feel at home and for being my Swiss family.

“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

RESUMO

A tecnologia de grânulos aeróbios tem sido amplamente estudada para a remoção de nitrogênio e fósforo de águas residuárias. Entretanto, a maioria dos estudos tem sido realizada utilizando efluentes sintéticos de média e elevada carga orgânica volumétrica (COV). Existem poucos relatos sobre a granulação aeróbia com efluentes reais de baixa COV, como os esgotos domésticos. Neste contexto, o processo de granulação aeróbia em condições de baixa COV foi avaliado utilizando três *Sistemas Experimentais (SE)* distintos. No *SE-I* foi explorada a remoção de nitrogênio durante a formação e a maturação dos grânulos aeróbios em um reator em bateladas sequenciais (RBS) alimentado com esgoto doméstico. Após 160 dias de operação, o processo de granulação estava completo no reator. Os grânulos maduros apresentavam uma estrutura esférica e densa, com diâmetro médio de 473 μm e IVL_{30} (índice volumétrico de lodo) de 75,6 $\text{mL}\cdot\text{g}_{\text{SST}}^{-1}$. A assimilação da amônia para o crescimento celular foi mais expressiva durante o período de *start-up* do reator. Após a formação dos grânulos, a assimilação foi menor do que 5% e a remoção do nitrogênio ocorreu, principalmente, por nitrificação-desnitrificação via nítrito. O *SE-II* teve como objetivo compreender como a presença de matéria orgânica particulada (X_S) afeta a formação dos grânulos e a qualidade do efluente tratado sob diferentes condições operacionais. Para isso, dois reatores alimentados com esgoto sintético foram operados na ausência (R1) ou presença (R2) de X_S . Os grânulos cultivados na presença de X_S apresentaram uma estrutura irregular e filamentosa, a qual afetou a capacidade de sedimentação da biomassa e, conseqüentemente, a qualidade do efluente tratado. A operação em volume constante (enchimento ascendente pela parte inferior do reator e descarte simultâneo pela parte superior do reator) mostrou-se favorável para uma maior eficiência de remoção de substrato e também para o suprimento do crescimento filamentoso na presença de X_S . No *SE-III* buscou-se entender como a velocidade ascensional de esgoto (V_{ww}) aplicada durante a fase de enchimento-descarte simultâneos (volume constante) influencia as propriedades do lodo e a conversão do substrato. Para isso, o reator utilizado foi alimentado com esgoto doméstico de baixa carga orgânica em diferentes V_{ww} : 1, 5,9, 8, 12,5 e 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. Elevadas eficiências de remoção de substrato foram obtidas a uma V_{ww} de 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, uma vez que houve uma maior retenção de biomassa no reator sob essas condições. Em média, $96 \pm 4\%$ de amônia e $89 \pm 7\%$ de fósforo foram removidos a uma baixa V_{ww} de 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. No

entanto, o processo de desnitrificação foi a etapa limitante na remoção de nitrogênio. De maneira geral, os sistemas estudados mostraram que é possível desenvolver grânulos maduros e estáveis com esgoto doméstico de baixa carga orgânica utilizando RBS. Além disso, também foi possível remover carbono, nitrogênio e fósforo em uma única unidade operacional compacta. Entretanto, o modo de operação do RBS deve ser adaptado de acordo com o tipo de efluente a ser tratado, principalmente aqueles que contêm X_S em sua composição.

Palavras-chave: grânulos aeróbios, material orgânico particulado, reator em bateladas sequenciais, remoção de nutrientes, nitrificação e desnitrificação simultâneas, tratamento de esgoto doméstico.

ABSTRACT

The aerobic granular sludge (AGS) technology has been widely studied for the biological nutrient removal from wastewater. However, most of the studies have been performed using synthetic wastewaters at high or middle-high organic loading rates (OLR). Only few studies reported successful granulation with real influents at low OLR, such as domestic wastewater. In this context, three different *Experimental Systems (ES)* were used in order to evaluate the aerobic granulation process under conditions of low OLR. In the *ES-I* the performance of a sequencing batch reactor (SBR) was evaluated in terms of nitrogen removal during the formation and maturation of aerobic granules fed with real domestic wastewater. The granulation process was complete after 160 days of operation. The mature granules had a nearly spherical structure, an average size of 473.0 μm , and a good settling ability (SVI₃₀ of 75.6 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$). Ammonium assimilation for cell growth was more significant during the reactor start-up period. After granule formation, assimilation accounted for less than 5% and nitrogen was mainly removed by nitrification-denitrification via nitrite. The *ES-II* aimed at understanding how the presence of X_S affects the formation of the granules and the quality of the treated effluent under different operating conditions. Two reactors fed with synthetic influents were operated in absence (R1) or presence (R2) of particulate organic matter (X_S). The granules grown in presence of X_S had irregular and filamentous outgrowths in the surface, which affected the settleability of the biomass and therefore the quality of the effluent. Operating at constant volume (simultaneous fill from the bottom of the reactor and draw from the upper part of the reactor) showed to be beneficial for the substrate removal efficiency and for suppressing filamentous overgrowth in presence of X_S . In the *ES-III* the focus was on understanding how the wastewater upflow velocity (V_{ww}) applied during the fill-and-draw phase (constant volume) influenced the sludge properties and in turn the substrate conversion. The reactor was fed with low-strength domestic wastewater at different V_{ww} : 1, 5.9, 8, 12.5 and 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. High efficiencies for substrate removal were obtained at V_{ww} of 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, due to the higher biomass retention in the system under these conditions. Average removal efficiencies of $96 \pm 4\%$ for ammonium and $89 \pm 7\%$ for phosphorus were obtained at very low V_{ww} of 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. However, denitrification was the limiting step for nitrogen removal. Overall, the studied systems showed that it is possible to develop mature and stable aerobic granules in SBR using low-strength

domestic wastewater. Besides, it was also possible to efficiently remove carbon, nitrogen, and phosphorus in a single and compact reactor unit. However, the operation mode of such reactors must be adapted according to the composition of the influent, especially the ones containing X_S .

Keywords: aerobic granules, particulate organic matter, sequencing batch reactor, nutrient removal, simultaneous nitrification and denitrification, domestic wastewater treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transformações do nitrogênio nos processos biológicos de tratamento.	41
Figura 2. Esquema do processo de nitrificação e desnitrificação via nitrito.	49
Figura 3. Concentração de OD e substrato em um agregado microbiano.	51
Figura 4. Mecanismo da remoção biológica de fósforo.	53
Figura 5. Fases de operação de um RBS.	55
Figura 6. Combinação de processos de remoção de carbono e nitrogênio nos grânulos aeróbios.	61
Figura 7. Representação esquemática simplificada do processo de remoção de fósforo pelos grânulos aeróbios.	62
Figura 8. Processo de granulação aeróbia em um RBS.	64
Figura 9. Dinâmica do processo de granulação aeróbia.	65
Figura 10. Seleção da biomassa com boa sedimentabilidade em um RBS de grânulos aeróbios.	66
Figura 11: <i>Sistema Experimental I</i>	69
Figura 12. Reator piloto do <i>Sistema Experimental I</i>	70
Figura 13. Reatores do <i>Sistema Experimental II</i>	78
Figura 14. Reator piloto do <i>Sistema Experimental III</i>	85
Figure 15. Sludge particle size D _{0.1} (▲), D _{0.9} (■), and D _{average} (○), SVP-SP200 (□), TSS (●), SVI ₃₀ (Δ), and SVI ₃₀ /SVI ₁₀ ratio (▼) during the operational time. D _{0.1} and D _{0.9} are, respectively, the 10 th and 90 th percentiles of the distribution of particle size. D _{average} is the average size of the sludge particles.	103
Figure 16. Images of the mature aerobic granules grown on domestic wastewater: (a) optical microscopy (bar 2mm); (b) SEM (bar 0.05 mm).	104
Figure 17. Nitrogen removal by the aerobic granules grown on domestic wastewater along the operational time: assimilation (■), nitrification (□), denitrification (○), and total nitrogen (▲).	106
Figure 18. Profiles of sCOD (■), DO (○), NH ₄ ⁺ -N (●), NO ₂ ⁻ -N (□), and NO ₃ ⁻ -N (▲) during an operational cycle of the reactor.	108

Figure 19. Effects on SVI_{30} , SVI_{30}/SVI_{10} ratio, and concentrations of TSS in the reactor and in the effluent of R1, fed with S_S (●), and R2, fed with S_S+X_S (○), depending on the operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (*Experiment 1*), extended anaerobic phase in R2 (*Experiment 2*), increased selection pressure for fast-settling biomass (*Experiment 3*), and constant reactor working volume (*Experiment 4*)..... 121

Figure 20. Effects on the size distribution of biological aggregates in R1, fed with S_S , and R2, fed with S_S+X_S , depending on the operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (*Experiment 1*), extended anaerobic phase in R2 (*Experiment 2*), increased selection pressure for fast-settling biomass (*Experiment 3*), and constant reactor working volume (*Experiment 4*). The x-axes display the classes of particle diameters according to measurements conducted with mesh openings of 0.10, 0.25, and 0.63 mm. The sludge fractions are presented as averages values over the last three weeks of each experiment. 122

Figure 21. Stereomicroscopic images of aerobic granules cultivated in R1 with soluble substrate (S_S) and in R2 with a mixture of soluble and particulate substrates (S_S+X_S) for the different operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (*Experiment 1*), extended anaerobic phase in R2 (*Experiment 2*), increased selection pressure for fast-settling biomass (*Experiment 3*), and constant reactor working volume (*Experiment 4*). The biomass samples were taken from the reactors during the last week of each experiment. Size bars represent 0.5 mm (a, b, and c), 1 mm (d), and 2 mm (e, f, g, and h)..... 123

Figure 22. Effect on substrate conversion for R1 fed with S_S and R2 fed with S_S+X_S depending on the operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (*Experiment 1*), extended anaerobic phase in R2 (*Experiment 2*), increased selection pressure for fast-settling biomass (*Experiment 3*), constant reactor working volume (*Experiment 4*)..... 124

Figure 23. (a) SVI_{30} , (b) SVI_{10} and (c) SVI_{30}/SVI_{10} ratio measured for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding..... 145

Figure 24. Size fractions of the sludge measured for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding..... 147

Figure 25. Stereomicroscopic images of aerobic granules for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding. White bars indicate a size of 1 mm..... 148

Figure 26. Efficiencies of substrate conversion measured for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding. 149

Figure 27. Cycle test performed on the SBR reactor during the (a) anaerobic feeding (samples taken from the effluent) and during the (b) aerobic period (samples taken from the mixed liquor).150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperatura e tempo de retenção de sólidos (SRT) recomendados para a ocorrência do processo de nitrificação.	44
Tabela 2. Características do esgoto doméstico e cargas aplicadas durante a operação do <i>Sistema Experimental I</i>	72
Tabela 3. Métodos e frequência das análises físico-químicas.	74
Tabela 4. Descrição das sondas utilizadas na detecção dos micro-organismos presentes nos grânulos pela técnica de FISH.	75
Tabela 5. Detalhes das condições operacionais aplicadas ao R1, alimentado com substrato solúvel (S_S), e R2, alimentado com uma mistura de substrato solúvel e particulado (S_S+X_S), nos diferentes experimentos.	80
Tabela 6. Composição dos substratos do R1 e do R2.	82
Tabela 7. Características do esgoto doméstico e cargas aplicadas durante a operação do reator do <i>Sistema Experimental III</i>	87
Tabela 8. Detalhes das diferentes abordagens experimentais aplicadas ao reator.	88
Table 9. Oligonucleotide probes used for FISH analysis.	100
Table 10. Details of the operating conditions applied in R1 (fed with soluble substrate (S_S)), and in R2 (fed with a mixture of soluble and particulate substrates (S_S+X_S)) during the four experiments.	116
Table 11. Substrate composition of Reactor 1 and Reactor 2.	118
Table 12. Summary of the main results obtained for the different operating conditions.	128
Table 13. Summary of the main results reported in the literature about the use of domestic wastewater for aerobic granulation.	138
Table 14. Details of the different experimental approaches applied in this study.	141
Table 15. Composition of the primary clarified wastewater.	142
Table 16. TSS concentrations measured in the reactor and in the effluent.	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A/D – Relação altura/diâmetro
- AGS – *Aerobic granular sludge*
- AGV – Ácidos graxos voláteis
- AOB – Bactérias oxidadoras de amônia (*ammonia oxidizing bacteria*)
- C – Carbono (*carbon*)
- CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
- CLP – Controlador lógico programável
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- COV – Carga orgânica volumétrica
- D – Diâmetro
- D (0,1) – Percentil 10 do diâmetro das partículas
- D (0,9) – Percentil 90 do diâmetro das partículas
- DBO₅ – Demanda bioquímica de oxigênio
- D_{médio} – Diâmetro médio das partículas
- DO – *Dissolved oxygen*
- DQO_t – Demanda química de oxigênio total
- DQO_s – Demanda química de oxigênio solúvel
- EAWAG – Instituto Federal Suíço de Ciência e Tecnologia Aquática
- EPS – Substâncias poliméricas extracelulares
- ES – *Experimental system*
- ETE – Estação de tratamento de esgoto
- FA – *Free ammonia*
- FISH – Hibridização fluorescente in situ
- GAO – organismos acumuladores de glicogênio (*glycogen accumulating organisms*)
- HRT – *Hydraulic retention time*
- IVL – Índice volumétrico do lodo
- LABEFLU – Laboratório de efluentes líquidos e gasosos
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- N – Nitrogênio (*nitrogen*)
- N_{assimilado} – Nitrogênio assimilado
- NH₃ – Amônia não ionizada

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ – Nitrogênio amoniacal
 N_2 – Nitrogênio gasoso
 N_2O – Óxido nitroso
NOB – Bactérias oxidadoras de nitrito (*nitrite oxidizing bacteria*)
NO – Óxido nítrico
 NO_2^- – Nitrito
 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ – Nitrito expresso como nitrogênio
 NO_3^- – Nitrato
 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ – Nitrato expresso como nitrogênio
 $\text{NO}_x\text{-N}$ – Compostos nitrogenados oxidados (nitrito e nitrato)
NTK – Nitrogênio total kjeldahl
NT – Nitrogênio total
 O_2 – Oxigênio Gasoso
OD – Oxigênio dissolvido
OLR – *Organic loading rate*
P – Fósforo (*phosphorus*)
PAO – Organismos acumulados de fosfato (*polyphosphate accumulating organisms*)
pH – Potencial hidrogeniônico
PHB – Polihidroxibutirato
 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ – Fosfato expresso como fósforo
PPGEA – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Pt – Fósforo total
PTV – Percentual de troca volumétrica
RBS – Reator em bateladas sequenciais
RBSG – Reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios
sCOD – *Soluble chemical oxygen demand*
SBR – *Sequencing batch reactor*
SE – Sistema experimental
SEM – *Scanning electron microscopy*
SM – *Standard Methods*
SND – Nitrificação e desnitrificação simultâneas (*simultaneous nitrification and denitrification*)
SNDR – *Specific denitrification rate*

SRT – Tempo de retenção de sólidos (*sludge retention time*)

S_s – Substrato orgânico solúvel (*soluble organic substrate*)

SSF – Sólidos suspensos fixos

SST – Sólidos suspensos totais

SSV – Sólidos suspensos voláteis

SVI – *Sludge volume index*

SVP-SB200 – Percentagem de volume de lodo com tamanho inferior a 200 μm

T – Temperatura

tCOD – *Total chemical oxygen demand*

TKN – *Total kjeldahl nitrogen*

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

USEPA – United States Environment Protection Agency

V_{ww} – Velocidade ascensional de esgoto (*wastewater upflow velocity*)

X_s – Substrato orgânico particulado (*particulate organic substrate*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	32
1.1 JUSTIFICATIVA	34
1.2 HIPÓTESES.....	37
1.3 OBJETIVOS.....	38
1.3.1 <i>Objetivo geral</i>	38
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	38
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	40
2.1 REMOÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	40
2.2.1 <i>Nitrificação</i>	41
2.2.2 <i>Desnitrificação</i>	44
2.2.3 <i>Nitrificação-desnitrificação via nitrito</i>	47
2.2.4 <i>Nitrificação e desnitrificação simultâneas</i>	49
2.2 REMOÇÃO BIOLÓGICA DO FÓSFORO	52
2.3 REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS (RBS).....	54
2.4 SISTEMAS DE GRÂNULOS AERÓBIOS	57
2.4.1 <i>Características dos grânulos aeróbios</i>	58
2.4.2 <i>Processos de remoção de substrato em grânulos aeróbios</i>	59
2.4.3 <i>Mecanismos de formação dos grânulos aeróbios</i>	62
2.4.4 <i>Principais fatores que afetam a granulação aeróbia</i>	65
3 MATERIAIS E MÉTODOS	68
3.1 SISTEMA EXPERIMENTAL I (SE-I)	68
3.1.1 <i>Características gerais</i>	68
3.1.2 <i>Inoculação do reator</i>	71
3.1.3 <i>Operação do reator</i>	71
3.1.4 <i>Monitoramento do sistema</i>	73
3.1.4.1 <i>Análises físico-químicas</i>	73
3.1.4.2 <i>Análises morfológicas e microbiológicas</i>	73
3.1.4.3 <i>Características físicas dos grânulos</i>	75
3.2 SISTEMA EXPERIMENTAL II (SE-II)	77
3.2.1 <i>Características gerais</i>	77
3.2.2 <i>Inoculação dos reatores</i>	79
3.2.3 <i>Operação dos reatores</i>	79
3.2.4 <i>Composição dos substratos</i>	82
3.2.5 <i>Métodos analíticos</i>	83

3.3 SISTEMA EXPERIMENTAL III (SE-III)	84
3.3.1 Características gerais	84
3.3.2 Operação do reator	86
3.3.3 Abordagem experimental	88
3.3.4 Monitoramento do reator	89
3.3.4.1 Amostragem	89
3.3.4.2 Análises físico-químicas	89
3.4 CÁLCULOS	90
3.4.1 Tempo de duração do ciclo (t_c)	90
3.4.2 Número de ciclos por dia (n_c)	90
3.4.3 Vazão diária de esgoto (Q_d)	91
3.4.4 Carga volumétrica aplicada (CV)	91
3.4.5 Tempo de retenção hidráulica (TRH)	91
3.4.6 Velocidade superficial ascensional do ar	92
3.4.7 Velocidade ascensional de esgoto	92
3.4.8 Tempo de retenção de sólidos (SRT)	92
3.4.9 Eficiência de remoção (E)	93
3.4.10 Balanço do nitrogênio	94
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	96
4.1 ARTIGO 1	96
4.1.1 Introduction	98
4.1.2 Materials and Methods	98
4.1.2.1 Experimental set-up and reactor operation	98
4.1.2.2 Analytical procedures	99
4.1.2.3 Microbial community analysis	100
4.1.2.4 Calculations	101
4.1.3 Results and Discussion	102
4.1.3.1 Aerobic granulation with domestic wastewater	102
4.1.3.2 Nitrogen Removal	105
4.1.3.3 Microbial populations	109
4.1.4 Conclusions	110
4.2 ARTIGO 2	111
4.2.1 Introduction	112
4.2.2 Materials and Methods	114
4.2.2.1 Experimental set-up	114
4.2.2.2 Experimental approach	115
4.2.2.3 Substrate composition	117
4.2.2.4 Analytical methods	118
4.2.3 Results	119

4.2.3.1 Effect of the absence or presence of X_S on aerobic granulation (Experiment 1)	119
4.2.3.2 Effect of an extended anaerobic phase (Experiment 2)	120
Figure 21. Stereomicroscopic images of aerobic granules cultivated in R1 with soluble substrate (S_S) and in R2 with a mixture of soluble and particulate substrates (S_S+X_S) for the different operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (Experiment 1), extended anaerobic phase in R2 (Experiment 2), increased selection pressure for fast-settling biomass (Experiment 3), and constant reactor working volume (Experiment 4). The biomass samples were taken from the reactors during the last week of each experiment. Size bars represent 0.5 mm (a, b, and c), 1 mm (d), and 2 mm (e, f, g, and h). 123	
4.2.3.3 Effect of an increased selection pressure for fast-settling biomass (Experiment 3)	125
4.2.3.4 Effect of operating at constant reactor volume (Experiment 4)	126
4.2.4 Discussion	127
4.2.4.1 How does the presence of X_S in the influent together with the applied operating conditions influence the morphology, the properties, and the formation of aerobic granules?	127
4.2.4.2 How does the presence of X_S in the influent together with the applied operating conditions influence the substrate conversion? ...	131
4.2.4.3 Relevance of the findings for practical applications	133
4.2.5 Conclusions	134
4.3 ARTIGO 3	135
4.3.1 Introduction	136
4.3.2 Materials and Methods	140
4.3.2.1 Experimental set-up	140
4.3.2.2 Experimental approach	141
4.3.2.3 Domestic wastewater	142
4.3.2.4 Cycle tests	142
4.3.2.5 Analytical methods	143
4.3.2.6 Calculation procedures	143
4.3.3 Results	144
4.3.3.1 Characteristics of the granular sludge	144
4.3.3.2 Substrate conversion	147
4.3.4 Discussion	151
4.3.4.1 Successful granulation can be achieved using a low strength domestic wastewater	151

4.3.4.2 <i>Excellent effluent quality, in terms of COD, ammonium, phosphorus, and TSS, can be achieved</i>	153
4.3.4.3 <i>But only partial denitrification is observed</i>	154
4.3.5 <i>Conclusions</i>	156
4.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS	157
5 CONCLUSÕES	162
6 RECOMENDAÇÕES	164
REFERÊNCIAS	166

1 INTRODUÇÃO

O lançamento de esgotos sem tratamento prévio em rios, lagos e córregos é um dos principais problemas que afeta a qualidade das águas. Segundo dados da Agência Nacional de Águas (ANA, 2011), apenas 50,6% do esgoto doméstico gerado no Brasil são coletados, sendo que deste total, somente 34,6% recebem algum tipo de tratamento. Os baixos índices de coleta e tratamento de esgotos contribuem para a incidência de doenças de veiculação hídrica, além de comprometer a qualidade das águas superficiais, podendo inviabilizar o uso dos recursos hídricos.

Uma das maiores consequências da falta de saneamento básico é a eutrofização dos corpos d'água. O principal fator de estímulo para a ocorrência da eutrofização são os altos níveis de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, provenientes de esgotos não tratados ou parcialmente tratados. A eutrofização é caracterizada pela proliferação de produtores primários (fitoplâncton, algas bentônicas e macrófitas), os quais podem diretamente e/ou indiretamente causar efeitos ecológicos e toxicológicos adversos.

Os impactos da eutrofização sobre a qualidade da água e a saúde humana incluem (USEPA, 2009): crescimento excessivo de vegetação aquática, principalmente microalgas e cianobactérias, as quais podem produzir toxinas letais para o homem e para os animais; riscos para a saúde humana, resultantes do consumo de moluscos contaminados com algas ou exposição direta a toxinas presentes na água; baixa concentração de oxigênio dissolvido (OD), resultante da morte e da decomposição de plantas aquáticas, assim como da oxidação da amônia a nitrato; mortandade de peixes e invertebrados, devido às condições de baixo OD; problemas de cor, odor, sabor e turbidez devido ao crescimento, morte e decomposição da flora e da fauna; maior demanda de cloro para desinfetar a água de abastecimento, com a consequente produção de compostos cancerígenos resultantes do aumento da cloração.

A fim de contribuir para uma melhor qualidade do efluente tratado e diminuir a incidência da eutrofização dos recursos hídricos, a remoção de nutrientes nas estações de tratamento de esgotos (ETE) é de extrema importância. No Brasil, a maioria das ETE em operação utiliza o sistema de lodo ativado para tratar os esgotos domésticos. Entretanto, esses sistemas convencionais demandam diversas etapas de tratamento,

principalmente quando projetados para remover nutrientes, requerendo assim um maior aporte energético para implantação e operação. Tendo em vista a crescente produção de águas residuárias pela população e a limitada disponibilidade de área para a construção de novas ETE, torna-se imprescindível a busca por alternativas de tratamento compactas que promovam a remoção simultânea de carbono e nutrientes.

Dentre as tecnologias recentemente propostas, as mais promissoras são os sistemas biológicos de tratamento utilizando biomassa granular, os quais incluem processos de granulação aeróbia e anaeróbia. No entanto, as técnicas anaeróbias apresentam problemas relacionados ao odor, além de não apresentarem uma eficiência elevada de remoção de substrato, exigindo muitas vezes um pós-tratamento aeróbio. Desta forma, a busca por alternativas de biodegradação aeróbia está atraindo cada vez mais interesse. Nos últimos anos, a tecnologia de lodo granular aeróbio demonstrou vantagens significativas em diversos aspectos relacionados ao sistema de tratamento de águas residuárias, dentre as quais a excelente capacidade de separação entre a biomassa e o efluente tratado, a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo, e a degradação de compostos orgânicos tóxicos (ZHU *et al.*, 2013). Os grânulos aeróbios são cultivados preferencialmente em reatores operados em bateladas sequenciais (RBS), os quais dispensam o uso de decantadores, bem como o retorno de lodo ao reator biológico (BASSIN, 2011).

Entretanto, esta tecnologia ainda encontra-se em fase de desenvolvimento. Há poucos relatos na literatura sobre a aplicação de sistemas de lodo granular aeróbio em escala real ou piloto, uma vez que a instabilidade dos grânulos é considerada como um dos maiores problemas que impedem a sua aplicação na prática (LEE *et al.*, 2010). Os estudos realizados até hoje, em sua maioria, utilizaram efluentes sintéticos e a aplicação da tecnologia para o tratamento de efluentes reais (não sintéticos) é ainda pouco reportada. Segundo Isanta *et al.* (2012), os resultados obtidos com os reatores de grânulos aeróbios em escala laboratorial utilizando efluentes sintéticos são bastante promissores, porém mais informações sobre a formação e estabilidade dos grânulos bem como o seu desempenho em larga escala são necessárias, a fim de estabelecer se esta tecnologia pode ser um tratamento viável na remoção de nutrientes das águas residuárias. Para Show *et al.* (2012) a estabilidade da biomassa granular pode estar

associada a um melhor entendimento da formação e das características dos grânulos aeróbios.

Neste contexto, com o presente trabalho buscou-se melhor compreender a formação e estabilidade dos grânulos aeróbios, bem como os mecanismos de remoção de nutrientes, principalmente o nitrogênio, em reatores em bateladas sequenciais. O estudo foi realizado no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em cooperação com o Instituto Federal Suíço de Ciência e Tecnologia Aquática (*Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology* – EAWAG). Para isso foram utilizados três sistemas experimentais distintos, onde o foco principal foi avaliar o processo de granulação aeróbia utilizando esgoto doméstico real ou sintético de baixa carga orgânica volumétrica ($COV < 2,0 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ de demanda química de oxigênio – DQO).

1.1 JUSTIFICATIVA

Diante dos impactos da eutrofização, em muitos países, os padrões de lançamento de efluentes estão se tornando cada vez mais rigorosos, a fim de proteger os recursos hídricos. No Brasil, a legislação ambiental contempla, além da necessidade de redução da poluição orgânica, a redução de nitrogênio e fósforo para o lançamento de efluentes sanitários e/ou industriais em corpos d'água. De acordo com a Resolução nº 430/11 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a qual estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, o valor máximo permitido de nitrogênio amoniacal total é de $20 \text{ mg}_N\cdot\text{L}^{-1}$, para o lançamento direto de efluentes de qualquer fonte poluidora (BRASIL, 2011). Entretanto, para o lançamento direto de efluentes oriundos de sistemas de tratamento de esgotos sanitários não é exigido o padrão de nitrogênio amoniacal total, ficando a critério do órgão ambiental competente o estabelecimento de condições e padrões de lançamento em função das características locais (BRASIL, 2011). Já o Código Ambiental de Santa Catarina, por meio da Lei nº 14.675/09, estabelece que os efluentes somente podem ser lançados direta ou indiretamente em trechos de lagoas, lagoas e estuários, quando a concentração de fósforo total for inferior a $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ou quando a

eficiência de remoção de fósforo for no mínimo de 75%, desde que não altere as características dos corpos de água (SANTA CATARINA, 2009).

Diversos processos têm sido propostos para a remoção de nitrogênio e/ou fósforo das águas residuárias. Dentre esses, os processos biológicos são os mais vantajosos, uma vez que os mesmos utilizam as próprias funções dos micro-organismos que existem naturalmente no ambiente (MATSUO *et al.*, 2001). Assim, desde 1997 o Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) vem desenvolvendo pesquisas sobre o tratamento biológico de esgotos domésticos e industriais utilizando *sistemas de biomassa fixa*, como os reatores de leito fluidizado (WOLFF, 1997; BARTHEL, 1998; SALES, 1999; ALVES, 2000; HEIN DE CAMPOS, 2001; MARTINS, 2003; BARBOSA, 2004; BORTOLOTTO NETO, 2004; HEIN DE CAMPOS, 2006); *sistemas de biomassa suspensa*, como os reatores em bateladas sequenciais (COSTA, 2005; THANS, 2008; FERNANDES, 2013; OSELAME, 2013); e *sistemas híbridos* (biomassa suspensa + biomassa fixa), de fluxo contínuo ou em bateladas sequenciais (WOLFF, 2005; SOUTO, 2007; LAMEGO NETO, 2008). Mais recentemente, o LABEFLU vem focando suas pesquisas em *sistemas de biomassa na forma de grânulos aeróbios* em reatores operados em bateladas sequenciais (WAGNER, 2011; JUNGLES, 2011; AKABOCI, 2013; DAUDT, 2015; GUIMARÃES, em andamento).

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm estudado com sucesso a tecnologia de grânulos aeróbios para a remoção de nitrogênio e fósforo (DE KREUK *et al.*, 2005a; LI *et al.*, 2005; BAO *et al.*, 2009; BELMONTE *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009; PIJUAN *et al.*, 2011; BASSIN *et al.*, 2012a; COMA *et al.*, 2012; LOCHMATTER *et al.*, 2014). Segundo de Kreuk (2006), o mecanismo de remoção de nutrientes através de grânulos aeróbios é semelhante ao utilizado nos sistemas convencionais de lodos ativados, sendo que a principal diferença reside no fato de não ser necessária a utilização de diversos tanques, mas sim, a criação de diferentes zonas no interior do próprio grânulo. Como consequência, esta tecnologia requer uma menor área de implantação em comparação ao sistema de lodos ativados, representando assim uma alternativa promissora para o tratamento de águas residuárias em cidades com limitada disponibilidade de área. Desta forma, os grânulos aeróbios têm o potencial para superar os atuais

desafios referentes à remoção de nutrientes de forma eficiente e econômica.

Embora a granulação aeróbia tenha sido amplamente investigada nas últimas décadas, a maioria dos pesquisadores têm focado seus estudos na formação de grânulos em reatores de escala laboratorial utilizando efluentes sintéticos, de média e elevada carga orgânica volumétrica ($COV > 2,5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ de DQO), os quais são elaborados a partir de compostos orgânicos solúveis (S_S) de fácil assimilação pelos micro-organismos. Existem poucos estudos sobre a granulação aeróbia utilizando efluentes reais de baixa concentração orgânica ($COV < 2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ de DQO), como os esgotos domésticos (DE KREUK & VAN LOOSDRECHT, 2006; NI *et al.*, 2009.; LIU *et al.*, 2010b; WAGNER *et al.*, 2010; COMA *et al.*, 2012.; SU *et al.*, 2012; WAGNER & COSTA, 2013; ZHOU *et al.*, 2014; ROCKTÄSCHEL *et al.*, 2015).

Geralmente a granulação aeróbia é um processo independente do tipo de substrato utilizado, mas a morfologia e a microestrutura dos grânulos são altamente dependentes da composição do efluente no qual eles são cultivados (LIU *et al.*, 2009). Além disso, a cinética de granulação com esgotos reais é diferente daquela geralmente obtida com esgotos sintéticos (NI *et al.*, 2009.; LIU *et al.*, 2010b; WAGNER & COSTA, 2013). Isto pode ser devido ao fato de que os esgotos reais de origem doméstica usualmente contêm várias fontes de carbono, juntamente com uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos e também material particulado (LEMAIRE *et al.*, 2008). A fração do material particulado (X_S) nos esgotos domésticos geralmente representa cerca de 40-60% da matéria orgânica total (KAPPELER & GUJER, 1992; ORHON & ÇOKGÖR, 1997; KOCH *et al.*, 2000). Portanto, esgotos sintéticos compostos apenas por S_S não são representativos de um esgoto real e complexo. Como resultado, a formação e aplicação de grânulos aeróbios para o tratamento de águas residuárias ainda é um desafio.

Desta forma, percebe-se que as condições para a formação de grânulos maduros e estáveis utilizando-se esgotos domésticos permanecem ainda pouco claras. A presente pesquisa justifica-se ao buscar contribuir com maiores informações e elucidar alguns aspectos da tecnologia de grânulos aeróbios que ainda não foram amplamente explorados. Este trabalho tem por fim o intuito de contribuir com informações relevantes para a comunidade científica bem como

incrementar essa linha de pesquisa existente no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) da UFSC.

1.2 HIPÓTESES

O delineamento da pesquisa foi realizado com base nas seguintes hipóteses:

Hipótese 1: *É possível formar grânulos aeróbios estáveis com esgoto doméstico de baixa carga orgânica utilizando reatores em bateladas sequenciais (RBS).*

Hipótese 2: *A presença de material particulado no afluente afeta a cinética de granulação aeróbia e de remoção de substrato.*

A partir destas hipóteses, as seguintes questões norteadoras foram formuladas:

- Quais as condições operacionais que interferem na formação, estabilidade e manutenção dos grânulos aeróbios?
- Como se dá a conversão do nitrogênio durante o processo de formação e maturação dos grânulos aeróbios?
- Os grânulos aeróbios são capazes de remover simultaneamente carbono e nutrientes de esgoto doméstico?
- De que maneira a presença de material particulado afeta a formação dos grânulos e a qualidade do efluente tratado?
- Como as condições operacionais de um reator de grânulos devem ser adaptadas a fim de favorecer o processo de granulação na presença de material particulado?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Estudar a formação de grânulos aeróbios em diferentes condições operacionais utilizando reatores em bateladas sequenciais (RBS) em condições de baixa carga orgânica.

1.3.2 Objetivos específicos

Para responder ao objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o desempenho de RBS em termos de remoção de nitrogênio durante o processo de formação e maturação dos grânulos aeróbios utilizando esgoto doméstico de baixa carga orgânica (*Sistema Experimental I*);
- Avaliar como a presença de material particulado no afluente afeta a formação dos grânulos e a qualidade do efluente tratado sob diferentes condições operacionais de RBS (*Sistema Experimental II*);
- Avaliar como as condições operacionais de RBS, em termos de velocidade ascensional de esgoto durante a fase de enchimento, afetam as características dos grânulos formados com esgoto doméstico de baixa carga orgânica (*Sistema Experimental III*).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

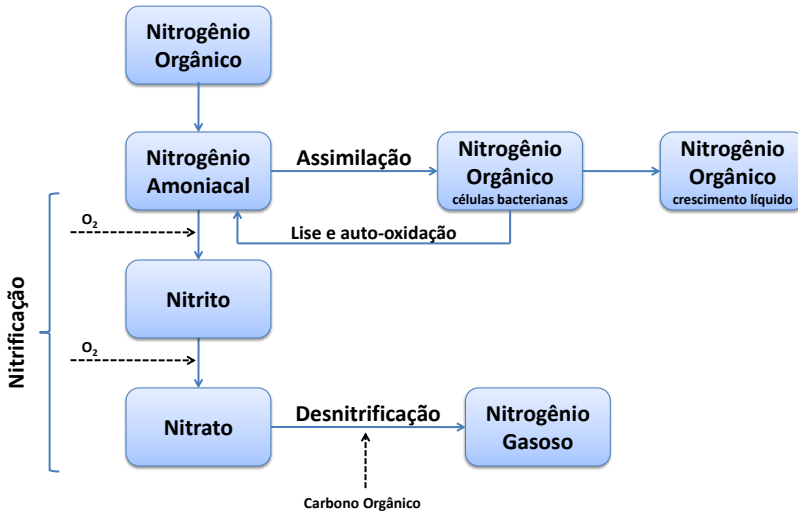
2.1 REMOÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

As formas mais comuns de nitrogênio nas águas residuárias são: nitrogênio amoniacal (gasoso, NH_3 ; e salino NH_4^+), nitrogênio gasoso (N_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e nitrogênio orgânico (ureia, aminoácidos e outras substâncias orgânicas com o grupo amino). No esgoto de origem doméstica, aproximadamente 60% do nitrogênio encontra-se na forma de amônia ionizada e 40% na forma de nitrogênio orgânico. Este último é facilmente convertido a NH_4^+ por meio de decomposição bacteriana em um processo denominado amonificação (WEF, 2005).

Nos sistemas de tratamento biológico de esgoto doméstico, o nitrogênio é removido por meio da transferência das formas nitrogenadas da fase líquida para a fase sólida e/ou gasosa (EKAMA & WENTZEL, 2008). Isto é realizado por dois mecanismos principais: 1) síntese da biomassa (assimilação do nitrogênio) e descarte do lodo; e 2) nitrificação e desnitrificação biológica (USEPA, 2010). Cerca de 20% do nitrogênio afluente é assimilado e incorporado na massa do lodo, e em torno 75% é removido pelos processos de nitrificação e desnitrificação. Na etapa de nitrificação, o nitrogênio permanece na fase líquida, enquanto que na etapa de desnitrificação, o nitrogênio é transferido do líquido para a fase gasosa e escapa para a atmosfera (EKAMA & WENTZEL, 2008). Desta forma, somente com a etapa de desnitrificação é possível alcançar um elevado nível de remoção de nitrogênio e uma baixa concentração de nitrogênio inorgânico no efluente (USEPA, 2010). As transformações biológicas do nitrogênio durante o processo de tratamento das águas residuárias estão esquematizadas na Figura 1.

Nesta seção foi abordado apenas o segundo mecanismo de remoção do nitrogênio, ou seja, os processos de nitrificação e desnitrificação, os quais podem ocorrer de forma sequencial, parcial ou simultânea.

Figura 1. Transformações do nitrogênio nos processos biológicos de tratamento.



Fonte: Adaptado de Metcalf & Eddy (2003).

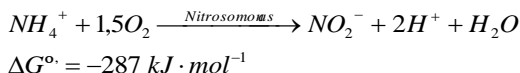
2.2.1 Nitrificação

A nitrificação é um processo de oxidação biológica da amônia, tendo o oxigênio como receptor de elétrons e o nitrato como produto final. Este processo ocorre em duas etapas sequenciais: na primeira etapa, a amônia é oxidada a nitrito; na segunda, o nitrito é oxidado a nitrato.

O processo de nitrificação é geralmente realizado por micro-organismos autotróficos, quimiolitotróficos e aeróbios obrigatórios (OKABE *et al.*, 2011). Esses micro-organismos utilizam o gás carbônico como principal fonte de carbono e obtém energia a partir da oxidação de um substrato inorgânico, como a amônia, a formas mineralizadas. Entretanto, há registros na literatura da ocorrência da nitrificação também por ação de bactérias heterotróficas que utilizam o carbono orgânico e oxidam a amônia a nitrato. De acordo com WEF (2010), os micro-organismos capazes de efetuar a nitrificação heterotrófica

incluem *Thiosphaera pantotropha*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas denitrificans* e *Paracoccus denitrificans*. No presente trabalho será abordado apenas o processo de nitrificação autotrófica.

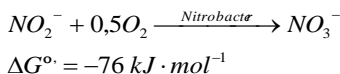
A reação de transformação da amônia em nitrito, nitrificação, é catalisada pelas bactérias oxidadoras de amônia (do inglês *ammonia oxidizing bacteria* – AOB), como as do gênero *Nitrosomonas*, e a estequiometria pode ser expressa pela Equação 1:



Equação 1

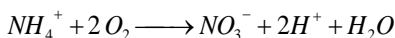
A oxidação da amônia também pode ser realizada por arqueas (KONNEKE *et al.*, 2005). Arqueas oxidadoras de amônia são geralmente encontradas em ETes que operam em baixas concentrações de OD e longos tempos de retenção de sólidos (PARK *et al.*, 2006).

A reação de oxidação de nitrito a nitrato, *nitratação*, ocorre pela atuação das bactérias oxidadoras de nitrito (do inglês *nitrite oxidizing bacteria* – NOB), com as do gênero *Nitrobacter*, e a estequiometria pode ser expressa pela Equação 2:



Equação 2

A expressão estequiométrica global da nitrificação (Equação 3) é obtida a partir da soma das Equações 1 e 2:



Equação 3

Apesar de na maioria das ETes a nitrificação ser realizada principalmente pelas *Nitrosomonas*, outros gêneros, como *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosocystis*, e *Nitrosorobrio*, são também capazes de oxidar a amônia a nitrito. Por outro lado, além das *Nitrobacter* a oxidação do nitrito pode também ser realizada por outros gêneros como *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, e *Nitroeystis* (GERARDI, 2002; METCALF & EDDY, 2003).

A taxa de conversão de amônia para nitrito pelas AOB é geralmente muito mais lenta do que a taxa de conversão de nitrito para nitrato pelas NOB. Desta forma, na maioria dos casos de tratamento de águas residuárias municipais, todo o nitrito formado é imediatamente convertido a nitrato. Como consequência, geralmente, uma concentração muito pequena de nitrito ($< 1 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$) é encontrada no efluente tratado (EKAMA & WENTZEL, 2008).

Do ponto de vista energético, a reação da primeira etapa disponibiliza mais energia do que a reação de nitratação. Assim, essa disponibilidade energética favorece mais as bactérias que oxidam a amônia do que as que oxidam o nitrito (SANT'ANNA JR., 2010). No geral, devido à quantidade relativamente pequena de energia obtida a partir da oxidação da amônia e do nitrito, as bactérias nitrificantes se reproduzem muito lentamente (GERARDI, 2006). Segundo Bernet & Spérandio (2009), comparado com os micro-organismos heterotróficos, o crescimento das bactérias nitrificantes é lento e escasso, mesmo nas condições ótimas. A velocidade máxima de crescimento específico para os heterotróficos encontra-se na faixa de 4 a 13,2 dia^{-1} , enquanto que para os nitrificantes essa faixa é de 0,62 a 0,92 dia^{-1} (RITTMANN & MCCARTY, 2001). Desta forma, nos sistemas biológicos de remoção de nitrogênio, a nitrificação vai ser o processo de controle, uma vez que os microrganismos nitrificantes representam aproximadamente 2% da massa microbiana, têm exigências estritas de crescimento e são sensíveis às condições ambientais (JEYANAYAGAM, 2005).

Assim como ocorre em todos os processos biológicos, a nitrificação é afetada por diversas condições ambientais, tais como temperatura, pH, concentração do substrato e fatores de inibição. Estes fatores podem influenciar a taxa de crescimento das bactérias nitrificantes e, conseqüentemente, a taxa de nitrificação (BERNET & SPERÁNDIO, 2009).

Gerardi (2006) considera que nos sistemas de tratamento de efluentes o tempo de retenção de sólidos (do inglês *sludge retention time* – SRT) e a temperatura são os fatores mais críticos que afetam a atividade e o tamanho da população nitrificante, e também a eficiência do processo de nitrificação. O SRT controla a concentração de micro-organismos no sistema, sendo que quanto maior o SRT maior a concentração de biomassa. Como exposto anteriormente, as bactérias nitrificantes apresentam uma velocidade de crescimento mais lenta do que as que bactérias heterotróficas. Desta forma, os organismos

nitrificantes requerem um maior tempo no reator biológico para que possam oxidar o nitrogênio amoniacal. Em consequência disto, o tempo de retenção de sólidos deve ser levado em consideração no dimensionamento dos projetos para assegurar a ocorrência da nitrificação (METCALF & EDDY, 2003). Tempos de retenção de sólidos relativamente altos são necessários para estabelecer uma população suficiente de bactérias nitrificantes. De acordo com Rittmann & McCarty (2001), o tempo de retenção dos sólidos deve ser igual ou maior do que 15 dias.

A atividade e o tempo de geração das bactérias nitrificantes dependem também da temperatura. Com o aumento da temperatura essas bactérias se tornam mais ativas e se reproduzem mais rapidamente (GERARDI, 2006). A maioria das bactérias nitrificantes são mesofílicas, com temperatura ótima de crescimento entre 28 e 36 °C. Em vista disso, a velocidade de crescimento das bactérias nitrificantes diminui com a diminuição da temperatura, mas o processo de nitrificação é possível mesmo em temperaturas em torno de 5 °C (BERNET & SPÉRANDIO, 2009). Uma vez que há uma relação indireta entre a temperatura e a atividade de bactérias nitrificantes, é necessário aumentar o SRT com a diminuição da temperatura (Tabela 1) (GERARDI, 2006).

Tabela 1. Temperatura e tempo de retenção de sólidos (SRT) recomendados para a ocorrência do processo de nitrificação.

T (°C)	SRT (d)
30	7
25	10
20	15
15	20
10	30

Fonte: Gerardi (2006).

2.2.2 Desnitrificação

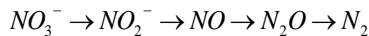
A desnitrificação pode ser definida como um processo onde as formas oxidadas de nitrogênio – nitrato e/ou nitrito – são reduzidas a nitrogênio gasoso em condições anóxicas (ausência de oxigênio e

presença de nitrito e/ou nitrato). Desta forma, é necessário que a desnitrificação seja precedida da nitrificação.

Ao contrário de nitrificação, a desnitrificação é realizada por uma ampla gama de espécies de bactérias heterotróficas, sendo que muitas delas são comumente encontradas nos processos convencionais de tratamento biológico, mesmo naqueles não concebidos para remover nitrogênio (WEF, 2005). Além disso, a desnitrificação também pode ser realizada por bactérias nitrificantes heterotróficas e por bactérias autotróficas (USEPA, 2010).

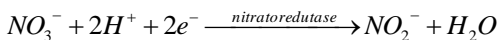
As bactérias heterotróficas são mais comuns por serem facultativas, ou seja, possuem a capacidade enzimática de utilizar oxigênio, nitrato ou nitrito como receptor final de elétrons. As bactérias heterotróficas facultativas utilizam preferencialmente o oxigênio quando o mesmo encontra-se disponível no meio. Entretanto, em condições de baixa disponibilidade ou mesmo ausência de OD, essas bactérias podem modificar o seu sistema enzimático e utilizar o oxigênio presente no nitrato e/ou nitrito como receptor final de elétrons. De acordo com Gerardi (2002), as bactérias desnitrificantes mais comuns e mais largamente distribuídas são as do gênero *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Bacillus*.

A redução do nitrato (NO_3^-) envolve a formação de uma série de produtos intermediários, com decrescente grau de oxidação, como o nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e nitrogênio gasoso (N_2) (Equação 4). Segundo Cuervo-López *et al.* (2009), cada uma dessas etapas é catalisada por uma enzima redutase específica, a qual é sintetizada quando as condições ambientais se tornam anóxicas. As enzimas envolvidas no processo de desnitrificação são: nitrato redutase (Equação 5), nitrito redutase (Equação 6), óxido nítrico redutase (Equação 7) e óxido nitroso redutase (Equação 8).



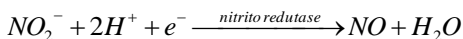
Equação 4

Reação de redução do nitrato a nitrito:

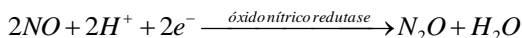


Equação 5

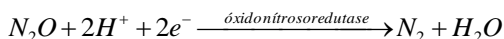
Reação de redução do nitrito a óxido nítrico:

**Equação 6**

Reação de redução do óxido nítrico a óxido nitroso:

**Equação 7**

Reação de redução do óxido nitroso a nitrogênio gasoso:

**Equação 8**

Cada etapa envolvida na desnitrificação pode ser inibida condicionalmente, fazendo com que produtos intermediários possam ser dissolvidos em água ou ainda escapar para a atmosfera (WIESMANN *et al.*, 2007). A emissão de óxido nitroso é bastante preocupante, devido ao fato de o mesmo ser um dos mais significativos gases de efeito estufa, com um potencial de aquecimento global aproximadamente 300 vezes maior do que o do dióxido de carbono, e por também ser um gás bastante estável que reage com o ozônio na estratosfera, causando a destruição da camada de ozônio (IPCC, 2001). Estima-se que cerca de dois terços de todo o N₂O emitido é atribuído aos processos microbiológicos que ocorrem principalmente na agricultura e no tratamento biológico de esgoto (USEPA, 2009). De acordo com Wunderlin *et al.* (2012), a produção de N₂O pelos organismos desnitrificantes heterotróficos se deve à atividade desequilibrada das enzimas redutoras de nitrogênio devido a inibição por oxigênio, à acumulação de nitrito, ou à disponibilidade limitada de compostos orgânicos biodegradáveis.

Os microrganismos desnitrificantes requerem ainda a disponibilidade de uma fonte de carbono orgânico (doador de elétrons), que pode ser adicionado externamente, como o metanol, ou que pode estar presente no próprio esgoto (JORDÃO & PESSÔA, 2005). No último caso, de acordo com USEPA (2009), o carbono orgânico pode estar na forma de produtos orgânicos solúveis degradáveis provenientes do afluente, de material orgânico solúvel produzido pela hidrólise do

material particulado presente no afluente, e de matéria orgânica liberada durante o decaimento endógeno da biomassa. Devido à nitrificação ocorrer tipicamente apenas após a remoção da matéria carbonácea, o fator limitante para a ocorrência da desnitrificação é muitas vezes a ausência de uma fonte de carbono facilmente biodegradável que pode ser utilizada pelos organismos desnitrificantes (USEPA, 2013). Sem a disponibilidade de uma fonte de carbono, a desnitrificação não ocorrerá, ou irá ocorrer muito lentamente, limitando a remoção de nitrogênio do sistema (USEPA, 2013).

Comparadas com as bactérias nitrificantes, as bactérias desnitrificantes são muito menos sensíveis às condições ambientais. Desta forma, quando a nitrificação se desenvolve, a desnitrificação também é possível (VAN HAANDEL *et al.*, 2009a). Entretanto, como exposto anteriormente, a presença de carbono biodegradável é o fator ambiental mais importante para a ocorrência do processo de desnitrificação.

2.2.3 Nitrificação-desnitrificação via nitrito

A nitrificação-desnitrificação via nitrito é um processo onde o nitrito é um intermediário em ambas as etapas de nitrificação e desnitrificação. O pré-requisito para a ocorrência da nitrificação-desnitrificação via nitrito é a interrupção da oxidação da amônia em nitrito, evitando a ação das NOB e permitindo apenas a ação das AOB. O nitrito é então reduzido diretamente a N_2 pelo processo de desnitrificação. Para que isso ocorra é necessário que as AOB se tornem dominantes e que as NOB sejam inibidas ou lavadas do sistema.

Na prática, a nitrificação parcial tem sido alcançada a partir do controle de variáveis operacionais relevantes, como temperatura elevada (VAN HULLE *et al.*, 2007; WAN *et al.*, 2014), baixa concentração de oxigênio dissolvido (ASLAN *et al.*, 2009), baixa idade do lodo (HELLINGA *et al.*, 1998; CHANGYONG *et al.*, 2011) e elevada concentração de amônia livre (NH_3) (SHI *et al.*, 2011).

Dentre estas variáveis, o controle do OD é a forma mais fácil e de maior custo-benefício para se alcançar a nitrificação parcial. As AOB apresentam uma maior afinidade com o OD do que as NOB. Desta forma, baixas concentrações de OD podem ajudar a reduzir o

crescimento das NOB, além de diminuir os gastos com a aeração (WEF, 2010). Entretanto, em longo prazo, a operação do sistema com baixo OD pode resultar em uma menor taxa de nitrificação, *bulking* do lodo ou ainda o aumento da produção de N_2O (CHUANG *et al.*, 2007; ZENG *et al.*, 2009). A obtenção de nitrificação parcial também é possível por meio da aeração intermitente, ou seja, alternância de períodos de baixa e alta concentração de OD (LI *et al.*, 2011; LOCHMATTER *et al.*, 2014).

O controle da idade do lodo também é um bom parâmetro operacional para a ocorrência da nitrificação parcial (HELLINGA *et al.*, 1998). Segundo Changyong *et al.* (2011), uma vez que as AOB e as NOB possuem diferentes velocidades de crescimento, o SRT pode ser empregado a fim de mudar a comunidade microbiana do sistema, acumulando as AOB e eliminando as NOB. Desta forma, em SRT mínimos, as NOB, que apresentam uma menor velocidade de crescimento, serão lavadas do sistema, e apenas a primeira etapa da nitrificação será realizada (WEF, 2010).

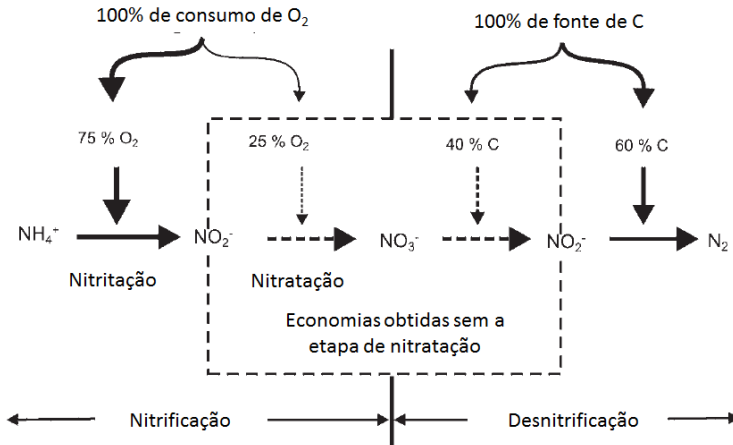
A inibição por amônia livre é um método comum para alcançar a nitrificação parcial, uma vez que a mesma tem um efeito inibidor maior nas NOB do que nas AOB. Segundo Anthonisen *et al.* (1976), em concentrações de NH_3-N acima de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ tem-se a inibição da AOB, enquanto que as NOB são inibidas com apenas $0,1-1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_3-N .

A remoção de nitrogênio via nitrito ($NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow N_2$) oferece diversas vantagens quando comparada com o processo convencional via nitrato ($NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow N_2$): cinética mais rápida dos processos de nitrificação e desnitrificação, economia de até 25% de energia durante a aeração, redução de até 40% da demanda de substrato orgânico, cinética de desnitrificação mais elevada e menor produção de biomassa (Figura 2) (WIESMANN *et al.*, 2007). Por requerer uma menor quantidade de matéria carbonácea, a remoção de nitrogênio via nitrito é uma opção particularmente interessante se a disponibilidade de carbono é um fator limitante para uma eficiente remoção de nutrientes (LOCHMATTER *et al.*, 2014).

A principal desvantagem deste processo está relacionada com a preocupação com o nitrito eventualmente remanescente após o tratamento, tendo em vista suas características mais prejudiciais ao ambiente do que o nitrato. Desta forma, é necessário haver uma remoção mais completa deste composto, ou sistemas de nitrificação adicionais, a

fim de eliminar o nitrito residual (SCHMIDELL & REGINATTO, 2007).

Figura 2. Esquema do processo de nitrificação e desnitrificação via nitrito.



Fonte: Wiesmann *et al.* (2007).

2.2.4 Nitrificação e desnitrificação simultâneas

Devido às diferentes condições ambientais requeridas pelas bactérias nitrificantes e desnitrificantes, as ETE convencionais são baseadas na separação espacial da nitrificação e da desnitrificação, ou na separação temporal, alternando fases aeradas e não aeradas na mesma unidade (PATUREAU *et al.*, 1997; HE *et al.*, 2009). Entretanto, nas últimas décadas, diversos estudos revelaram que essas duas importantes etapas da remoção do nitrogênio podem ocorrer simultaneamente em um mesmo reator sob condições aeróbias (PATUREAU *et al.*, 1997; NAKANO *et al.*, 2004; CHIU *et al.*, 2007; JU *et al.*, 2007; BAEK & PAGILLA, 2008; HE *et al.*, 2009; RAHIMI *et al.*, 2011; ZOU *et al.*, 2014). Este processo, conhecido como nitrificação e desnitrificação simultâneas (do inglês *simultaneous nitrification and denitrification* – SND), elimina a necessidade de dois reatores separados, simplificando o sistema de tratamento. A maioria dos trabalhos que reportaram a

ocorrência da SND foi realizada em reatores em bateladas sequenciais. Além disso, alguns autores mostraram ainda que é possível realizar o processo de SND via nitrito (YOO *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2014).

Ju *et al.* (2007) resumiram em três os mecanismos responsáveis pelas reações de SND: (1) presença de micro zonas anóxicas/aeróbias no interior dos flocos, biofilmes ou grânulos, devido à limitação da difusão de oxigênio; (2) presença de macro zonas anóxicas/aeróbias no interior do reator biológico; (3) presença de micro-organismos capazes de nitrificar e desnitrificar, simultaneamente, sob condições aeróbias.

1. Presença de micro zonas anóxicas/aeróbias no interior dos flocos, biofilmes ou grânulos:

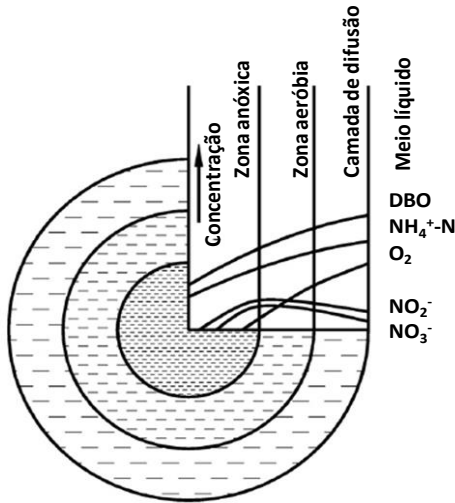
Devido à limitação da difusão de oxigênio, principalmente em biofilmes e grânulos, a concentração de OD no líquido não representa a real concentração de OD no interior dos agregados microbianos. De acordo com Ju *et al.* (2007), à medida que o oxigênio presente no meio líquido se difunde no agregado este é consumido pelos organismos, criando um gradiente de concentração de OD. Como consequência, existem dentro dos agregados zonas aeróbias com alta concentração de OD, onde os organismos nitrificantes estão ativos, e zonas anóxicas com baixa concentração de OD, onde estão preferencialmente ativos os organismos desnitrificantes (MUNCH *et al.*, 1996). Essa distribuição desigual de OD dentro da biomassa permite a proliferação simultânea de bactérias nitrificantes e desnitrificantes (CHIU *et al.*, 2007). Desta forma, o nitrato produzido na zona aeróbia pelo processo de nitrificação difunde-se, junto com os substratos, para a zona anóxica, de modo que a desnitrificação ocorre numa parte mais interna do floco (LIU *et al.*, 2010a). Entretanto, a profundidade de penetração de OD dentro dos agregados é controlada por meio da concentração de oxigênio no meio líquido, de tal modo que o volume da zona anóxica seja suficiente para a redução do nitrito e/ou nitrato (DE KREUK *et al.*, 2005a). Na Figura 3 apresenta-se o perfil da concentração de OD e do substrato em um agregado microbiano.

2. Presença de macro zonas anóxicas/aeróbias no interior do reator biológico:

Devido às condições de mistura e a distância do ponto de aeração, pode ocorrer à estratificação de OD no interior do reator, com a

existência de zonas aeróbias e anóxicas (METCALF & EDDY, 2003). Conseqüentemente, têm-se pontos de OD mínimo, onde a desnitrificação pode ocorrer, e máximo (perto dos aeradores), onde ocorre a nitrificação (VAN HAANDEL *et al.*, 2009a).

Figura 3. Concentração de OD e substrato em um agregado microbiano.



Fonte: He *et al.* (2009).

3. Presença de microrganismos capazes de nitrificar e desnitrificar, simultaneamente, em condições aeróbias:

Diversos autores demonstraram a habilidade de algumas bactérias em desnitrificar sob circunstâncias inteiramente aeróbias, como a *Thiosphaera pantotropha* (ROBERTSON *et al.*, 1988), *Comamonas sp.* (PATURÉAU *et al.*, 1997), *Microvirgula aerodenitrificans* (PATURÉAU *et al.*, 1998), *Citrobacter diversus* (HUANG & TSENG, 2001), *Pseudomonas aeruginosa* (CHEN *et al.*, 2003), *Alcaligenes faecalis* (JOO *et al.*, 2005) *Pseudomonas putida* (KIM *et al.*, 2008), *Providencia rettgeri* (TAYLOR *et al.*, 2009); *Paracoccus versutus* (ZHANG *et al.*, 2015), entre outras. Esses micro-organismos utilizam o oxigênio e o nitrato simultaneamente como aceptores de elétrons (corespiração), a fim de alcançar uma elevada velocidade de crescimento biológico (HUANG & TSENG, 2001).

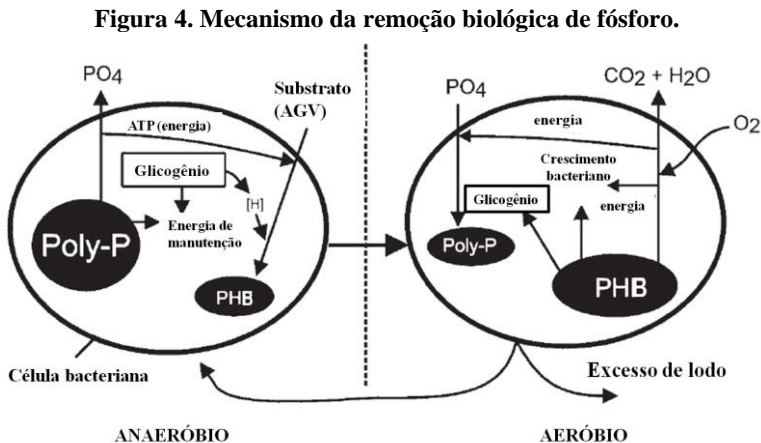
2.2 REMOÇÃO BIOLÓGICA DO FÓSFORO

As principais origens de fósforo nos esgotos domésticos são os detergentes, as proteínas e a urina. Os detergentes contribuem com a maior parcela na forma de polifosfatos correspondendo a cerca da metade do teor de fósforo total; as proteínas têm como origem principal a matéria fecal e restos de alimentos contribuindo com fósforo orgânico; e a urina contribui com fosfatos (NUNES, 2011).

Ao contrário do nitrogênio, o fósforo não possui uma forma gasosa que possa ser eliminada do meio líquido. Desta forma, a remoção biológica de fósforo de águas residuárias envolve a sua incorporação aos micro-organismos (REGINATTO & SCHMIDELL, 2007). Para isso é preciso estimular o crescimento de bactérias heterotróficas denominadas de organismos acumuladores de fosfato (do inglês *polyphosphate-accumulating organisms* – PAO), a partir da criação cíclica de condições aeróbias e anaeróbias (USEPA, 2010). As células das bactérias normais contêm armazenadas em torno de 2,6% em massa de fósforo enquanto que nos PAO esta percentagem sobe para 38% (NUNES, 2011). Assim, o processo de remoção biológica do fósforo se dá pela existência de uma dinâmica de liberação e absorção de fósforo pelos micro-organismos quando os mesmos são submetidos a mudanças de ambiente anaeróbio para aeróbio (SANT’ANNA JR., 2010). Além disso, outra condição básica para que haja a remoção do fósforo é a existência de ácidos graxos voláteis (AGV) na fase anaeróbia (REGINATTO & SCHMIDELL, 2007).

No decorrer da degradação da matéria orgânica via anaeróbia, são formados AGV pela ação de bactérias fermentativas. Os AGV, principalmente o acetato, servem de substrato para os PAO na formação de polihidroxibutirato (PHB). A energia das ligações do polímero polifosfato (Poly-P), existente no interior da célula dos PAO, é utilizada para regenerar o ATP a partir do ADP, possibilitando a síntese do PHB no interior da célula, além de energia para manter a viabilidade destas células no ambiente anaeróbio. Enquanto a energia das ligações fosfato é utilizada para regenerar o ATP, o fósforo inorgânico é liberado para o exterior da célula, aumentando assim a concentração deste nutriente na fase líquida (REGINATTO & SCHMIDELL, 2007). Desta forma, estabelece-se uma concentração de fósforo no líquido muito maior do que aquela encontrada no afluente (VAN HAANDEL *et al.*, 2009b).

Na fase aeróbia subsequente, os PAO oxidam o PHB intracelular a fim de gerar energia para o crescimento, síntese de glicogênio e absorção do fósforo presente no meio líquido (LEE *et al.*, 2001). Nessa fase a absorção do fósforo se dá em quantidades muito maiores do que as necessárias para o metabolismo bacteriano. Essa absorção em excesso de fósforo pelo lodo é chamada de *luxury uptake* (VAN HAANDEL *et al.*, 2009b). Entretanto, a remoção definitiva do fósforo do sistema se dá apenas com a retirada do lodo excedente, no qual se encontra armazenada grande quantidade de fósforo (NUNES, 2011). O mecanismo da remoção biológica do fósforo em condições anaeróbias e aeróbias está esquematizado na Figura 4.



Fonte: Wentzel *et al.* (1991).

A maioria dos processos biológicos para a remoção de fósforo utiliza condições cíclicas anaeróbias e aeróbias. No entanto, é possível obter a remoção do fósforo através de ciclos anaeróbio-anóxico, devido à habilidade desnitrificante de alguns PAO. Estes organismos utilizam nitrato ou nitrito ao invés do oxigênio como receptor de elétrons, promovendo simultaneamente a remoção de fósforo e a desnitrificação (OEHMEN *et al.*, 2007).

A disponibilidade de carbono facilmente degradável durante a fase anaeróbia é um pré-requisito essencial para uma eficiente remoção de fósforo. Entretanto, a presença de nitrito e/ou nitrato na fase anaeróbia pode acarretar em uma competição entre os organismos

desnitrificantes e os PAO pela utilização do carbono, o que por sua vez afeta a remoção global de fósforo. A remoção de nitrogênio via nitrito é uma nova abordagem que vem sendo utilizada para reduzir a quantidade de carbono necessária para a realização dos processos de desnitrificação e remoção biológica de fósforo (LOCHMATTER *et al.*, 2014).

2.3 REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS (RBS)

Os reatores em bateladas sequenciais são sistemas de tratamento de efluentes que operam em fluxo intermitente e consistem basicamente em um único tanque, o qual serve como reator biológico e também como decantador. Segundo Von Sperling (2002), utilizando tanque único, os processos e operações associados ao tratamento de esgotos são simplesmente sequências no tempo, não necessitando de unidades separadas, como ocorre nos processos de fluxo contínuo. Assim, todas as etapas do tratamento ocorrem em um ou mais reatores de mistura completa, através do estabelecimento de ciclos de operação que apresentam durações definidas.

A chave para o processo é o controle do sistema, o qual contém uma combinação de sensores de nível, temporizadores e microprocessadores que fornecem flexibilidade e precisão na operação dos RBS (GERARDI, 2010). No caso de esgotos domésticos, as reações biológicas de nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo podem ser alcançadas em altos níveis explorando-se a versatilidade do sistema, que pode operar em condições aeróbias, anóxicas e anaeróbias (GERARDI, 2010; SANT'ANNA JR., 2010).

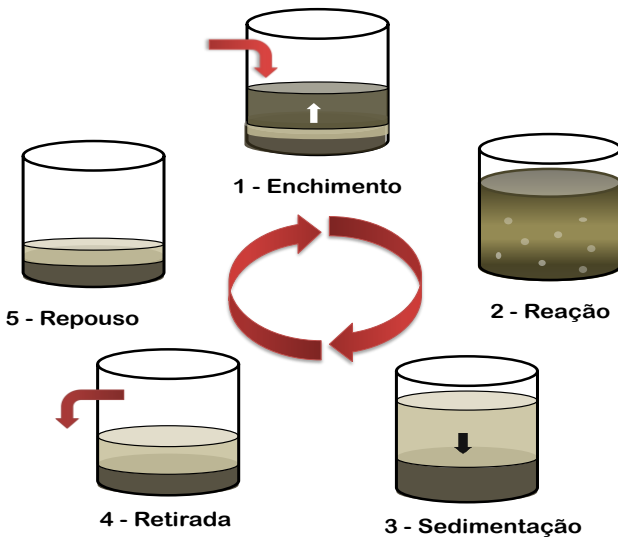
A operação do RBS envolve basicamente as seguintes fases (Figura 5): enchimento, reação, sedimentação, retirada e repouso. A ocorrência sucessiva de todas estas fases compõe o que se denomina de um ciclo, sendo que ao longo de um dia o sistema pode operar com um ou mais ciclos (JORDÃO & PESSÔA, 2005). No tratamento de esgoto doméstico, geralmente são usados de 4 a 6 ciclos por dia (GERARDI, 2010).

1. Enchimento:

Adição do esgoto bruto no reator, a qual pode ser realizada com os aeradores e/ou agitadores ligados ou desligados, dependendo do

objetivo do tratamento (SINGH & SRIVASTAVA, 2010). Desta forma pode-se ter *enchimento estático*, ou seja, sem aeração ou agitação; *enchimento agitado*, sem aeração, mas com os agitadores mecânicos ligados; e *enchimento aerado*, com os aeradores e agitadores ligados. O enchimento pode ser feito apenas uma vez durante o ciclo, ou ser realizado em diversas pequenas bateladas de esgoto (enchimento escalonado) até que o nível normal de operação seja atingido. Entretanto, a cada pequena batelada, a mesma deve ser aerada e tratada antes de a próxima ser introduzida ao reator (GERARDI, 2010). Segundo Al-Rekabi *et al.* (2007), a determinação do volume de enchimento é baseada em diversos fatores, tais como a carga que se deseja aplicar, o tempo de detenção e as características de sedimentação da biomassa.

Figura 5. Fases de operação de um RBS.



2. Reação:

Efetuar a remoção do substrato iniciada durante o enchimento. Esta etapa é realizada em mistura completa e pode apresentar uma alternância de condições aeróbias, anóxicas e anaeróbias por meio do ligamento/desligamento cíclico dos aeradores. Desta forma, é possível

obter condições operacionais que, além da remoção da matéria orgânica carbonácea, possibilitem também a ocorrência dos processos de nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo. De acordo com Al-Rekabi *et al.* (2007) e Singh & Srivastava (2010), a duração da fase de reação pode ser de 50% ou mais do tempo total do ciclo.

3. *Sedimentação:*

Desligamento dos aeradores e agitadores, e separação sólido/líquido, ou seja, nesta fase ocorre a sedimentação do lodo e a decantação do efluente tratado. Segundo Gerardi (2010), a sedimentação no RBS é geralmente mais eficiente, em termos de qualidade do sobrenadante, do que nos processos convencionais de fluxo contínuo, pois no RBS não há a interferência da entrada e/ou saída dos líquidos, permitindo que a sedimentação ocorra em condições completamente quiescentes. Entretanto, de acordo com NEIWPC (2005), a sedimentação é a parte mais crítica do ciclo, pois os sólidos que não sedimentam rapidamente podem sair do reator, degradando a qualidade do efluente.

4. *Retirada:*

Descarte do sobrenadante (efluente tratado) do reator. Segundo Singh & Srivastava (2010), o mecanismo de retirada deve ser projetado e operado de maneira a prevenir que algum material flotado saia com o efluente tratado. Geralmente, aproximadamente 25% do volume do RBS são descartados durante esta fase, sendo que a mesma pode ter uma duração de 30 a 60 minutos, dependendo do dispositivo de retirada utilizado (GERARDI, 2010).

5. *Repouso:*

Período em que a biomassa permanece no reator até o começo do próximo ciclo. Segundo Jordão & Pessôa (2005), a fase de repouso é usada para ajustar o tempo entre o fim de um ciclo e o início de outro, e para realizar a remoção do lodo excedente. Quando necessário, essa fase também pode ser usada para aumentar a duração de uma ou mais fases (ARTAN & ORHON, 2005).

De acordo com Gerardi (2010), o número de ciclos e o tempo de duração de cada fase são determinados pela quantidade de água residuária a ser tratada, a carga poluente aplicada, o nível de eficiência

requerida e o número de reatores disponíveis operando em paralelo na estação de tratamento.

Assume-se que nenhuma conversão biológica ocorra durante as fases de sedimentação, descarte e repouso. Os processos de remoção de substrato ocorrem principalmente durante as fases de enchimento e reação, a menos que o enchimento seja do tipo estático. Neste caso, o afluente é adicionado no reator em um tempo muito curto, não havendo uma mistura com o conteúdo remanescente do ciclo anterior (ARTAN *et al.*, 2001).

A utilização dos RBS possui diversas vantagens, visto que o projeto e operação dos reatores são simples e as características do processo operacional permitem uma maior flexibilidade dos ciclos de operação reator (GRADY *et al.*, 1999). Esta flexibilidade operacional está relacionada com a facilidade de ajuste de períodos aeróbios, anaeróbios e anóxicos por meio do controle temporal do sistema de aeração e do tempo de enchimento (ARTAN *et al.*, 2001). Desta forma, o RBS é uma opção de tratamento bastante indicada para os complicados processos que envolvem a remoção de nutrientes, no qual ocorrem diversas interações entre os processos devido aos diferentes consórcios microbianos que atuam sob diferentes condições (ARTAN *et al.*, 2001). No entanto, as desvantagens desses reatores estão associadas à descarga pontual do efluente tratado; exigência de alto nível de manutenção, quando comparados a outros sistemas; mecanismos de controle do processo mais sofisticados e consumo de energia para promover a mistura da biomassa e a aeração dentro do reator (GRADY *et al.*, 1999).

2.4 SISTEMAS DE GRÂNULOS AERÓBIOS

O desenvolvimento de grânulos aeróbios foi relatado pela primeira vez por Mishima & Nakamura (1991) em um reator de manta de lodo aeróbio operado com fluxo ascendente contínuo (do inglês *continuous upflow aerobic sludge blanket reactor*) utilizado para o tratamento de esgoto municipal. No fim da década de 90, Morgenroth *et al.* (1997) reportaram a formação e a aplicação dos grânulos aeróbios em RBS. A primeira patente desta tecnologia foi concedida em 1998 para Heijnen & van Loosdrecht. Desde então, os grânulos aeróbios têm sido

amplamente estudados no mundo todo utilizando principalmente reatores operados em bateladas sequenciais (PIJUAN *et al.*, 2011; BASSIN *et al.*, 2012a; COMA *et al.*, 2012; DI BELLA & TORREGROSSA, 2013; WAGNER & COSTA, 2013; LOCHMATTER *et al.*, 2014). Alguns autores mostraram ainda que é possível formar grânulos aeróbios utilizando reatores de fluxo contínuo (CHEN *et al.*, 2009; JUANG *et al.*, 2010; MORALES *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014). Entretanto, Chen *et al.* (2009) e Morales *et al.* (2012) reportaram que os grânulos desenvolvidos em um reator de fluxo contínuo são bastante instáveis.

Na Holanda, desde 1999, a empresa de consultoria em engenharia Royal Haskoning DHV e a Universidade Tecnológica de Delft estabeleceram uma parceria com o intuito de desenvolver um método viável para a obtenção de um processo de granulação aeróbia estável durante o tratamento de águas residuárias (GIESEN *et al.*, 2013). Em 2005, esta parceria resultou na tecnologia patenteada com o nome de Nereda®. Atualmente, 10 estações de tratamento encontram-se em operação, ou em construção, na Holanda, Portugal e África do Sul; e mais de 20 projetos estão previstos para diferentes lugares do mundo como Austrália, Brasil, Reino Unido, Polônia, França, e Alemanha.

2.4.1 Características dos grânulos aeróbios

A definição do termo “*grânulos aeróbios*” surgiu após discussões realizadas no primeiro workshop de lodo granular aeróbio (*1st IWA-workshop Aerobic Granular Sludge*), que ocorreu na cidade de Munique, Alemanha, em 2004. Segundo de Kreuk *et al.* (2005b), os grânulos aeróbios devem ser entendidos como sendo “*agregados de origem microbiana, que não coagulam sob reduzidas condições de cisalhamento hidrodinâmico e que sedimentam significativamente mais rápido que os flocos de lodos ativados*”. Quando um agregado cumpre todas as características descritas acima, ele pode ser então denominado de lodo granular aeróbio (LIU *et al.*, 2009).

Em comparação aos flocos, os grânulos aeróbios possuem uma estrutura física forte, regular e densa, elevada retenção de biomassa, excelente capacidade de sedimentação, elevada atividade, capacidade de tratar águas residuárias de alta concentração e suportar cargas de choque

(LIN *et al.*, 2003; LIU & TAY, 2004). Eles apresentam uma aparência bem definida e são visíveis como entidades separadas, de diâmetro maior do que 0,1 mm, após sedimentarem (LIU *et al.*, 2009). Além disso, uma vez que os grânulos aeróbios apresentam uma estrutura compacta, com tamanho variando geralmente entre 0,5 e 2 mm, a resistência à transferência de massa, especialmente à de oxigênio, é maior do que no floco de lodo ativado convencional (LIU & TAY, 2006). Como resultado da limitação da difusão de oxigênio, zonas aeróbias, anóxicas e anaeróbias podem existir simultaneamente dentro dos grânulos aeróbios (LI *et al.*, 2005). Isso oferece condições ambientais favoráveis para o crescimento de bactérias aeróbias e facultativas, possibilitando a remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo (WANG *et al.*, 2009).

Um dos atributos físicos mais importantes dos grânulos é a sua velocidade de sedimentação, a qual é significativamente mais elevada que a dos flocos. Isto significa que a capacidade de sedimentação do lodo pode ser melhorada por meio da formação de grânulos aeróbios. Isto possibilita uma maior retenção de biomassa no reator, o que resulta em uma elevada capacidade de remoção de substrato (SHOW *et al.*, 2012). Por apresentarem elevada capacidade de sedimentação, a separação entre a biomassa e o efluente tratado nos sistemas de grânulos aeróbios é bastante eficiente, gerando um sobrenadante clarificado, geralmente livre de sólidos em suspensão. Entretanto, de acordo com Schwarzenbeck *et al.* (2005), durante o período de partida (*start-up*) do reator e por razões de segurança, no caso da desintegração dos grânulos, um sistema de retenção da biomassa deve ser adicionado em uma etapa subsequente ao reator granular. Esses autores consideram que um processo de separação sólido/líquido é suficiente, desde que a eficiência de remoção biológica do reator seja elevada.

2.4.2 Processos de remoção de substrato em grânulos aeróbios

O desempenho de um sistema biológico para o tratamento de águas residuárias pode ser aumentado por meio da utilização de lodo granular. Isto ocorre devido às elevadas taxas de conversão e a eficiente capacidade de sedimentação da biomassa granular, o que por sua vez acarreta em uma diminuição do volume do reator. O crescimento da

biomassa em forma de grânulos compactos elimina a necessidade de grandes tanques de sedimentação e permite uma maior concentração de biomassa dentro do reator (SHOW *et al.*, 2012). A atratividade dos reatores granulares é realçada justamente por estes sistemas serem capazes de reter grande quantidade de micro-organismos no seu interior, permitindo assim a rápida metabolização dos poluentes, além de propiciar melhorias no desempenho e estabilidade do reator (BASSIN, 2011).

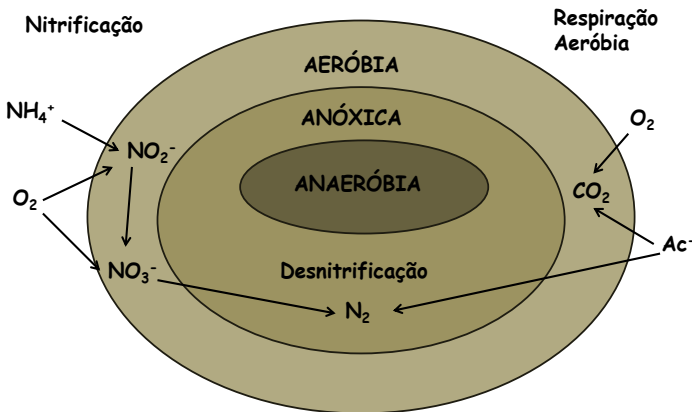
O mecanismo de remoção de nutrientes através de grânulos aeróbios é semelhante ao utilizado nos sistemas convencionais de lodos ativados, sendo que a principal diferença reside no fato de não ser necessária a utilização de diversos tanques, mas sim, a criação de diferentes zonas no interior do grânulo (DE KREUK, 2006). Estas zonas são camadas concêntricas com diferentes condições operacionais que permitem a remoção simultânea de matéria orgânica e de nitrogênio, sendo que o último é removido por meio do processo combinado de nitrificação-desnitrificação (Figura 6) (FIGUEROA *et al.*, 2009).

O modo como os diferentes processos ocorrem nos grânulos varia ao longo do ciclo operacional. Após o enchimento, a concentração de carbono orgânico (por exemplo, acetato – Ac⁻) no meio líquido é elevada (período de degradação, do inglês *feast period*). Esse substrato é completamente difundido para o interior dos grânulos, sendo parcialmente convertido e armazenado na forma de polímeros, como os polihidroxibutiratos (PHB). Em relação ao OD, o mesmo tem uma profundidade de penetração muito menor do que o carbono orgânico, em função do rápido consumo de OD pelos organismos autotróficos e heterotróficos localizados na camada externa do grânulo. Neste caso, o OD é usado principalmente para a nitrificação, conversão aeróbia do acetato e para o crescimento da biomassa. O nitrito e o nitrato, produzidos durante a nitrificação, vão difundir em direção ao centro dos grânulos. Nesta zona, o PHB está disponível para ser usado como fonte de carbono para o processo de desnitrificação. Desta forma, a remoção de nitrogênio ocorre no interior dos grânulos através do processo de SND (DE KREUK & DE BRUIN, 2004; FIGUEROA *et al.*, 2009).

Com a diminuição da concentração de substrato (período de inanição, do inglês *famine period*), a penetração de OD no grânulo vai ser maior do que no período de degradação, uma vez que a sua concentração no meio líquido vai ser mais elevada e o seu consumo dentro do grânulo vai ser menor (FIGUEROA *et al.*, 2009). Assim, a

eficiência do processo de SND é regulada pelo gradiente de oxigênio dentro do grânulo. Isto depende basicamente de dois aspectos: a concentração de oxigênio no meio líquido e o tamanho do grânulo. Esses dois aspectos determinam a espessura das zonas aeróbias e anóxicas no interior dos grânulos, o que por sua vez afeta o processo SND (DI BELLA & TORREGROSSA, 2013).

Figura 6. Combinação de processos de remoção de carbono e nitrogênio nos grânulos aeróbios.



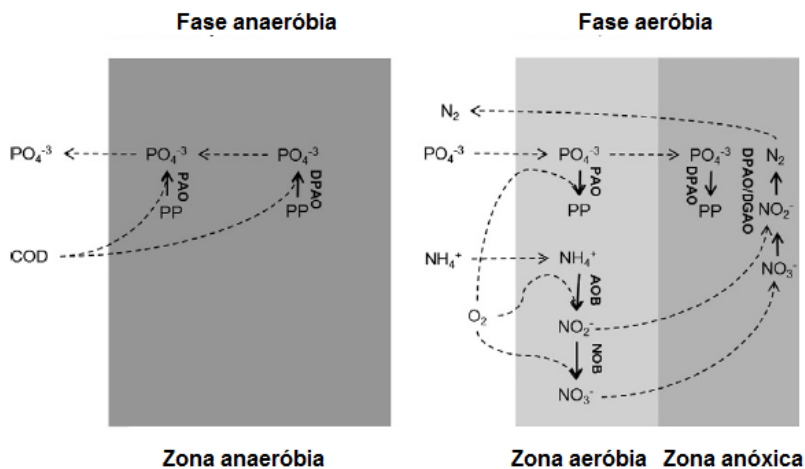
Fonte: Adaptado de Figueroa *et al.* (2009).

Alguns autores demonstraram ainda que os grânulos aeróbios podem ser uma alternativa adequada para a ocorrência dos processos de nitrificação-desnitrificação via nitrito (VÁZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2010; YUAN & GAO, 2010; SHI *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; WAN *et al.*, 2014; LOCHMATTER *et al.*, 2014).

Caso a remoção de fósforo esteja entre os objetivos do tratamento, é essencial que o reator de grânulos aeróbios seja alimentado em condições anaeróbias, durante um período relativamente longo, a fim de favorecer o desenvolvimento de PAO (BASSIN, 2011). Uma representação esquemática simplificada do processo é apresentada na Figura 7. Durante a fase anaeróbia, a maior parte da demanda química de oxigênio (do inglês *chemical oxygen demand* – COD) é absorvida pelos microrganismos, tais como os organismos acumuladores de

fosfato (PAO) ou os organismos acumuladores de glicogênio (do inglês *glycogen accumulating organisms* – GAO), os quais armazenam COD como polímeros intracelulares (PHB). Já na fase aeróbia, ocorre a nitrificação na zona aeróbia do grânulo enquanto que na zona anóxica os PAOs e os GAOS oxidam os polímeros previamente armazenados (BASSIN *et al.*, 2012b). De Kreuk *et al.*, (2005a) observaram que o enriquecimento de PAO no lodo granular aeróbio, por meio da alternância entre períodos de enchimento anaeróbio seguido de período de aeração, resultou em grânulos mais estáveis, com elevada eficiência de remoção de fósforo e nitrogênio, sendo este último removido pelo processo de SND.

Figura 7. Representação esquemática simplificada do processo de remoção de fósforo pelos grânulos aeróbios.



Fonte: Bassin *et al.* 2012b.

2.4.3 Mecanismos de formação dos grânulos aeróbios

A granulação do lodo é um processo resultante da auto imobilização dos micro-organismos, podendo ser considerada como uma formação especial de biofilme, mas sem a utilização de material suporte

(WANG *et al.*, 2005). Este processo envolve interações entre as células, as quais incluem fenômenos biológicos, físicos e químicos (LIU & TAY, 2004).

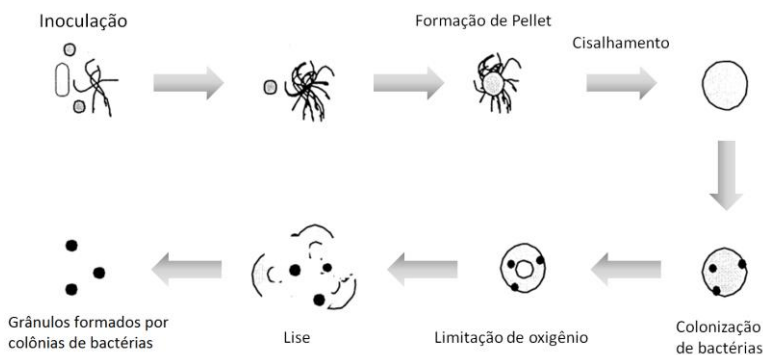
De acordo com Tay *et al.* (2001), de maneira geral, o processo de granulação se inicia pela formação de agregados densos a partir do lodo utilizado como inóculo, passando, posteriormente, para a forma de lodo granular e finalmente para grânulos maduros e compactos. Chen *et al.* (2006) dividiram o processo de formação dos grânulos em basicamente três etapas nomeadas aclimação, multiplicação e maturação, de acordo com a velocidade de crescimento específico dos grânulos.

Beun *et al.* (1999) propuseram um mecanismo de formação dos grânulos aeróbios (Figura 8). Após a inoculação de um RBS com lodo bacteriano, os fungos se tornam dominantes. Isto ocorre pois os fungos formam *pellets* de micélios, que apresentam boa sedimentação e, conseqüentemente, são retidos no reator. As bactérias sozinhas não possuem essa capacidade de sedimentação e são quase completamente lavadas do reator. Desta forma, durante o período de *start-up* do sistema, a biomassa presente no reator consiste principalmente de agregados filamentosos formados por fungos. Devido às forças de cisalhamento aplicadas, esses agregados se tornam mais compactos, e crescem até alcançar um diâmetro de 5-6 mm. A partir deste momento, ocorre a lise dos agregados, devido à limitação de oxigênio no interior dos mesmos. Esses agregados funcionam como uma matriz de imobilização, na qual as bactérias podem então crescer até formarem colônias. No momento da lise, as micro colônias de bactérias possuem uma melhor sedimentabilidade e são então retidas dentro do reator. Essas micro colônias resultam nos primeiros grânulos formados por bactérias, que posteriormente serão dominantes no sistema.

Para Liu & Tay (2002), o processo de biogranulação aeróbia ocorre em 4 etapas. Na *Etapa 1* ocorre o movimento físico responsável pelo contato inicial entre as bactérias. Esse movimento é proporcionado por forças hidrodinâmicas, de difusão e gravitacional, pelo movimento Browniano e pela mobilidade das próprias células. Na *Etapa 2* verifica-se a estabilização do contato multicelular resultante das forças de atração iniciais. Nesta etapa, os organismos filamentosos auxiliam a formação de uma estrutura tridimensional, a qual vai fornecer um ambiente estável para o crescimento aderido das bactérias. Na *Etapa 3* observa-se o crescimento e a maturação do aglomerado de células, formados a partir da produção de polímeros extracelulares, das

alterações metabólicas e da criação de ambientes que induzam alterações genéticas, as quais, por sua vez, facilitam as interações celulares e promovem o desenvolvimento de grânulos com uma estrutura organizada. Na *Etapa 4* atinge-se o estado estacionário da estrutura tridimensional do agregado microbiano, que foi moldada a partir das forças hidrodinâmicas.

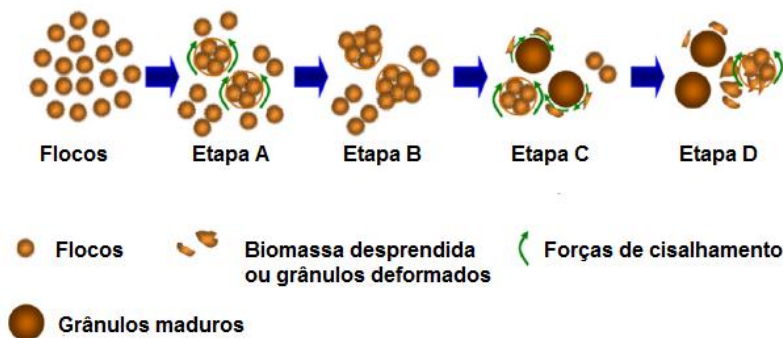
Figura 8. Processo de granulação aeróbia em um RBS.



Fonte: Beun *et al.* (1999).

Zhou *et al.* (2014) avaliaram a dinâmica do processo de granulação utilizando esgoto municipal (Figura 9). Para os autores, a formação dos grânulos nada mais é do que um balanço entre ligação e desprendimento, bem como de aglomeração e ruptura de biomassa, envolvendo quatro 4 etapas distintas. Na *Etapa A*, são formados grânulos jovens com superfícies irregulares devido à autoaglomeração da biomassa floclenta, estimulada pelas colisões entre as partículas e pela produção de substâncias poliméricas extracelulares (do inglês *extracellular polymeric substances* – EPS). Na *Etapa B*, ocorre o crescimento dos grânulos em função da contínua ligação de biomassa. Na *Etapa C*, ocorre novamente a autoaglomeração dos flocos remanescentes e das novas células formadas, devido à falta de um núcleo (jovens grânulos) com uma superfície irregular no qual eles podem se ligar. Na *Etapa D*, ocorre a regranulação dos flocos desprendidos das novas células e dos grânulos deformados pelo tempo.

Figura 9. Dinâmica do processo de granulação aeróbia.



Fonte: Zhou *et al.* (2014).

2.4.4 Principais fatores que afetam a granulação aeróbia

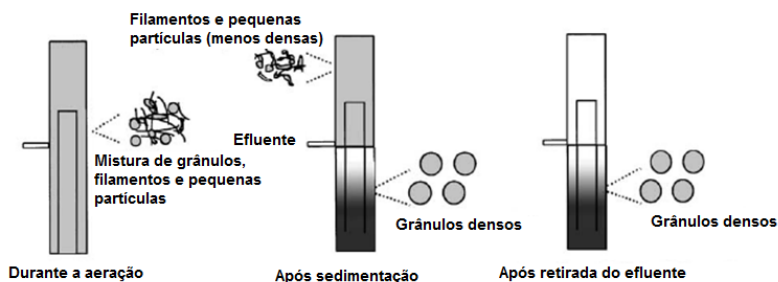
Como dito anteriormente, a granulação aeróbia é um processo de evolução progressiva do lodo utilizado como inóculo, geralmente flocos de lodo ativado, até a obtenção de grânulos densos. Os grânulos aeróbios são cultivados em condições controladas, sendo um processo influenciado por diversos fatores (SHOW *et al.*, 2012). O estado da arte da tecnologia dos biogranulação foi publicado em 2004 por Liu & Tay, no qual os fatores que afetam a formação dos grânulos foram amplamente discutidos (LIU & TAY, 2004). No presente trabalho, apenas dois aspectos foram abordados: cisalhamento hidrodinâmico e tempo de sedimentação.

Um aspecto importante no processo de granulação é que elevadas forças de cisalhamento hidrodinâmico, ocasionadas por elevadas taxas de aeração, devem ser aplicadas a fim de favorecer a formação e a estabilidade dos grânulos. No estágio inicial de granulação, as forças de cisalhamento direcionam os flocos a colidirem e agregarem. Além disso, o cisalhamento arranca as partes irregulares dos grânulos, fazendo com que a sua superfície se torne regular e esférica (ZHOU *et al.*, 2014). De acordo com Liu *et al.* (2005), elevadas forças de cisalhamento estimulam as bactérias a secretar mais EPS, as quais contribuem para a adesão das células e para a manutenção da integridade estrutural do agregado. 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 & TAY, 2006). No entanto, a aplicação de elevadas taxas de aeração, a fim de obter condições de cisalhamento satisfatórias, conduz a um consumo substancial de energia, o que é economicamente impraticável em escala real.

Igualmente, o tempo de sedimentação também tem uma influência significativa na seleção de grânulos. De acordo com Qin & 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; BEUN *et al.*, 1999). 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). Um esquema dessa seleção está apresentado na Figura 10. As partículas que sedimentam rápido ficarão retidas no reator, e as que não sedimentam suficientemente rápido serão “lavadas” do reator saindo com o efluente tratado (FIGUEROA *et al.*, 2009; LIU & TAY, 2004). Desta forma, o tempo de sedimentação vai selecionar preferencialmente o crescimento de biopartículas com boa sedimentabilidade, o que por sua vez vai assegurar uma granulação rápida e eficiente (NI *et al.*, 2009).

Figura 10. Seleção da biomassa com boa sedimentabilidade em um RBS de grânulos aeróbios.



Fonte: Beun *et al.* (2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em cooperação com o Instituto Federal Suíço de Ciência e Tecnologia Aquática (*Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology – EAWAG*). Foram utilizados três sistemas experimentais para responder aos objetivos específicos da pesquisa.

3.1 SISTEMA EXPERIMENTAL I (SE-I)

3.1.1 Características gerais

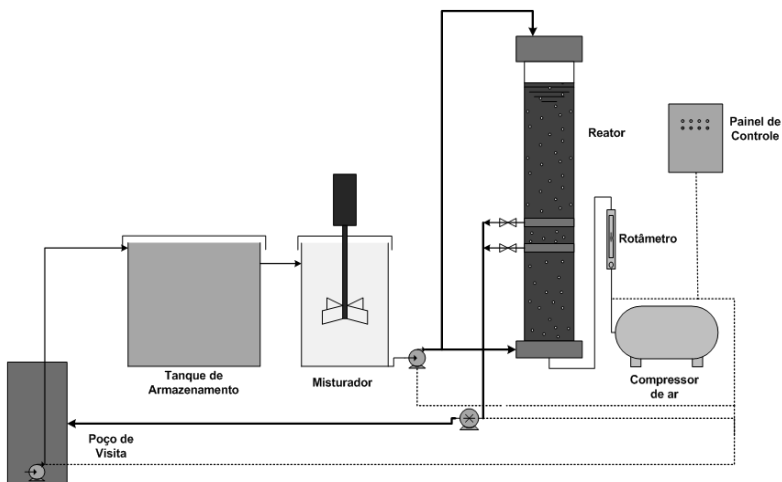
O *Sistema Experimental I* foi instalado no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Este sistema era composto por unidades de captação de esgoto bruto, tanques de armazenamento, bombas, reator piloto, rotâmetro, compressor de ar e sistema de automação. Um esquema da configuração do sistema experimental pode ser visualizado na Figura 11.

O sistema era alimentado com esgoto de origem doméstica (mas que também recebia contribuições de outras fontes não residenciais), proveniente da rede pública coletora de esgotos do bairro Pantanal, na cidade de Florianópolis, SC. O esgoto era captado por meio de uma bomba submersa instalada no poço de visita pertencente à Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN) e enviado para um tanque de armazenamento com capacidade para 5000 L. A fim de evitar a entrada de materiais sólidos grosseiros que poderiam danificar o sistema de captação, a bomba submersa (marca Schneider, BSC-94, $\frac{3}{4}$ CV, monofásica, 60 Hz) encontrava-se alojada dentro de um tubo perfurado de PVC (diâmetro dos furos igual a 10 mm). Esta bomba era acionada a cada 25 min por um período de 5 min, com o intuito de sempre renovar o esgoto armazenado no tanque.

Do tanque de armazenamento, o esgoto seguia, por gravidade, para um tanque intermediário de capacidade de 1000 L, com misturador mecânico (motor elétrico do tipo vertical 1750 rpm, 60 Hz), de onde era

então bombeado (marca Jacuzzi, 3A-T, $\frac{1}{3}$ CV, trifásica, 60 Hz) para o interior do reator nos períodos de enchimento de cada ciclo operacional. Este misturador era ligado a cada 25 min, durante 35 s, a fim de impedir a sedimentação dos sólidos presentes no esgoto bruto.

Figura 11: Sistema Experimental I.



Para um maior controle do tempo necessário para encher o reator, um inversor de frequência (marca Danfoss, FC51 PK37, $\frac{1}{2}$ CV) foi conectado à bomba de enchimento. Assim, foi possível aumentar ou diminuir a vazão da bomba, de acordo com o desejado. O reator possuía ainda duas possibilidades de enchimento: uma na parte superior e outra na parte inferior. Na canalização da parte inferior estava instalada uma válvula solenoide (marca Danfoss, EV220B $\frac{3}{4}$ "') a fim de impedir o esvaziamento do reator durante as fases de enchimento e reação, ou ainda a entrada de ar durante o descarte do efluente tratado.

O RBS utilizado para o cultivo de grânulos aeróbios (Figura 12) foi construído em coluna cilíndrica de acrílico transparente, apresentando as seguintes dimensões: 3,0 m de altura e 0,25 m de diâmetro interno. A altura útil utilizada para o tratamento foi de 2,42 m, o que corresponde a um volume máximo de 118,7 L. Seguindo as recomendações de Beun *et al.* (1999), o reator apresenta uma alta razão

entre a altura e o diâmetro (A/D em torno de 10), a fim de favorecer a seleção dos grânulos pela diferença na velocidade de sedimentação.

Ao término do ciclo de tratamento, o efluente tratado era bombeado (marca Schneider, BC 98SC, $\frac{1}{2}$ CV, monofásica, 60 Hz) para a rede coletora da CASAN, em um ponto à jusante da captação. Assim como para o enchimento, havia duas opções de altura de descarte: um a 79,5 cm e o outro a 98,5 cm da base do reator. Essas diferentes alturas de descarte possibilitavam o enchimento de volumes de esgoto iguais a 79,2 e 69,7 L, o que por sua vez corresponde a valores de percentual de troca volumétrica ($V_{\text{enchimento}}/V_{\text{reator}}$) iguais a 67 e 59%, respectivamente.

Figura 12. Reator piloto do Sistema Experimental I.



A aeração era feita por meio de um compressor (marca Air Pump – Modelo EL – 100, capacidade de $100 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) que enviava ar comprimido para o interior do reator através de um difusor circular do tipo membrana, instalado na parte inferior do reator. A linha de ar comprimido era composta ainda por filtros, válvulas reguladoras de

pressão e rotâmetro, sendo este último destinado à medição e ao controle da vazão de ar aplicada (entre 36 e 40 L·min⁻¹) ao reator.

O funcionamento destes equipamentos era automatizado por meio de um controlador lógico programável (CLP) localizado em um painel de comandos elétricos. Por meio do CLP, era possível controlar a duração de cada fase do ciclo operacional do reator, o acionamento e desligamento das bombas de enchimento/descarte e do compressor de ar. Para o controle de nível de esgoto dentro do reator foram instalados dois sensores de nível, os quais foram conectados ao CLP. No painel de controle estavam instalados botões que sinalizam a fase do ciclo durante o funcionamento do reator e também possibilitavam o controle manual do sistema.

3.1.2 Inoculação do reator

O reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios (RBSG) foi inoculado com 40 L de lodo ativado proveniente do tanque de recirculação de lodo de uma estação de tratamento de esgoto da cidade de Florianópolis – SC. O lodo utilizado como inóculo apresentava uma concentração de sólidos suspensos totais (SST) de 3,7 g_{SST}·L⁻¹ e um índice volumétrico de lodo (IVL₃₀) de 297 mL·g_{SST}⁻¹. O restante do volume do reator foi completado com esgoto bruto, o qual foi mantido em contato com o lodo em condições aeróbias por 22 h. Após esse período, procedeu-se a sedimentação do lodo e a retirada do efluente, e em seguida iniciou-se a operação do reator.

3.1.3 Operação do reator

O RBSG foi operado por 250 dias em sucessivos ciclos com duração de 4 h, com fases e tempos distribuídos da seguinte maneira: enchimento estático (sem aeração ou agitação) na parte inferior do reator (15-20 min), reação aeróbia (188,5-218,5 min), sedimentação (35-10 min) e descarte do efluente tratado (1,5 min). A alimentação pela parte inferior do reator permitiu que o esgoto bruto fosse introduzido na camada de lodo sedimentada, onde se deu o início do processo de

degradação do substrato. A utilização de ciclos operacionais com duração de 4 h baseou-se nos resultados obtidos por Wagner & Costa (2013). Durante o período de partida do reator, reduziu-se o tempo de sedimentação semanalmente de 5 em 5 min, partindo de 35 min até atingir o tempo final de 10 min. Esta estratégia de operação foi necessária para selecionar as partículas de melhor sedimentabilidade, favorecendo a formação dos grânulos aeróbios. Desta forma o tempo da fase de aeração foi aumentado proporcionalmente a cada diminuição do tempo de sedimentação. O volume de enchimento foi de 69,7 L, o que corresponde a um percentual de troca volumétrica (PTV) igual a 59%. O reator foi operado em temperatura ambiente e sem controle de pH. A vazão de ar aplicada ao reator foi entre 36 e 40 L·min⁻¹, o que corresponde a uma velocidade superficial ascensional de ar entre 1,2 e 1,4 cm·s⁻¹. Estes valores foram adotados com base nos estudos realizados por McSwain & Irvine (2008), que concluíram que os grânulos aeróbios não são estáveis quando são aplicadas velocidades superficiais ascensionais de ar menores do que 1,2 cm·s⁻¹, em sistemas onde a força de cisalhamento é controlada somente pela taxa de aeração.

O reator foi alimentado com esgoto real de origem doméstica. As características do esgoto e as cargas aplicadas durante a operação do sistema estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características do esgoto doméstico e cargas aplicadas durante a operação do Sistema Experimental I.

Parâmetros	Unidade	SE-I ⁽¹⁾
Demanda química de oxigênio total (DQOt)	mg·L ⁻¹	588,1 ± 162,5 (57)
Demanda química de oxigênio solúvel (DQOs)	mg·L ⁻¹	304,4 ± 82,2 (57)
Nitrogênio total kjeldahl (NTK)	mg·L ⁻¹	83,2 ± 18,3 (53)
Nitrogênio amoniacal (NH ₄ ⁺ -N)	mg·L ⁻¹	82,2 ± 17,8 (53)
Fósforo total (Pt)	mg·L ⁻¹	7,81 ± 1,97 (30)
Carga orgânica	kg DQOs·m ⁻³ ·d ⁻¹	1,07 ± 0,3 (57)
Carga nitrogenada	kg NH ₄ ⁺ -N·m ⁻³ ·d ⁻¹	0,29 ± 0,06 (53)
Carga de fósforo	kg Pt·m ⁻³ ·d ⁻¹	0,03 ± 0,01 (30)

⁽¹⁾ média ± desvio padrão (número de dados)

As paredes do reator eram limpas periodicamente a fim de impedir a formação de biofilme. Esse procedimento foi adotado tendo em vista que os micro-organismos presentes no biofilme podem entrar

em competição com os grânulos. Quando o crescimento do biofilme é limitado por meio da limpeza das paredes do reator, o crescimento dos micro-organismos na forma de grânulos é favorecido (MORGENROTH *et al.*, 1997).

3.1.4 Monitoramento do sistema

3.1.4.1 Análises físico-químicas

A fim de monitorar o desempenho do sistema, foram coletadas amostras do afluente bruto (entrada do reator), licor misto (lodo) e efluente tratado (saída do reator), duas vezes por semana. A cada três semanas era realizado o monitoramento de um ciclo padrão, com coletas de amostras de entrada e saída e ao longo da fase aeróbia, com o objetivo de verificar a variação da concentração do substrato em termos dos parâmetros monitorados. A determinação da concentração de sólidos no reator foi realizada com amostras de licor misto, coletadas ao fim da fase de aeração, a fim de evitar interferências dos sólidos provenientes do esgoto bruto. As análises físico-químicas nas amostras coletadas foram realizadas seguindo as metodologias recomendadas pelo Standard Methods (APHA, 2005). Os métodos e frequência das análises estão listados na Tabela 3.

3.1.4.2 Análises morfológicas e microbiológicas

O acompanhamento da formação e da morfologia dos grânulos foi realizado semanalmente por meio da utilização de microscópio ótico (marca Olympus BX-40) e de estereomicroscópio (lupa – marca Tecnival). As imagens microscópicas foram obtidas utilizando o software Micrometrics® SE Premium. A observação da estrutura dos grânulos maduros foi realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (marca JEOL JSM-6390LV) pelo Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

Tabela 3. Métodos e frequência das análises físico-químicas.

Análises	Amostras	Métodos	Frequência
Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (T) e pH	Afluente, ao longo do ciclo e efluente	Sonda multi-parâmetro (YSI 6820)	duas vezes por semana
Alcalinidade	Afluente, ao longo do ciclo e efluente	Método da Titulação com H ₂ SO ₄	uma vez por semana
Nitrito (NO ₂ ⁻ -N), nitrato (NO ₃ ⁻ -N) e fosfato (PO ₄ ³⁻ -P)	Afluente, efluente e ao longo do ciclo	Cromatografia líquida de troca iônica (DIONEX DX 120). SM* 4110C	duas vezes por semana
Nitrogênio amoniacal (NH ₄ ⁺ -N)	Afluente, efluente e ao longo do ciclo	Método colorimétrico de Nessler. 17.20 Vogel (2002)	duas vezes por semana
Nitrogênio total kjeldahl (NTK)	Afluente e efluente	Digestão e destilação VELP. SM 4500 - Norg B	duas vezes por semana
Fósforo total (Pt)	Afluente e efluente	Método molybdovanadato. SM 4500P C	duas vezes por semana
Demanda química de oxigênio solúvel (DQOs)	Afluente, efluente e ao longo do ciclo	Método colorimétrico em refluxo fechado. SM 5220D	duas vezes por semana
Demanda química de oxigênio total (DQOt)	Afluente e efluente	Método colorimétrico em refluxo fechado. SM 5220D	duas vezes por semana
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO ₅)	Afluente e efluente	Método manométrico HACH	duas vezes por semana
Sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos fixos (SSF)	Afluente, licor misto e efluente	Método gravimétrico em membrana de fibra de vidro (0,47µm). SM 2540	duas vezes por semana

*SM = Standard Methods

Para a identificação dos micro-organismos presentes nos grânulos aeróbios atuantes na remoção de nutrientes foi utilizada a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Esta técnica foi realizada, conforme descrito por Amann (1995), em amostras mensais coletadas no licor misto. A fim de obter uma amostra homogênea, antes da etapa de fixação, os grânulos foram mecanicamente macerados com um bastão de vidro. Após a maceração, a amostra passou por um processo de desintegração ultrassônica (marca Unique, 55 KHz, USC-700). A amostra era então fixada em paraformaldeído 4% e hibridizada com as sondas apresentadas na Tabela 4. As células microbianas foram detectadas por coloração com 1% de 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) e observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX41). A fim de quantificar a população bacteriana, 10 campos foram escolhidos aleatoriamente para cada amostra e determinou-se, por meio de análise de imagem digital, a relação entre a área das células marcadas pela sonda específica e a área de todas as bactérias coradas com DAPI (100%).

Tabela 4. Descrição das sondas utilizadas na detecção dos micro-organismos presentes nos grânulos pela técnica de FISH.

Sonda	Especificidade	Sequência (5' - 3')
EUBmix (I+II+III)	Maioria das Eubactérias	I - CTG CCT CCC GTA GCA
	<i>Planctomycetales</i>	II - CAG CCA CCC TAG GT GT CTG
	<i>Verrucomicrobiales</i>	III - CCA CCC GTA GGT GT
NEU	<i>Nitrosomonas</i> sp.	CCC CTC TGC TGC ACT CTA
NIT3	<i>Nitrobacter</i> sp.	CCT GTG CTC CAT GCT CCG
NSO190	Oxidadoras de amônia β- Proteobacteria	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C
Ntspa662	<i>Nitrospira</i>	GGA ATT CCG CGC TCC TCT
THIO51	Alguns <i>Thiobacillus</i>	GTC ATG AAA CCC CGC GTG
PAO651	<i>Candidatus</i> "Accumulibacter"	CCC TCT GCC AAA CTC CAG
PAE997	<i>Pseudomonas</i> spp.	TCT GGA AAG TTC TCA GCA

3.1.4.3 Características físicas dos grânulos

As características de sedimentabilidade do lodo foram determinadas de acordo com uma versão modificada do índice volumétrico do lodo (IVL) proposto por Schwarzenbeck *et al.* (2004),

denominada de IVL dinâmico. Esses autores consideram que o método tradicional de determinação de IVL não é apropriado para descrever a sedimentabilidade dos grânulos aeróbios, uma vez que os mesmos sedimentam mais rápido que a biomassa floculada. Deste modo, no método dinâmico, o IVL é determinado em diferentes tempos de sedimentação, e não apenas após 30 minutos, como no método tradicional. Com base na literatura especializada, neste estudo escolheu-se determinar o volume do lodo após 5, 10 e 30 minutos de sedimentação em uma proveta graduada de 1 L. Esta análise foi realizada semanalmente, em amostras de lodo coletadas ao fim da fase de aeração. O IVL foi então calculado utilizando-se a Equação 9.

$$IVL_t = \frac{VLS \times 1000}{SST}$$

Equação 9

Onde t é o tempo de sedimentação (min), VLS é o volume de lodo sedimentado ($\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$) e SST é a concentração de sólidos suspensos totais da amostra ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada por meio de análise granulométrica por difração a laser (Mastersizer 2000, Malvern Instrument SA). Esta técnica baseia-se na capacidade das partículas em difratar luz. Qualquer partícula iluminada por um feixe laser difrata luz em todas as direções com uma distribuição de intensidade que depende da dimensão da partícula. Desta forma, a granulometria por difração a laser é uma técnica de medida indireta, utilizada para obter a distribuição granulométrica do tamanho das partículas em suspensão.

As amostras foram coletadas duas vezes por semana em três diferentes pontos do reator: parte superior, meio e parte inferior. Essas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina, para a realização das análises granulométricas. Durante a análise, as amostras de lodo eram dispersas em água e mantidas em suspensão sob uma rotação de no máximo 500 rpm. Acima desta rotação, verificou-se a desintegração das partículas.

A partir da análise granulométrica foi possível obter os valores de $D(0,1)$ e $D(0,9)$, os quais correspondem aos percentis 10 e 90 da

distribuição de diâmetro das partículas. Os valores apresentados representam a média dos valores obtidos em cada uma das três amostras. Além disso, o tamanho médio dos grânulos foi determinado de duas maneiras: para os agregados menores do que 2000 μm utilizou-se o valor fornecido pelo próprio *software* do equipamento Mastersizer; e para os agregados maiores do que 2000 μm utilizou-se o *software* QCapture Pro (7,0 V, QImaging, Canadá) para a análise de imagem dos grânulos.

3.2 SISTEMA EXPERIMENTAL II (SE-II)

3.2.1 Características gerais

O *Sistema Experimental II* foi instalado no Departamento de Engenharia de Processos, do Instituto Federal Suíço de Ciência e Tecnologia Aquática (*Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology* - EAWAG). Dois reatores de 10,2 L (0,12 m de diâmetro interno e 1,2 m de altura) foram utilizados para a formação de grânulos na ausência (R1) e na presença (R2) de material particulado (X_S) (Figura 13). Os reatores apresentavam a mesma razão entre a altura e o diâmetro (A/D igual a 10) do reator do *Sistema Experimental I*.

Os reatores foram operados em paralelo e alimentados com substrato sintético, a fim de se ter um maior controle da carga aplicada ao sistema, uma vez que a composição de efluentes reais pode sofrer alterações até mesmo diárias. O meio sintético do R1 consistia apenas de substrato solúvel (S_S) enquanto que o meio sintético do R2 consistia em uma mistura de substrato solúvel e particulado (S_S+X_S). Maiores detalhes da composição do substrato estão descritos no item 3.2.4. Para obtenção de cada substrato, antes da fase de enchimento, a respectiva solução concentrada (S_S ou S_S+X_S) armazenada em uma geladeira era bombeada para um tanque intermediário. Água da torneira era bombeada de um tanque de armazenamento (capacidade de 200 L) para cada um dos tanques intermediários, para diluir as soluções concentradas e obter as concentrações desejadas. Na fase de enchimento, o substrato sintético previamente diluído era então bombeado do tanque intermediário para o interior de cada um dos

reatores. Todas as bombas utilizadas eram do tipo peristáltica (PD 5001, Heidolph). A vazão das bombas era verificada semanalmente, a fim de garantir um tempo de enchimento de 60 min (*Experimentos 1-3*) ou 90 min (*Experimento 4*), e também a correta diluição das soluções concentradas. Igualmente, teve-se sempre a precaução de não deixar os tanques intermediários vazios, para impedir a entrada de ar durante o enchimento, especialmente durante o *Experimento 4* (enchimento e descarte simultâneos). A entrada de ar durante a fase de enchimento pode acarretar o arraste do lodo sedimentado no fundo do reator. O tanque intermediário e o frasco da solução concentrada do R2 foram colocados sobre um agitador magnético, com o intuito de manter o material particulado continuamente em suspensão.

Figura 13. Reatores do Sistema Experimental II.



Após o ciclo de tratamento, o efluente era descartado por gravidade (*Experimentos 1-3* – volume útil variável) ou por escoamento permanente (*Experimento 4* – volume útil constante). A linha de

descarte do efluente tratado era composta por válvulas solenoides de acionamento elétrico.

A aeração era feita por meio de um compressor que enviava ar comprimido para o interior dos reatores, passando primeiramente por válvulas de ar e rotâmetros (um para cada reator). Controladores digitais de tempo foram utilizados para controlar a duração de cada fase do ciclo operacional, o acionamento e desligamento das bombas, e a abertura e fechamento das válvulas de ar e de água.

3.2.2 Inoculação dos reatores

O R1 foi inoculado com 5 L de lodo ativado proveniente do tanque de aeração de uma estação de tratamento de esgoto municipal (ARA Thunersee) da cidade de Thun, Suíça. Nesta estação é realizado o tratamento biológico completo de nitrogênio e fósforo. O lodo utilizado como inóculo apresentava uma concentração de sólidos suspensos totais (SST) de $3,4 \text{ g}_{\text{SST}} \cdot \text{L}^{-1}$ e um índice volumétrico de lodo (IVL_{30}) de $103 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{SST}}^{-1}$. Depois de 25 dias de aclimação com o esgoto sintético contendo apenas substrato solúvel (S_S), metade do volume de lodo do R1 foi adicionado no R2 e a partida dos dois sistemas foi feita em paralelo e com a mesma concentração de biomassa ($3,5 \text{ g}_{\text{SST}} \cdot \text{L}^{-1}$).

3.2.3 Operação dos reatores

O *Sistema Experimental II* foi operado por 250 dias, sendo que a operação do mesmo foi subdividida em quatro experimentos distintos. Neste sistema foi avaliado o efeito da presença de X_S na formação dos grânulos e no desempenho dos reatores em diferentes condições operacionais (Tabela 5). No geral, os reatores foram operados em modo RBS com ciclos de 4 h de duração, com fases distribuídas de acordo com o objetivo de cada experimento. Em todos os experimentos, durante a fase de reação aeróbia, o ar foi introduzido no reator a uma velocidade superficial ascensional de $1,2 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. O percentual de troca volumétrica dos reatores foi de 50% e não houve controle de pH e/ou de temperatura.

Tabela 5. Detalhes das condições operacionais aplicadas ao R1, alimentado com substrato solúvel (S_S), e R2, alimentado com uma mistura de substrato solúvel e particulado (S_S+X_S), nos diferentes experimentos.

Experimentos	Efeitos estudados	Período de operação (d)	Volume do RBS	Fases do ciclo				
				Enchimento anaeróbio (min)	Reação anaeróbia (min)	Reação aeróbia (min)	Sedimentação (min)	Descarte + repouso (min)
Experimento 1	Presença e ausência de X_S	0-66	Variável	60	-	167	8	5
Experimento 2	Aumento da fase anaeróbia no R2	66-109	Variável	60	R1 - 0 R2 - 30	R1 - 167 R2 - 137	8	5
Experimento 3	Aumento da seleção da biomassa	109-176	Variável	60	R1 - 0 R2 - 30	R1 - 171 R2 - 141	4	5
Experimento 4	Enchimento e descarte simultâneos	176-250	Constante	90	-	146	4	-

O *Experimento 1* teve como objetivo avaliar o processo de granulação em si, em condições de ausência (R1) e presença (R2) de X_S . Neste experimento, o ciclo operacional consistia de 60 min de enchimento anaeróbio pela parte inferior do reator, 167 min de reação aeróbia, 8 min de sedimentação, 3 min de descarte do efluente e 2 min de repouso. Os efluentes tratados eram descartados por uma saída localizada na metade da altura útil do reator, resultando em uma operação com volume variável, para ambos os reatores.

O *Experimento 2* teve como objetivo avaliar até que ponto o aumento da fase anaeróbia pode favorecer o processo de remoção de X_S e influenciar as características dos grânulos e o desempenho do reator. Desta forma, aumentou-se a duração da fase anaeróbia do R2 para 90 min, com 60 min de enchimento anaeróbio e 30 min de reação anaeróbia estática (sem mistura). Devido à ocorrência de alguns problemas operacionais, a operação do R1 teve que ser interrompida durante o *Experimento 2*. Após a reinoculação do sistema, o R1 foi operado nas mesmas condições previamente descritas durante o *Experimento 1*, uma vez que o mesmo era alimentado apenas com substrato solúvel, não requerendo assim um aumento da fase anaeróbia.

No *Experimento 3*, o efeito do aumento da seleção entre a biomassa granular e floculenta foi investigado. Para isso, reduziu-se o tempo de sedimentação de ambos os reatores de 8 para 4 min, a fim de lavar os flocos com o efluente tratado e manter no reator apenas os agregados com boa sedimentabilidade, isto é, os grânulos.

No *Experimento 4* foi avaliado o efeito da operação dos reatores com enchimento e descarte simultâneos (volume constante). Após a fase de sedimentação, os reatores eram diretamente alimentados com o substrato sintético pela parte inferior, resultando em um descarte simultâneo do sobrenadante na parte superior dos reatores. Os reatores da tecnologia Nereda® já vêm sendo operados em volume constante (GIESEN *et al.*, 2013). A duração da fase de enchimento-descarte foi de 90 min e o enchimento se dava pela parte inferior do reator a uma velocidade ascensional igual a $0,5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. Este valor foi escolhido a partir das investigações sobre transporte hidráulico em RBS realizadas por Weissbrodt *et al.* (2014).

3.2.4 Composição dos substratos

Os reatores foram alimentados com esgoto sintético, tendo como fontes de matéria orgânica, particulada e solúvel, a farinha de amido (*starch*) e o acetato/peptona, respectivamente. O meio sintético do R1 consistia apenas de substrato solúvel (S_S) com a seguinte composição: 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de DQOt (73% de acetato e 27% de peptona); 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrogênio amoniacal (na forma de cloreto de amônio – NH_4Cl); 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fósforo (60% na forma de fosfato de potássio dibásico anidro – K_2HPO_4 ; 40% na forma de fosfato monopotássico – KH_2PO_4). O meio sintético do R2 consistia em uma mistura de substrato solúvel e particulado (S_S+X_S) com a seguinte composição: 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de DQOt (36% de acetato, 14% de peptona, e 50% de farinha de amido); 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrogênio amoniacal (na forma de cloreto de amônio – NH_4Cl); 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fósforo (60% na forma de fosfato de potássio dibásico anidro – K_2HPO_4 ; 40% na forma de fosfato monopotássico – KH_2PO_4). As características dos substratos encontram-se resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Composição dos substratos do R1 e do R2.

Parâmetros	Unidades	R1	R2
Composição do substrato	-	Solúvel (S_S)	Solúvel e particulado (S_S+X_S)
Fonte de carbono	-	Acetato e peptona	Acetato, peptona, e farinha de amido
DQOt	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	496 ± 42	494 ± 38
DQOs	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	488 ± 43	253 ± 18
NH_4^+-N	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	50,5 ± 4,7	52,2 ± 3,2
$\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	5,0 ± 0,6	4,7 ± 0,5
Carga orgânica total	$\text{kg DQOt}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2
Carga orgânica solúvel	$\text{kg DQOs}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$	1,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Carga nitrogenada	$\text{kg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Carga de fósforo	$\text{kg PO}_4^{3-}-\text{P}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00

As soluções contendo os substratos, apresentados na Tabela 6, eram preparadas duas vezes por semana, numa concentração 25 vezes

maior, e armazenadas em frascos de vidro (5 L) dentro de uma geladeira. Para cada ciclo, 0,4 L da solução sintética eram misturados em um recipiente intermediário com 4,7 L de água da torneira, antes da alimentação nos reatores, a fim de obter as concentrações previamente estabelecidas (Tabela 6). Os recipientes que continham o material particulado foram continuamente agitados por meio de um agitador magnético, para manter este substrato em suspensão. A composição do esgoto sintético foi baseada nas concentrações de carbono, nitrogênio e fósforo normalmente encontradas em esgotos domésticos reais (METCALF & EDDY, 2003). A escolha de farinha de amido para representar a matéria orgânica particulada foi baseada no estudo de De Kreuk *et al.* (2010).

3.2.5 Métodos analíticos

Para monitorar o desempenho dos sistemas, foram coletadas, duas vezes por semana, amostras dos afluentes (entrada dos reatores) e dos efluentes tratados (saída dos reatores). As concentrações de DQOt, DQOs, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ e $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ das amostras coletadas foram determinadas espectrofotometricamente utilizando kits padrões da Hach-Lange. A concentração de sólidos suspensos totais (SST) no reator e no efluente e o índice volumétrico do lodo (IVL) foram analisados duas vezes por semana, seguindo as recomendações do Standard Methods (APHA, 2005). A determinação de $\text{SST}_{\text{efluente}}$ foi realizada a partir de amostras de saída dos reatores. Para a determinação de $\text{SST}_{\text{reator}}$ e do IVL foram utilizadas amostras de licor misto coletadas ao fim da fase de aeração. Os valores de IVL_{10} e IVL_{30} foram determinados a partir da Equação 9 e considerando o volume do lodo após, respectivamente, 10 e 30 min de sedimentação, em uma proveta graduada de 1 L. Uma vez que os grânulos aeróbios sedimentam significativamente mais rápido do que os flocos de lodo ativado, a razão $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_{10}$ foi usada para avaliar o estágio do processo de granulação, como sugerido por De Kreuk *et al.* (2007a). A morfologia da biomassa era regularmente observada por meio de estereomicroscópio (Olympus SZX10).

A fração do tamanho das partículas foi determinada a partir do método de peneiramento descrito em Bin *et al.* (2011). Este método tem como objetivo comum a separação de um material em duas ou mais frações, com partículas de tamanhos distintos. Para isso, foram utilizadas 3 peneiras de aço inoxidável com 20 cm de diâmetro. Cada peneira apresentava uma abertura de malha diferente: 0,63 mm, 0,25 mm e 0,10 mm. A análise foi realizada utilizando-se uma amostra de 200 mL de licor misto, coletada ao fim da fase de aeração. A fim de prevenir a formação de uma camada grossa de lodo na peneira, adicionou-se 800 mL de água da torneira, totalizando um volume de 1 L. A amostra (licor misto + água) foi primeiramente depositada na peneira com maior abertura de malha de 0,63 mm. As partículas com tamanho maior do que 0,63 mm eram retidas na malha. As partículas com tamanho menor do que 0,63 mm passavam através da malha e seguiam para a peneira com tamanho de abertura de malha de 0,25 mm e assim, sucessivamente. As partículas retidas em cada uma das peneiras eram recuperadas por meio de retrolavagem com água destilada. Cada fração era então coletada em um recipiente diferente e filtrada em filtros específicos, utilizados para a determinação dos SST. Uma vez obtida a massa retida em cada peneira, era possível determinar a porcentagem que cada fração de tamanho representava em função da massa total da amostra. As frações de tamanho foram denominadas como segue:

- $D > 0,63$ mm: grânulos maiores;
- $0,63$ mm $> D > 0,25$ mm: grânulos menores.
- $0,25$ mm $> D > 0,10$ mm: flocos maiores;
- $D < 0,1$ mm: flocos menores.

3.3 SISTEMA EXPERIMENTAL III (SE-III)

3.3.1 Características gerais

O *Sistema Experimental III* encontrava-se previamente instalado no Departamento de Engenharia de Processos, do Instituto Federal Suíço de Ciência e Tecnologia Aquática (*Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology - EAWG*). O sistema era alimentado com esgoto de origem essencialmente doméstica, proveniente da rede pública

coletora de esgotos da cidade de Dübendorf, na Suíça. O esgoto bruto passava primeiramente por um tratamento preliminar, composto por uma unidade de gradeamento e em seguida era encaminhado para o tratamento primário, o qual consistia em um decantador primário. O efluente era então bombeado do decantador primário para o interior do reator nos períodos de enchimento de cada ciclo operacional.

O RBS utilizado foi construído em coluna cilíndrica de acrílico transparente (Figura 14), apresentando as seguintes dimensões: 5,0 m de altura e 0,25 m de diâmetro interno. A altura útil utilizada para o tratamento foi de 4,0 m, o que corresponde a um volume máximo de 196,2 L. O reator apresentava uma razão A/D igual a 16, sendo este valor superior aos dos reatores dos *SE-I* e *SE-II* (A/D igual a 10).

Figura 14. Reator piloto do Sistema Experimental III.



O reator era equipado com sensores de oxigênio, nitrogênio amoniacal, nitrato, pH e temperatura (Endress + Hauser). Todos os sensores e bombas eram conectados a um controlador lógico

programável (CLP), que por sua vez era conectado a um sistema de supervisão e aquisição de dados (SCADA, Citect V.6.0). Durante a fase de aeração, ar comprimido era injetado para dentro do reator através de um difusor circular do tipo membrana, instalado na parte inferior do reator. A aeração era aplicada de forma intermitente, onde a concentração de oxigênio era controlada por meio de um sistema *on-off* de aeração. A linha de ar comprimido era composta ainda por filtros, válvulas reguladoras de pressão e rotâmetro, sendo este último destinado à medição e ao controle da vazão de ar aplicada ao reator.

3.3.2 Operação do reator

No período da realização do presente estudo o reator do *Sistema Experimental III* já se encontrava em operação por aproximadamente 2 anos. Desta forma, foram considerados também os dados obtidos previamente ao estágio sanduíche, totalizando em torno de 3 anos de operação. Esses dados prévios correspondem principalmente ao acompanhamento das características da biomassa (concentração de sólidos e sedimentabilidade) ao longo da granulação aeróbia.

O sistema foi inoculado com lodo ativado proveniente de uma estação de tratamento de esgoto doméstico da cidade de Dübendorf, Suíça. A operação do reator se deu em bateladas sequenciais, com ciclos sucessivos de 4 h de duração, incluindo as seguintes fases: enchimento anaeróbio estático (sem agitação) pela parte inferior do reator, reação anaeróbia, reação aeróbia e sedimentação. O reator foi operado em volume constante, ou seja, o enchimento e o descarte foram realizados de forma simultânea. O percentual de troca volumétrica foi de 50%. A duração da fase de enchimento foi inversamente proporcional à velocidade ascensional de esgoto aplicada ao reator. Desta forma, a fase de reação anaeróbia foi adicionada a fim de garantir condições anaeróbias (enchimento + reação) por um tempo total de 90 min. A duração das fases de reação aeróbia e sedimentação foram fixadas em 140 e 10 min, respectivamente.

A vazão de ar aplicada ao reator foi de $1000 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, o que corresponde a uma velocidade superficial ascensional de $0,6 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Este valor corresponde à metade da velocidade ascensional aplicada nos *SE-I* e *SE-II*. Elevadas taxas de aeração conduzem a um consumo

substancial de energia, o que é economicamente impraticável em escala real. Desta forma, no *SE-III* buscou-se reduzir a taxa de aeração a um valor razoável, uma vez que o consumo de energia é uma parte considerável dos custos totais de uma estação de tratamento de efluentes.

A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em 2-2,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante a fase de reação aeróbia, utilizando um sistema automatizado de controle *on-off* de aeração. O controle da concentração de OD foi realizado a fim de promover o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas. Durante a reação anaeróbia, ar era injetado a cada 15 min por 5 s para promover a mistura do licor misto.

O reator foi alimentado com esgoto real de origem essencialmente doméstica, o qual passava inicialmente por um pré-tratamento (preliminar + primário). As características do esgoto doméstico e as cargas aplicadas ao reator (após o pré-tratamento) estão apresentadas na Tabela 7. O efluente utilizado corresponde a um esgoto doméstico de baixa carga, segundo Metcalf & Eddy (2003).

Tabela 7. Características do esgoto doméstico e cargas aplicadas durante a operação do reator do Sistema Experimental III.

Parâmetros	Unidade	SE-III ⁽¹⁾
Demanda química de oxigênio total (DQOt)	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$304,0 \pm 127,4$ (108)
Demanda química de oxigênio solúvel (DQOs)	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$127,34 \pm 55,1$ (111)
Nitrogênio total kjeldahl (NTK)	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$32,0 \pm 6,0$ (31)
Nitrogênio amoniacal (NH_4^+-N)	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$18,2 \pm 5,4$ (130)
Fósforo total (Pt)	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5,2 \pm 1,0$ (31)
Fosfato ($\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$)	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,1 \pm 0,6$ (117)
Sólidos suspensos totais (SST)	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	140 ± 30 (108)
Carga orgânica total	$\text{kg DQOt}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$	$0,90 \pm 0,39$ (108)
Carga orgânica solúvel	$\text{kg DQOs}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$	$0,37 \pm 0,17$ (111)
Carga nitrogenada	$\text{kg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$	$0,05 \pm 0,02$ (130)
Carga de fósforo	$\text{kg PO}_4^{3-}-\text{P}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$	$6,39\cdot 10^{-3} \pm 1,91\cdot 10^{-3}$ (117)

⁽¹⁾ média \pm desvio padrão (número de dados)

3.3.3 Abordagem experimental

Duas abordagens experimentais foram testadas para o desenvolvimento dos grânulos aeróbios (Tabela 8). A primeira abordagem consistiu em converter os flocos em grânulos, estimulando o desenvolvimento de organismos de lento crescimento, isto é, mantendo elevados tempos de retenção de sólidos no reator. Desta forma, uma baixa velocidade ascensional de esgoto (V_{ww}) de $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ foi aplicada durante a Abordagem 1, com o intuito de minimizar a perda (*wash-out*) dos sólidos com baixa capacidade de sedimentação, durante o período de enchimento-descarte simultâneos. Esta abordagem foi testada duas vezes (Série 1 e Série 2), sendo que a Série 2 foi repetida após o término da abordagem 2, como pode ser visualizado na última coluna da Tabela 8.

A segunda abordagem consistiu em impor um aumento da seleção da biomassa, promovendo a retenção de agregados com boa sedimentabilidade (grânulos) e o *wash-out* dos agregados com pior sedimentabilidade (flocos). Desta forma, foi avaliado o aumento da velocidade ascensional de esgoto durante a fase de enchimento. Foram testadas velocidades entre $5,9$ e $16 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. As diferentes V_{ww} foram obtidas por meio da mudança da vazão da bomba de enchimento. As V_{ww} foram calculadas levando-se em conta a vazão aplicada e a área da base do reator.

Tabela 8. Detalhes das diferentes abordagens experimentais aplicadas ao reator.

Abordagem experimental	Velocidade ascensional de esgoto (V_{ww}) durante o enchimento anaeróbio ($\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$)	Duração (d)	Período de operação (d)
Abordagem 1	1,0	Série 1: 60 Série 2: > 150	0 - 60 382 - > 532
	5,9	83	61 - 144
Abordagem 2	8,5	57	145 - 202
	12,5	112	113 - 315
	16,0	65	316 - 381

3.3.4 Monitoramento do reator

3.3.4.1 Amostragem

Para monitorar o desempenho do sistema, foram coletadas, duas vezes por semana, amostras do afluente (entrada do reator) e efluente tratado (saída do reator). Ambas as tubulações do afluente e efluente eram equipadas com bombas de amostragem automática. Desta forma, este estudo foi realizado em amostras compostas do afluente e efluente, as quais foram coletadas durante a fase de enchimento/descarte de cada ciclo por um período de 24 h e conservadas a 4 °C antes das análises físico-químicas. Isto foi possível uma vez que as amostras eram bombeadas para tanques de 30 L, os quais foram colocados dentro de geladeiras a fim de preservar as amostras.

Uma vez por mês, foi realizado o monitoramento de um ciclo padrão, onde além das amostras acima mencionadas, foram efetuadas diversas coletas ao longo das fases anaeróbias e aeróbia, com o objetivo de verificar a conversão dos substratos. Essas amostras foram coletadas a cada 15-30 min.

A concentração de SST no reator e do IVL foram determinadas para amostras de licor misto, coletadas ao fim da fase de aeração, a fim de evitar interferências dos sólidos provenientes do esgoto bruto.

3.3.4.2 Análises físico-químicas

As concentração de DQOt e DQOs foram determinadas espectrofotometricamente por meio de kits padrões da Hach-Lange. O nitrogênio amoniacal foi determinado por processo de análise por injeção em fluxo (FIA) (FIAstar 5000, Foss). As concentrações de nitrito e nitrato foram determinadas por meio de cromatografia (881compact IC, Metrohm). A concentração de sólidos suspensos totais (SST) no reator e no efluente e o índice volumétrico do lodo (IVL) foram analisados duas vezes por semana, seguindo as recomendações do Standard Methods (APHA, 2005). Os valores de IVL_{10} e IVL_{30} foram

determinados a partir da Equação 9 e considerando o volume do lodo após, respectivamente, 10 e 30 min de sedimentação, em uma proveta graduada de 1 L. A razão IVL_{30}/IVL_{10} foi usada para avaliar o estágio do processo de granulação, como sugerido por De Kreuk *et al.* (2007a). A morfologia da biomassa era regularmente observada por meio de estereomicroscópio (Olympus SZX10). A fração do tamanho das partículas foi determinada a partir do método de peneiramento (BIN *et al.*, 2011). Essa metodologia foi descrita no item 3.2.5.

3.4 CÁLCULOS

3.4.1 Tempo de duração do ciclo (t_C)

$$t_C = t_E + t_R + t_S + t_D + t_{RP}$$

Equação 10

Onde:

t_C : tempo de duração do ciclo (h);

t_E : tempo de enchimento (h);

t_R : tempo de reação (h);

t_S : tempo de sedimentação (h);

t_D : tempo de descarte do efluente tratado (h);

t_{RP} : tempo de repouso (h).

3.4.2 Número de ciclos por dia (n_C)

$$n_C = \frac{24}{t_C}$$

Equação 11

Onde:

n_C : número de ciclos realizados por dia.

3.4.3 Vazão diária de esgoto (Q_d)

$$Q_d = n_c \cdot V_e$$

Equação 12

Onde:

Q_d : vazão diária de esgoto ($m^3 \cdot dia^{-1}$)

n_c : número de ciclos realizados por dia (dia^{-1});

V_e : volume de enchimento por ciclo (m^3).

3.4.4 Carga volumétrica aplicada (CV)

$$CV = \frac{S_A \cdot Q_d}{V_u \cdot 1000}$$

Equação 13

Onde:

CV: carga volumétrica aplicada por dia ($kg \cdot m^{-3} \cdot dia^{-1}$ de DQO, NH_4-N ou Pt);

S_A : concentração de DQO, NH_4-N ou Pt no afluente ($g \cdot m^{-3}$);

Q_d : vazão diária de esgoto ($m^3 \cdot dia^{-1}$);

V_u : volume útil do reator (m^3).

3.4.5 Tempo de retenção hidráulica (TRH)

$$TRH = \frac{V_u}{Q_d}$$

Equação 14

Onde:

TRH: tempo de retenção hidráulica (dias);

Q_d : vazão diária de esgoto ($m^3 \cdot dia^{-1}$);

V_u : volume útil do reator (m^3).

3.4.6 Velocidade superficial ascensional do ar

$$v_a = \frac{Q_a}{A_b} \cdot 100$$

Equação 15

Onde:

v_a : velocidade superficial ascensional do ar ($cm \cdot s^{-1}$);

Q_a : vazão de ar ($m^3 \cdot s^{-1}$);

A_b : área da base do reator (m^2).

3.4.7 Velocidade ascensional de esgoto

$$V_{ww} = \frac{Q_e}{A_b} \cdot 100$$

Equação 16

Onde:

V_{ww} : velocidade ascensional do esgoto ($m \cdot h^{-1}$);

Q_e : vazão da bomba de enchimento ($m^3 \cdot h^{-1}$);

A_b : área da base do reator (m^2).

3.4.8 Tempo de retenção de sólidos (SRT)

O tempo de retenção de sólidos para um sistema RBS foi calculado a partir da Equação 17 (LIU & TAY, 2007).

$$SRT = \frac{X_{SSV} V_u}{(X_d V_d + X_e V_e) / t_c}$$

Equação 17

Onde:

SRT: tempo de retenção de sólidos (idade do lodo) (dias);

X_{SSV} : concentração de sólidos suspensos voláteis no reator ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de SSV);

V_u : volume útil do reator (L);

X_e : concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente tratado ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de SSV);

V_e : volume de efluente tratado descartado do reator (L);

X_d : concentração de biomassa manualmente descartada ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de SSV);

V_d : volume de biomassa descartada manualmente (L);

t_c : tempo de duração do ciclo (d).

Quando não há descarga manual de lodo durante o funcionamento do reator a Equação 17 pode ser simplificada na seguinte equação:

$$SRT = \frac{X_{SSV} V_u}{(X_e V_e) / t_c}$$

Equação 18

3.4.9 Eficiência de remoção (E)

A eficiência de remoção, para as variáveis DQOs, DQOt, DBO₅, Pt e PO₄³⁻-P foi calculada pela Equação 19.

$$E = \left(\frac{S_A - S_E}{S_A} \right) \cdot 100$$

Equação 19

Onde:

E: eficiência de remoção (%);

S_A : concentração do afluente ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$);
 S_E : concentração do efluente ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.4.10 Balanço do nitrogênio

Neste trabalho, considerou-se que os compostos nitrogenados foram transformados por meio dos processos de assimilação pela biomassa, nitrificação e desnitrificação. A quantidade de nitrogênio amoniacal assimilado ($\text{g}_N\cdot\text{d}^{-1}$) pela biomassa para o crescimento das células foi estimado pela Equação 19 (WAN *et al.*, 2009):

$$N_{\text{assimilado}} = f_N (\Delta XV + SSV_{\text{efluente}} Q_{\text{efluente}})$$

Equação 20

Onde:

f_N : fração de nitrogênio do lodo;

Q_{efluente} : vazão de efluente tratado ($\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$);

SSV_{efluente} : concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente tratado ($\text{g}_{\text{VSS}}\cdot\text{L}^{-1}$);

ΔXV : é a inclinação da reta entre duas medições da concentração de biomassa dentro do reator ao longo do tempo ($\text{g}_{\text{VSS}}\cdot\text{d}^{-1}$).

Assumiu-se um valor para f_N igual a 0,1 $\text{mg}_N\cdot\text{mg}_{\text{VSS}}^{-1}$, como recomendado por Lee *et al.* (2007) e Wan *et al.* (2009).

Os processos de assimilação, nitrificação e desnitrificação foram calculados usando-se as Equações 20 a 22:

$$E_{\text{Assimilação}} = \frac{N_{\text{assimilado}}}{(NH_4^+ - N)_A}$$

Equação 21

$$E_{\text{Nitrificação}} = \frac{(NH_4^+ - N)_A - (NH_4^+ - N)_E - N_{\text{assimilado}}}{(NH_4^+ - N)_A - N_{\text{assimilado}}}$$

Equação 22

$$E_{\text{Desnitificação}} = \frac{(NH_4^+ - N)_A + (NO_X - N)_A - N_{\text{assimilado}} - (NH_4^+ - N)_E - (NO_X - N)_E}{(NH_4^+ - N)_A + (NO_X - N)_A - N_{\text{assimilado}}}$$

Equação 23

Onde:

 $(NH_4^+ - N)_A$: concentração de nitrogênio amoniacal no afluente; $(NH_4^+ - N)_E$: concentração de nitrogênio amoniacal no efluente; $(NO_X - N)_A$: soma das concentrações de nitrito e nitrato no afluente; $(NO_X - N)_E$: soma das concentrações de nitrito e nitrato no efluente.

A eficiência de remoção do nitrogênio total foi calculada pela Equação 24.

$$E_{NT} = \left(\frac{NT_A - NT_E}{NT_A} \right) \cdot 100$$

Equação 24

Onde:

 E_{NT} : eficiência de remoção de nitrogênio total em %; NT_A : soma da concentração de todas as formas de nitrogênio presentes no afluente ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); NT_E : soma da concentração de todas as formas de nitrogênio presentes no efluente ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esta seção foi dividida e apresentada na forma de três artigos científicos, os quais foram publicados / submetidos a periódicos científicos de alto fator de impacto. Cada um dos artigos foi relacionado com um dos objetivos específicos previamente expostos.

4.1 ARTIGO 1

A tecnologia de granulação aeróbia vem sendo amplamente estudada para a remoção de nutrientes das águas residuárias. Em relação à remoção de nitrogênio, os processos de nitrificação e desnitrificação geralmente ocorrem de forma simultânea nas diferentes zonas existentes dentro do grânulo. Além disso, outro fenômeno que pode ocorrer de maneira expressiva é o processo de assimilação do nitrogênio pela biomassa granular. Entretanto, existem poucos relatos na literatura sobre a ocorrência desses processos em grânulos cultivados com esgoto doméstico de baixa carga orgânica.

Neste contexto, o Artigo 1* teve como principal objetivo avaliar a remoção de nitrogênio durante a formação e a maturação dos grânulos aeróbios em um reator em bateladas sequenciais alimentado com esgoto doméstico (*Sistema Experimental I*). Para isso, o balanço do nitrogênio foi realizado considerando-se que os compostos nitrogenados foram transformados por meio dos processos de assimilação pela biomassa, nitrificação e desnitrificação.

Os resultados mostraram que houve um aumento gradual no tamanho dos agregados ao longo do tempo de operação, alcançando, aos 56 dias, um diâmetro médio igual a 410,0 μm e uma fração de grânulos em torno de 72%.

*O Artigo 1 deu origem à seguinte publicação:

WAGNER, J., GUIMARÃES, L.B., AKABOCI, T.R.V., COSTA, R.H.R. Aerobic granular sludge technology and nitrogen removal for domestic wastewater treatment. **Water Science and Technology**, 71 (7): 1040-1046, 2015.

No entanto, observou-se uma desintegração parcial dos grânulos aos 74 dias de operação. Isto pode estar relacionado com problemas no sistema de aeração observados neste mesmo período, os quais provocaram um aumento abrupto na vazão de ar aplicada ao reator. Com o restabelecimento das condições de aeração, observou-se a recuperação dos grânulos. Após 160 dias de operação, o processo de granulação estava completo no reator (IVL_{30}/IVL_{10} em torno de 95%). Os grânulos maduros apresentavam uma estrutura esférica e densa, com diâmetro médio de 473 μm e excelente capacidade de sedimentação (IVL_{30} de $75,6 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{SS}}^{-1}$).

Em relação à remoção de nitrogênio, a assimilação da amônia para o crescimento celular variou entre 3,5 a 64,6% durante o período de *start-up*. Após a formação dos grânulos, a assimilação foi menor do que 5% e a remoção do nitrogênio ocorreu principalmente por meio do processo de nitrificação-desnitrificação via nitrito. Eficiências médias de 86,6% para a nitrificação, 59,5% para a desnitrificação e 60,5% para nitrogênio total foram obtidas neste período.

A análise de biologia molecular mostrou que para as bactérias oxidadoras de nitrito (NOB), não foram obtidos resultados positivos para *Nitrobacter* (sonda NIT3). Estes resultados condizem com as altas concentrações de nitrito e baixas concentrações de nitrato encontradas no efluente tratado, confirmando assim que a desnitrificação ocorreu principalmente via nitrito. A ocorrência do processo de nitrificação parcial até o nitrito pode ter sido devida a uma possível inibição das NOB pela presença de amônia livre. Em relação às bactérias atuantes no processo de desnitrificação, as *Thiobacillus* não foram detectadas ao longo do tempo de operação, enquanto que as *Pseudomonas spp* estavam presentes nos grânulos maduros.

No geral, o presente estudo mostrou que é possível cultivar grânulos aeróbios utilizando um substrato complexo como o esgoto doméstico. Os grânulos obtidos foram capazes de se recuperar rapidamente após a desintegração parcial, e mantiveram-se estáveis por mais de 100 dias após a maturação. A remoção do nitrogênio do esgoto doméstico se deu principalmente por nitrificação parcial até o nitrito, seguida de desnitrificação do nitrito. A capacidade de assimilação dos grânulos maduros cultivados com esgoto doméstico real foi menor do que os valores comumente relatados para grânulos cultivados com esgotos sintéticos.

Transcrição do Artigo 1:

4.1.1 Introduction

Among the processes that have been proposed for biological nutrient removal from wastewater, aerobic granular sludge (AGS) technology has been successfully applied for nitrogen and/or phosphorus removal (KISHIDA *et al.*, 2008; COMA *et al.*, 2012). Nitrification and denitrification processes with AGS usually take place simultaneously in a single reactor through the different layers inside the granules. This is possible because the oxygen penetration depth inside the granular sludge is limited even under aerated conditions (KISHIDA *et al.*, 2008). Moreover, ammonia adsorption and/or assimilation were found to be important phenomena that can occur in AGS reactors fed with synthetic influents (BASSIN *et al.*, 2011; MOSQUERA-CORRAL *et al.*, 2011).

Investigations using real influents, such as domestic wastewater, have mainly focused on the granulation process and reactor start-up strategies (NI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010b; COMA *et al.*, 2012; WAGNER & COSTA, 2013). Until now, information about nitrogen removal, especially ammonia assimilation by granules grown on domestic wastewater has been very limited. Therefore, these aspects need to be evaluated in order to better understand the mechanisms of nitrogen removal occurring in such systems. In this study, the performance of an AGS reactor was evaluated in terms of nitrogen removal via assimilation, nitrification, and denitrification processes during the formation and maturation of aerobic granules fed with real domestic wastewater.

4.1.2 Materials and Methods

4.1.2.1 Experimental set-up and reactor operation

The AGS-reactor had a working volume of 118.7 L (0.25 m internal diameter and 2.42 m height) and was fed with real domestic

wastewater at a volume exchange ratio of 59%. Average concentrations of total chemical oxygen demand (tCOD), soluble chemical oxygen demand (sCOD), total Kjeldahl nitrogen (TKN), and ammonium nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) in the influent were $588.1 \pm 162.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $304.4 \pm 82.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $83.2 \pm 18.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and $82.2 \pm 17.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The resulting organic and nitrogen loading rate were, respectively, $1.07 \pm 0.29 \text{ kg sCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ and $0.29 \pm 0.06 \text{ kg NH}_4^+\text{-N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. The hydraulic retention time (HRT) was 6.8 h. Activated sludge from a domestic wastewater treatment plant was used as inoculum. The AGS-reactor was operated in sequencing batch mode with a cycle time of 4 h divided into the following phases: 10-20 min of anaerobic static feeding from the bottom of the reactor; 183.5-218.5 min of aeration; 35-10 min of settling; and 1.5 min of effluent withdrawal. During the first 5 weeks of operation, the settling time was progressively reduced from 35 to 10 min in order to encourage granule selection. The sludge retention time (SRT) was not fixed and it was calculated taking into account the amount of biomass wash-out with the treated effluent. The reactor was operated at room temperature ($\sim 22 \text{ }^\circ\text{C}$), with no pH or dissolved oxygen (DO) control. Air was introduced by a membrane diffuser placed at the bottom of the reactor in a superficial upflow air velocity of $1.2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.1.2.2 Analytical procedures

The sCOD, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, nitrite ($\text{NO}_2^-\text{-N}$), nitrate ($\text{NO}_3^-\text{-N}$), total suspended solids (TSS), and volatile suspended solids (VSS) were analyzed regularly according to the Standard Methods (APHA, 2005). DO concentration in the bulk liquid was measured with a multiparameter sonde (YSI 6820, Yellow Springs, OH, USA). Cycles measurements were carried out bi-weekly in order to evaluate substrates conversions. Samples for cycle measurement were collected every 15-30 minutes only during the aerobic mixing period.

The sludge volume index (SVI) was determined with a mixed liquor sample taken at the end of the aerobic phase. SVI_{10} and SVI_{30} were obtained by measuring the biomass volume after a settling period of 10 and 30 min, respectively. Microscopy (Olympus BX40, Tokyo, Japan) was used to monitor granule formation throughout the reactor

operating period. The observation of the external structure of the mature granules was performed using scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JSM-6390LV, Tokyo, Japan). Particle size distribution of homogeneous samples of sludge was obtained by laser diffraction (Malvern MasterSizer Series 2000, Malvern Instruments, UK). The average granule size was determined by the software provided by the aforementioned Mastersizer, for aggregates smaller than 2,000 μm , and by image analysis (QCapture Pro software, V 7.0, QImaging, Surrey, BC, Canada), for aggregates larger than 2,000 μm .

4.1.2.3 Microbial community analysis

Biomass samples were taken periodically, fixed in 4% paraformaldehyde, placed on gelatin-coated glass slides, and fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed as described by Amann *et al.* (1995). In order to obtain a homogeneous sample, before the fixation step, the granules were mechanically macerated with a glass rod and then sonicated using an ultrasonic bath (55 KHz, USC-700, Unique, Indaiatuba, Brazil) at 25°C for 5 min. The probes used for bacterial identification are shown in Table 9.

Table 9. Oligonucleotide probes used for FISH analysis.

Probe	Specificity	Sequence of the probe (5' - 3')
EUBmix (I+II+III)	Most bacteria	I - CTG CCT CCC GTA GCA
	<i>Planctomycetales</i>	II - CAG CCA CCC TAG GT GT CTG
	<i>Verrucomicrobiales</i>	III - CCA CCC GTA GGT GT
NEU	<i>Nitrosomonas</i> sp.	CCC CTC TGC TGC ACT CTA
NIT3	<i>Nitrobacter</i> sp.	CCT GTG CTC CAT GCT CCG
NSO190	Ammonia oxidizers β - Proteobacteria	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C
Ntspa662	<i>Nitrospira</i>	GGA ATT CCG CGC TCC TCT
THIO51	Some <i>Thiobacillus</i>	GTC ATG AAA CCC CGC GTG
PAO651	<i>Candidatus</i> "Accumulibacter"	CCC TCT GCC AAA CTC CAG
PAE997	<i>Pseudomonas</i> spp.	TCT GGA AAG TTC TCA GCA

All microbial cells were detected by staining with 1% 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) and examined with a microscope

(Olympus BX41, Tokyo, Japan). In order to quantify the bacterial population, at least 10 images were recorded for each sample, and the ratio of the area of the cells labeled by the specific probe to the area of all bacteria stained by DAPI (100%) was determined by digital image.

4.1.2.4 Calculations

The nitrogen components were considered to be transformed via biomass assimilation, nitrification, and denitrification processes. The amount of ammonium nitrogen assimilated ($g_N \cdot d^{-1}$) by the biomass for cell growth was estimated by the following equation (WAN *et al.*, 2009):

$$N_{assimilation} = f_N (\Delta XV + VSS_{out} Q_{out})$$

Equation 25

Where f_N is the nitrogen fraction of the sludge; Q_{out} is the flow rate of effluent ($L \cdot d^{-1}$); VSS_{out} is the solids concentration present in the effluent ($g_{VSS} \cdot L^{-1}$); and ΔXV is the slope between two measurements of sludge concentration inside the reactor over time ($g_{VSS} \cdot d^{-1}$). f_N was assumed to be equal to $0.1 \text{ mg}_N \cdot \text{mg}_{VSS}^{-1}$, as suggested by Lee *et al.* (2007) and Wan *et al.* (2009). Assimilation, nitrification, denitrification, and total nitrogen removal efficiencies were calculated as follow:

$$n_{assimilation} (\%) = \frac{N_{assimilation}}{(NH_4^+ - N_{in})}$$

Equation 26

$$n_{nit} (\%) = \frac{(NH_4^+ - N_{in}) - (NH_4^+ - N_{out}) - N_{assimilation}}{(NH_4^+ - N_{in}) - N_{assimilation}}$$

Equation 27

$$n_{denit} (\%) = \frac{(NH_4^+ - N_{in}) + (NO_x - N_{in}) - N_{assimilation} - (NH_4^+ - N_{out}) - (NO_x - N_{out})}{(NH_4^+ - N_{in}) + (NO_x - N_{in}) - N_{assimilation}}$$

Equation 28

$$n_{total}(\%) = \frac{(NH_4^+ - N_{in}) + (NO_x - N_{in}) - (NH_4^+ - N_{out}) - (NO_x - N_{out})}{(NH_4^+ - N_{in}) + (NO_x - N_{in})}$$

Equation 29

4.1.3 Results and Discussion

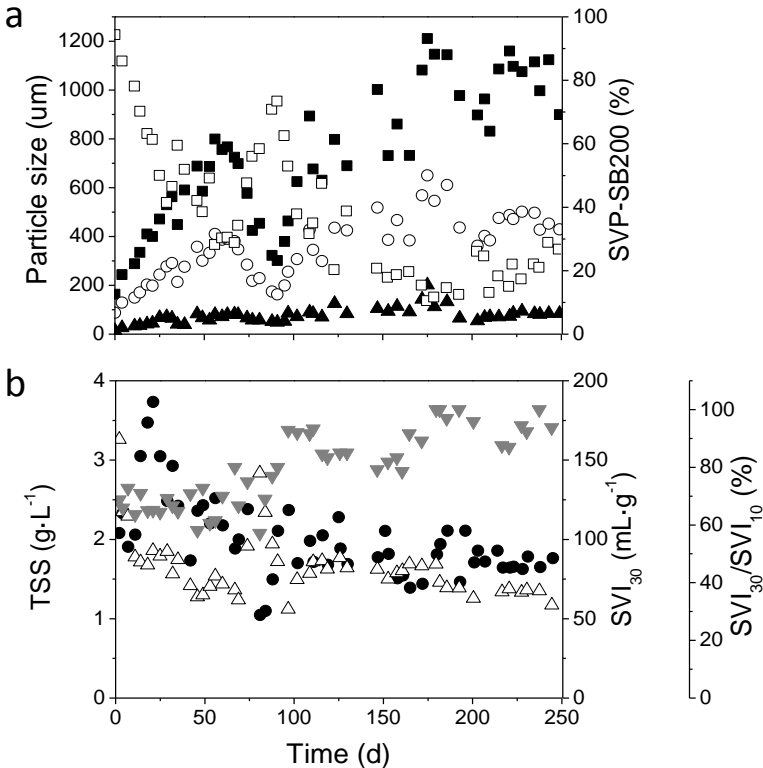
4.1.3.1 Aerobic granulation with domestic wastewater

This study was conducted over 250 days to evaluate nitrogen removal during the formation and maturation of aerobic granules with domestic wastewater. Figure 15 shows the changing patterns of biomass concentration, settling ability, sludge volume percentage with size below 200 μm (SVP-SB200), and sludge particle size throughout the operational time. To promote aerobic granulation, during the start-up period the settling time was progressively reduced in order to selectively discharge slow-settling flocs while avoiding severe wash-out of the seeding sludge. This strategy resulted in a variation of biomass concentration inside the reactor and a decrease of SVI_{30} during the first 50 days of operation (Figure 15b).

Granule formation was evident from particle size changes (Figure 15a) since the 10th percentile, 90th percentile, and average particle size increased, respectively, from 14.8, 163.2, and 87.7 μm on day 0 (seeding sludge) to around 80.0, 800.0, and 410.0 μm on day 56. The concept of SVP-SB200, proposed by Liu *et al.* (2010b), was used to determine the turning point at which the reactor was dominated by granular sludge. These authors considered the reactor to be granular-dominant when SVP-SB200 is below 50%. After 56 days, granules were dominant in the reactor (SVP-SB200 of 30%). However, problems in the aeration system provoked a sharp increase in the applied volumetric airflow rate (over 80 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) by day 74, which lasted around 3 d. The disturbance of the airflow caused an increase in shear force and therefore a partial disintegration of the formed granules. Thus, a considerable decrease of TSS and particle size, and an increase of SVP-SB200 and SVI_{30} were noticed. With the re-establishment of normal aeration conditions – airflow between 36-40 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ – it was possible to observe the recovery of the granular biomass. After 160 days, the solids

concentration, SVP-SB200, granule average size, and SVI_{30} stabilized at around $1.8 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$, 18%, 473.0 μm , and $75.6 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$, respectively. The SVI_{30}/SVI_{10} ratio for this period was around 95%, indicating, according to De Kreuk et al. (2007a), a completely granulated system.

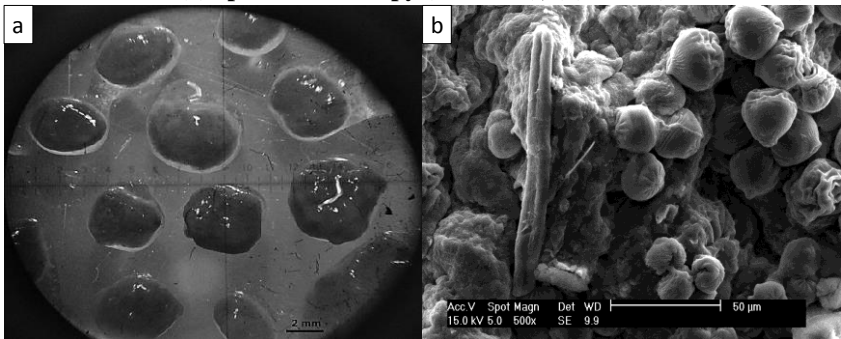
Figure 15. Sludge particle size $D_{0.1}$ (\blacktriangle), $D_{0.9}$ (\blacksquare), and D_{average} (\circ), SVP-SP200 (\square), TSS (\bullet), SVI_{30} (\triangle), and SVI_{30}/SVI_{10} ratio (\blacktriangledown) during the operational time. $D_{0.1}$ and $D_{0.9}$ are, respectively, the 10th and 90th percentiles of the distribution of particle size. D_{average} is the average size of the sludge particles.



The morphology of the mature aerobic granules grown on domestic wastewater was nearly spherical, with a dense structure and a

clear outline without filamentous outgrowths (Figure 16a). The external structure of the granules was mainly composed by protozoa (Figure 16b). Lemaire *et al.* (2008) also observed the presence of these microorganisms on the surface of granules cultivated with real abattoir wastewater. According to the authors, the presence of ciliates on the surface can interfere with the oxygen diffusion in the granule, creating some localized oxygen-depleted zones.

Figure 16. Images of the mature aerobic granules grown on domestic wastewater: (a) optical microscopy (bar 2mm); (b) SEM (bar 0.05 mm).



Aerobic granulation is usually a slow process in systems fed with domestic wastewater. Ni *et al.* (2009) and Liu *et al.* (2010b) reported periods of 300 and 400 d to achieve 85% and 80-90% of granulation, respectively. In our previous study, around 140 d were needed to achieve a dominant granulated sludge bed (WAGNER & COSTA, 2013). The aerobic granulation period is still a drawback for the full-scale application of this technology for domestic wastewater treatment. Furthermore, the obtained biomass is usually a mixture of granules and flocs, which can affect the quality of the treated effluent. Since the sedimentation time is usually short in AGS reactors, the presence of flocs can lead to a high concentration of solids in the effluent. However, even though the floccular biomass corresponded to around 18% of the total biomass in our study, the concentration of solids in the treated effluent was relatively low (around $45 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ after granule formation). Despite the long period required for aerobic granulation with domestic wastewater, the obtained granules remained stable for over 100 days after formation. Moreover, they were able to quickly recover after the partial disintegration induced by the problems in the aeration system.

Zhu *et al.* (2013) mentioned that after the disintegration of granules, the sludge debris with good settling performance can act as a nucleus to which the microorganisms can attach, leading to rapid granule formation. Following the same principle, Coma *et al.* (2012) demonstrated that adding a low fraction of crushed granules to the seed sludge enhances the aerobic granulation when using domestic wastewater.

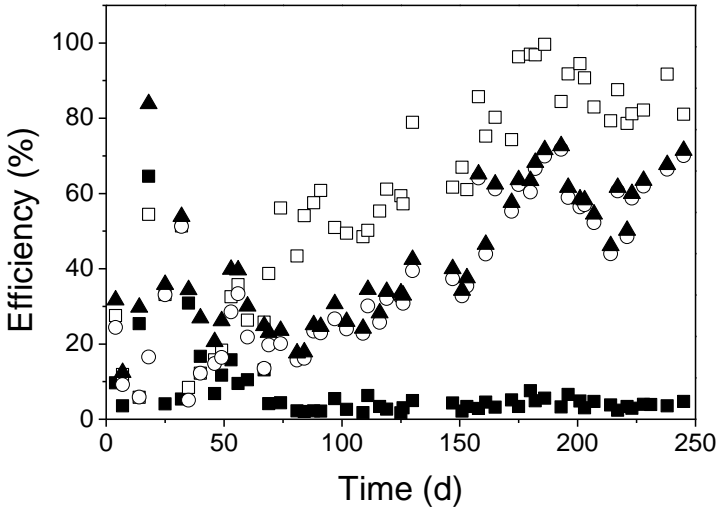
4.1.3.2 Nitrogen Removal

During the formation and maturation of the aerobic granular sludge, the nitrogen compounds were considered to be transformed via assimilation, nitrification, and denitrification (Figure 17). The ammonium assimilation for cell growth was more evident during the first 67 days of operation (between 3.5 to 64.6%). After this period, assimilation accounted for less than 5% and nitrogen was mainly removed by simultaneous nitrification and denitrification (SND). Nitrification efficiency was not stable during the first days of operation as a result of the constant biomass wash-out, but tended to increase with the formation of granules. However, with biomass loss due to the disintegration of granules, the SRT decreased to around 4 d; thus, nitrification efficiency also decreased. The recovery of the biomass led to an increase in the SRT to around 14 d, which allowed the enrichment of nitrifying organisms. An average efficiency of 86.6% for nitrification, 59.5% for denitrification, and 60.5% for total nitrogen, was reached after 160 days of operation, which corresponds to the moment when the granulation process was complete in the reactor. In this period, partial nitrification up to nitrite was observed in the reactor (Figure 18b); thus, denitrification occurred via nitrite.

The volume of the anoxic zone inside the aerobic granules was probably small and not enough to promote a complete denitrification of nitrite to nitrogen gas, and nitrite accumulated in the reactor (data not shown). Although nitrogen removal via the nitrite pathway has some advantages, such as faster denitrification rates and reduced demand for organic substrate, high concentrations of nitrite in the treated effluent can have toxic effects on the receiving waters. In this case, nitrogen

removal could be enhanced by controlling the applied oxygen concentration during the aerobic phase using an on/off aeration control system or including a non-aerated phase during the SBR cycle.

Figure 17. Nitrogen removal by the aerobic granules grown on domestic wastewater along the operational time: assimilation (■), nitrification (□), denitrification (○), and total nitrogen (▲).

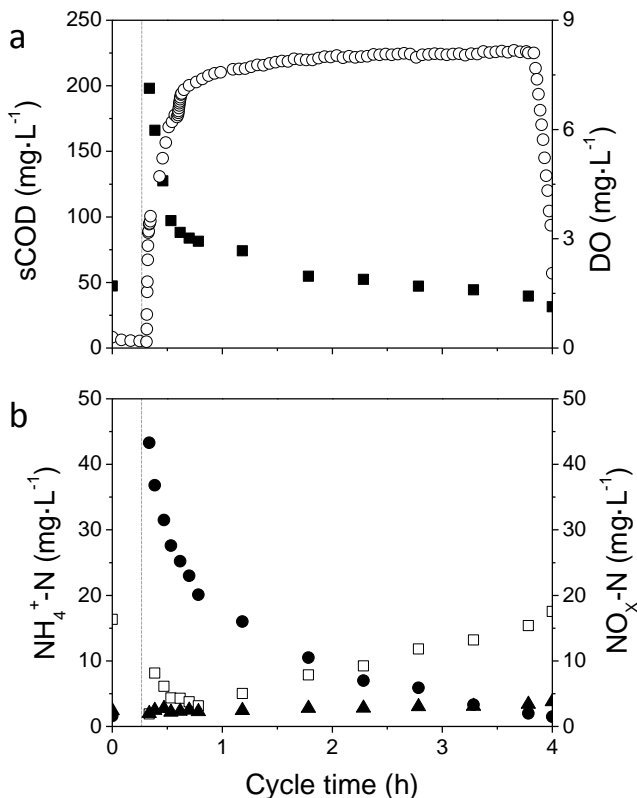


From the results obtained in the present study it can be seen that the assimilation by the biomass for cell growth was an important process for nitrogen removal only during the formation of the granules. The mature granules grown on sewage had a low ability to assimilate nitrogen and SND was the main process occurring in the system. Opposite results were reported by Mosquera-Corral *et al.* (2011) while studying the aerobic granulation process during the treatment of synthetic wastewater at low organic loads. The authors evaluated the effects of different carbon to nitrogen ratios (COD/N) in the feeding and estimated that 90% of nitrogen removal was due to the assimilation for biomass production, and that the nitrification process was almost absent. Biomass concentration varied between 3 and 7 $\text{g}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$. However, the authors attributed the absence of nitrification to a low SRT.

The compounds necessary for bacterial development, such as nitrogen, are adsorbed onto the surface of the granule. After adhering, they are transported through the granules via diffusion mechanisms, where they are metabolized by the microorganisms for growth and reproduction (VON SPERLING, 2007). Bassin *et al.* (2011), working with AGS reactors fed with synthetic wastewater, noticed that ammonium concentrations after anaerobic feeding were lower than expected (based on influent concentration and dilution in the reactor). The authors estimated that the synthetic granules adsorbed a considerable percentage of the influent ammonium (18-37%) and exhibited much higher adsorption capacity compared to flocs. Biomass concentration in the reactors was kept roughly constant and equal to $12 \text{ g}_{\text{VSS}} \cdot \text{L}^{-1}$. Yu *et al.* (2014) stated that the adsorption capacity of the aerobic granules tends to increase with the increase of biomass concentration in the system. Thus, at typical sludge concentration in AGS systems fed with synthetic influent (usually around $10 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$), a significant fraction of ammonium will be adsorbed to the granular biomass (LIN *et al.*, 2012). Furthermore, in long-term operation of AGS reactors, adsorption is not such an important consideration for the nitrogen balance calculation, since ammonium will be desorbed from the granules and therefore available for nitrification (LIN *et al.*, 2012). These results suggested that the presence of flocs (smaller adsorption capacity than granules), the low biomass concentration in the reactor, and the maturation of the granules (steady-state conditions) can lead to a decrease in the amount of ammonium nitrogen that is adsorbed and thus assimilated. This may explain why the assimilation ability of the mature granules grown on domestic wastewater was lower than the commonly reported results obtained for synthetic granules.

Once a stable granulation system had been achieved, cycle studies were carried out in order to evaluate the reactor's performance throughout a cycle (Figure 18). The influent had a concentration of $375.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of sCOD and $74.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of $\text{NH}_4^+ \cdot \text{N}$. The starting values depicted at time 0 refer to the substrates concentrations at the end of the previous operational cycle. The subsequent sample was collected 2 min after the aeration phase had started, i.e., after complete homogenization. The separation between feeding and aerobic phases is depicted by a dotted vertical line.

Figure 18. Profiles of sCOD (■), DO (○), $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (●), $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (□), and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (▲) during an operational cycle of the reactor.



During the feeding, the DO concentration in the reactor was below $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Part of the nitrite remaining from the previous cycle was diluted with the subsequent feed and also denitrified during the 20 min of anaerobic feeding. The sCOD and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentrations sharply decreased at the beginning of the aeration phase. Assimilation accounted for less than 3% and ammonium nitrogen was mainly oxidized to nitrite, although some small amounts of nitrate were also measured during the cycle. The DO limitation in the bulk solution, due to depletion of sCOD and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in the first 30 min of the aeration phase, resulted in an anaerobic core inside the aerobic granules, which

avored the denitrification of the nitrite produced during nitrification. After that, DO concentration increased until reaching a saturated value of $8.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, leading to an increase of oxygen diffusion inside the granules. Furthermore, at this point the COD/N ratio was around 3 and thus not enough for complete denitrification. As a result, the denitrification process stopped and nitrite accumulated in the reactor, reaching a concentration of $17.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ at the end of the cycle. The sCOD and total nitrogen removal efficiencies were 91.6% and 70.1%, respectively.

4.1.3.3 Microbial populations

A considerable increase in the abundance of ammonia oxidizing bacteria (AOB) (probes NEU and NSO190) was noticed throughout the operational time, reaching around 35% after granule formation. These results are in line with the considerable high nitrification efficiency observed during this period. For the nitrite oxidizing bacteria (NOB), no positive results were obtained for *Nitrobacter* (probe NIT3), confirming that low nitrite oxidation activity was detected and that denitrification occurred mainly via nitrite. One possible reason for the occurrence of partial nitrification up to nitrite is the inhibition of NOB by the presence of free ammonia (FA). The FA concentrations in the reactor were calculated by the equation proposed by Anthonisen *et al.* (1976), and varied between 0.2 to $7.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, with an average value of $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The estimated average FA concentration exceeds the inhibition threshold of 0.1 - $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for *Nitrobacter* reported by Anthonisen *et al.* (1976). On the other hand, *Nitrospira* (probe Ntspa662) were detected in the mature granules with an abundance of 6%. *Nitrospira* are usually the dominant NOB in the majority of full-scale domestic wastewater treatment plants (DAIMS *et al.*, 2009). As for the denitrificants, *Thiobacillus* were not detected during the whole operational time but *Pseudomonas spp* were present in the mature granules, with a percentage of around 15%. The polyphosphate-accumulating organisms (probe PAO651), *Candidatus Accumulibacter*, were also found in the granules, in an abundance of approximately 15%. Some clades of these organisms are able to use nitrite or nitrate as

electron acceptors instead of oxygen, resulting in simultaneous N and P removal (KUBA *et al.*, 1993; FLOWERS *et al.*, 2009). However, it is important to mention that the denitrifiers and PAO probes used in the present study did not target all bacteria capable of performing denitrification and/or phosphorus removal.

4.1.4 Conclusions

- The formation of aerobic granules was achieved in a SBR by using real domestic wastewater as substrate. The obtained granules were able to quickly recover after the stress induced by the problems in the aeration system, and they remained stable for over 100 days after formation.
- Nitrogen from domestic wastewater was mainly removed via partial nitrification up to nitrite followed by denitrification of nitrite. The assimilation ability of the mature granules grown on domestic wastewater was lower than that of the granules cultivated with synthetic wastewater.

4.2 ARTIGO 2

A formação e aplicação de grânulos aeróbios para o tratamento de águas residuárias reais, ainda é um desafio. O Artigo 1 mostrou que a granulação aeróbia utilizando esgotos reais é geralmente um processo mais lento do que quando se utiliza esgotos sintéticos solúveis e de fácil degradação. A elevada fração (em torno de 50%) de matéria orgânica particulada (X_S) presente nos esgotos reais pode ser um dos fatores que afetam o processo de granulação aeróbia e a taxa de degradação de substrato.

Neste contexto, o Artigo 2* teve como objetivos: (i) compreender como a presença de X_S afeta a formação dos grânulos e a qualidade do efluente tratado; e (ii) avaliar como as condições de funcionamento dos reatores granulares devem ser adaptadas a fim de superar os efeitos da presença de X_S . Para isso, dois reatores (*Sistema Experimental II*) alimentados com esgoto sintético foram operados na ausência (R1) ou presença (R2) de X_S . O estudo foi dividido em quatro experimentos com o intuito de avaliar os seguintes efeitos: presença/ausência de X_S na granulação aeróbia (*Experimento 1*); aumento da fase anaeróbia (*Experimento 2*); aumento da seleção entre flocos e grânulos (*Experimento 3*); e operação em volume constante, ou seja, enchimento e descarte simultâneos (*Experimento 4*).

Os resultados indicaram que a granulação aeróbia é um processo mais lento na presença de X_S (R2). Os grânulos cultivados no R2 apresentaram uma estrutura irregular e filamentosa, a qual afetou a capacidade de sedimentação da biomassa e, conseqüentemente, a qualidade do efluente tratado. Após 52 dias de operação (*Experimento 1*), a fração dos grânulos atingiu apenas 20,8% no R2, enquanto que no R1 esta fração foi de 54,0%. Durante os *Experimentos 1 e 2*, a biomassa dos reatores era composta por uma mistura de grânulos e flocos. Uma elevada fração de grânulos (> de 85%) foi obtida em ambos os reatores durante o *Experimento 3*, mas a qualidade do efluente tratado neste

* O Artigo 2 deu origem à seguinte publicação:

WAGNER, J., WEISSBRODT, D.G., MANGUIN, V., COSTA, R.H.R., MORGENROTH, E., DERLON, N. Effect of particulate organic substrate on aerobic granulation and operating conditions of sequencing batch reactors.

período foi bastante baixa (elevada presença de sólidos e baixa remoção de nutrientes).

A operação dos reatores em volume constante (*Experimento 4*) mostrou-se favorável para uma maior eficiência de remoção de substrato e também para o suprimento do crescimento filamentosos. Eficiências médias de remoção para DQOt, DQOs, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ e $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ de $87 \pm 4\%$, $95 \pm 1\%$, $92 \pm 10\%$, e $87 \pm 12\%$ para R1, e $72 \pm 12\%$, $86 \pm 5\%$, $71 \pm 12\%$, e $77 \pm 11\%$ para R2, foram obtidas, respectivamente. No geral, o presente estudo demonstrou que as condições de funcionamento de um reator de grânulos devem ser adaptadas de acordo com a composição do efluente a ser tratado, especialmente os que contêm material particulado.

Transcrição do Artigo 2:

4.2.1 Introduction

Aerobic granular sludge (AGS) has been extensively investigated during the last decades due to their great potential for wastewater treatment. However, most studies on aerobic granulation have been performed in laboratory-scale sequencing batch reactors (SBR) using soluble and easily biodegradable (S_s) synthetic substrates containing mainly acetate and glucose as carbon sources. Only few studies reported successful granule cultivation with real influents, such as malting (SCHWARZENBECK *et al.*, 2004), brewery (WANG *et al.*, 2007), dairy (SCHWARZENBECK *et al.*, 2005), swine slurry (FIGUEROA *et al.*, 2011), soybean-processing (SU & YU, 2005), and domestic wastewater (DE KREUK & VAN LOOSDRECHT, 2006; NI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010b; COMA *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2012; WAGNER & COSTA, 2013; ROCKTÄSCHEL *et al.*, 2015). These studies have indicated that the kinetics of aerobic granulation when using real wastewaters are different from the ones obtained with synthetic influents. This may be due to the fact that real wastewater, either from domestic or industrial origin, often contains diverse carbon sources along with a multitude of organic and inorganic compounds and some particulate matter (LEMAIRE *et al.*, 2008). For example, the fraction of the particulate organic matter (X_s) in domestic wastewaters

usually accounts for around 40-60% of the total organic matter (KAPPELER & GUJER, 1992; ORHON & ÇOKGÖR, 1997; KOCH *et al.*, 2000). Therefore, synthetic influents composed only by S_S cannot truly represent real and complex influents. As a consequence, the formation and application of aerobic granules for the treatment of real wastewaters still remains challenging. Furthermore, to what extent the presence of X_S can affect the formation of the granules and in turn the operating conditions of AGS reactors remains still unclear. These aspects need to be evaluated toward an improved insight of the behavior of aerobic granular sludge when treating real influents.

Previous studies suggested that the presence of X_S in the influent results in aerobic granules with filamentous outgrowths on their surfaces (SCHWARZENBECK *et al.*, 2004; SCHWARZENBECK *et al.*, 2005; DE KREUK *et al.*, 2010; PEYONG *et al.*, 2012; FIGUEROA *et al.*, 2014). The development of filamentous and finger type structures can be explained by the existence of substrate gradients inside the sludge aggregates due to diffusion limitation (MARTINS *et al.*, 2004; DE KREUK *et al.*, 2010; WEISSBRODT *et al.*, 2012). Under these conditions, filamentous bacteria have a higher outgrowth velocity because they grow preferentially in one direction and not in three directions as the floc-forming bacteria inside the aggregates (MARTINS *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2011). Particulate matter is mainly hydrolyzed at the surface of the granules. The products of hydrolysis (readily biodegradable substrate) are then utilized locally, enhancing substrate gradients inside the granules and thus stimulating the outgrowth of filamentous structures (DE KREUK *et al.*, 2010). The higher accumulation of X_S on the finger like filamentous granule structures will further enhance this phenomenon of irregular substrate uptake over the granule (DE KREUK *et al.*, 2010). Nevertheless, we hypothesized that the presence of X_S is likely to have an effect not only on the morphological structure of the granules but also on the overall granulation process (e.g. kinetics of granules formation) and substrate degradation rate.

Aerobic granular sludge was successfully cultivated in a lab-scale reactor treating malting wastewater with a high content of particulate organic matter (SCHWARZENBECK *et al.*, 2004). According to these authors, the ability of aerobic granules to remove X_S results from two different mechanisms: (1) during initial granule formation and growth,

particulate substrates adsorbed onto the biofilm matrix of the granules; (2) for the completely granulated sludge bed with mature granules, X_S is removed as a result of the presence and metabolic activity of a dense protozoa population covering the granules' surface. De Kreuk *et al.* (2010) demonstrated using starch as a model of synthetic particulate substrate that X_S is mainly removed by adsorption at the granule surface, followed by hydrolysis and consumption of the hydrolyzed products. Unlike soluble substrates, particulate organic matter cannot pass through cell membranes and need to undergo extracellular hydrolysis prior to adsorption (ORHON & ÇOKGÖR, 1997). The hydrolysis processes is responsible for the conversion of particulate into readily biodegradable substrate that can serve as a necessary carbon source for denitrification or biological phosphorus removal (MORGENROTH *et al.*, 2002). Therefore, nutrient removal can be limited by the extent and kinetics of hydrolysis processes of the particulate organic matter (MORGENROTH *et al.*, 2002). If hydrolysis of the organic substrate in the particulate form is a slow process, it can be then hypothesized that the reactor operation should be adapted so that the hydrolysis rate and ultimately the granule formation are encouraged.

The present study therefore aimed at (i) better understanding how the presence of X_S in the influent affects the formation of the granules and the quality of the effluent produced during the treatment and at (ii) evaluating how the operating conditions of an AGS reactor can be adapted to overcome the effects of the presence of X_S in the influent. Two SBRs fed with synthetic influent were operated in parallel in absence (R1) or presence (R2) of particulate substrate. Four experiments were performed over several weeks in order to test different operating conditions and to evaluate their effects on granulation and treatment performances. The physical properties of the sludge (size fraction of granules, sludge volume index, etc) as well as the microbial activities (COD, nitrogen and phosphorus removal) were followed.

4.2.2 Materials and Methods

4.2.2.1 Experimental set-up

Two reactors of 10.2 L (0.12 m internal diameter and 1.2 m height) were used for cultivation of aerobic granules in absence (R1) or presence (R2) of particulate substrate. The reactors were operated in SBR mode with cycles of 4 h, volumetric exchange ratio of 50%, and without pH control. During the aeration phase, air was continuously introduced at a superficial upflow velocity of $1.2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. R1 was inoculated with 5 L of conventional activated sludge taken from an aeration tank of a municipal wastewater treatment plant operated for full biological nitrogen removal (ARA Thunersee, Switzerland). The seeding sludge had a total suspended solids concentration (TSS) of $3.4 \text{ g}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$ and a sludge volume index (SVI_{30}) of $103 \text{ mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$. After 25 days of acclimation with a synthetic influent containing only soluble substrate (S_s), half of the sludge volume from R1 was added in R2 and the two systems were started in parallel with the same biomass concentration ($3.5 \text{ g}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.2.2.2 Experimental approach

Four different experiments were performed to evaluate the effect of operating conditions on granulation and reactors performances (Table 10). In *Experiment 1*, the effect of the presence or absence of X_s on the aerobic granulation was evaluated. The SBR cycle consisted of 60 min of anaerobic feeding from the bottom of the reactor, 167 min of aeration, 8 min of settling, 3 min of effluent withdrawal, and 2 min of idle period. The effluents were extracted at the half of the maximum working heights of the reactors, resulting in operations with variable working volume.

Experiment 2 aimed at evaluating to what extent an extension of the anaerobic phase favors the hydrolysis process of X_s and ultimately the formation of the granules and the reactor performances. The anaerobic phase of R2 was therefore extended to 90 min, with 60 min of anaerobic feeding and 30 min of anaerobic reaction without mixing. Due to some technical failures, the operation of R1 had to be discontinued during *Experiment 2*. R1 was not operated under the same conditions of *Experiment 2* as it was fed with soluble organic substrate only. No data are thus presented for R1 during *Experiment 2*.

Table 10. Details of the operating conditions applied in R1 (fed with soluble substrate (S_S)), and in R2 (fed with a mixture of soluble and particulate substrates (S_S+X_S)) during the four experiments.

Label	Studied effects	Operation period (d)	SBR volume	Cycle phases				
				Anaerobic feeding (min)	Anaerobic period (min)	Aerobic period (min)	Settling (min)	Effluent withdrawal + idle (min)
<i>Experiment 1</i>	Presence/absence of X_S on aerobic granulation	0-66	Variable	60	-	167	8	5
<i>Experiment 2</i>	Extended anaerobic phase in R2 (S_S+X_S)	66-109	Variable	60	R1 - 0 R2 - 30	R1 - 167 R2 - 137	8	5
<i>Experiment 3</i>	Increased selection pressure for fast-settling biomass	109-176	Variable	60	R1 - 0 R2 - 30	R1 - 171 R2 - 141	4	5
<i>Experiment 4</i>	Constant reactor working volume (simultaneous fill-and-draw)	176-250	Constant	90	-	146	4	-

In *Experiment 3*, the effect of an increased selection pressure for fast-settling biomass, *i.e.* granules, was investigated. The settling time in both reactors was therefore reduced to 4 min in order to wash-out the flocs with the effluent and to retain in the reactor only aggregates with good settling ability, *i.e.* granules.

Simultaneous fill-and-draw phases were applied in both reactors during *Experiment 4* in order to investigate the impact of operating at constant working volume. After the settling phase the reactors were directly fed with the influent from the bottom resulting in a simultaneous discharge of the clean supernatant in the upper part of the reactors, such as described in hydraulic transport investigations of Weissbrodt *et al.* (2014). The duration of the fill-and-draw phase for both reactors was 90 min and the wastewater was applied in an upflow velocity of $0.5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

4.2.2.3 Substrate composition

The reactors were fed with synthetic wastewater using starch and acetate/peptone as carbon sources of particulate and soluble organic matter, respectively. The synthetic medium of R1 consisted of only soluble substrate (S_S) with the following composition: $500 \text{ mg}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$ of chemical oxygen demand (COD) (73% of acetate and 27% of hydrolyzed peptone); $50 \text{ mg}_{\text{N}}\cdot\text{L}^{-1}$ of ammonium nitrogen (in form of NH_4Cl); $5 \text{ mg}_{\text{P}}\cdot\text{L}^{-1}$ of phosphorus (60 % of K_2HPO_4 and 40% of KH_2PO_4). The synthetic medium of R2 consisted of a mixture of soluble and particulate substrates (S_S+X_S) with the following composition: $500 \text{ mg}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$ (36% of acetate, 14% of hydrolyzed peptone, and 50% of particulate starch); $50 \text{ mg}_{\text{N}}\cdot\text{L}^{-1}$ (in form of NH_4Cl); $5 \text{ mg}_{\text{P}}\cdot\text{L}^{-1}$ (60 % of K_2HPO_4 and 40% of KH_2PO_4).

The medium storage vessels that contained particulate starch were continuously stirred in order to maintain this substrate in suspension. In each cycle, 0.4 L of the synthetic media was mixed together with 4.7 L of tap water in an intermediary tank prior to feeding in the reactors. The characteristics of the substrates are summarized in Table 11. The composition of the influent was selected in order to

simulate the substrate concentrations of C, N, and P usually found in typical raw domestic wastewater.

Table 11. Substrate composition of Reactor 1 and Reactor 2.

Parameters	Unit	R1	R2
Substrate form	-	Soluble (S _s)	Soluble and particulate (S _s +X _s)
Carbon source	-	Acetate and peptone	Acetate, peptone, and particulate starch
Total COD	mg tCOD·L ⁻¹	496 ± 42	494 ± 38
Soluble COD	mg sCOD·L ⁻¹	488 ± 43	253 ± 18
Ammonium nitrogen	mg NH ₄ ⁺ -N·L ⁻¹	50.5 ± 4.7	52.2 ± 3.2
Phosphorus	mg PO ₄ ³⁻ -P·L ⁻¹	5.0 ± 0.6	4.7 ± 0.5
Total organic loading rate	kg tCOD·m ⁻³ ·d ⁻¹	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2
Soluble organic loading rate	kg sCOD·m ⁻³ ·d ⁻¹	1.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Nitrogen loading rate	kg NH ₄ ⁺ -N·m ⁻³ ·d ⁻¹	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Phosphorus loading rate	kg PO ₄ ³⁻ -P·m ⁻³ ·d ⁻¹	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00

4.2.2.4 Analytical methods

Influent and effluent concentrations of total and soluble chemical oxygen demand (tCOD and sCOD, respectively), ammonium nitrogen (NH₄⁺-N), nitrite (NO₂⁻-N), nitrate (NO₃⁻-N), and phosphate (PO₄³⁻-P) were determined spectrophotometrically by using standard test kits (Hach-Lange, Germany). Simultaneous nitrification and denitrification during the aerobic phase was not monitored as reactors were continuously aerated. Total suspended solids (TSS) and sludge volume index (SVI) were analyzed according to Standard Methods (APHA, 2005).

The SVI was measured with a mixed liquor sample taken at the end of the aerobic phase. SVI₁₀ and SVI₃₀ were determined by measuring the biomass volume after a settling period of 10 and 30 min, respectively. Since granules settle significantly faster than activated

sludge flocs, the SVI_{30}/SVI_{10} ratio was used in order to access granule formation, as suggested by De Kreuk *et al.* (2007a). Particle size fractions of the sludge were measured using different sieves with decreasing mesh openings of 0.63 mm, 0.25 mm, and 0.1 mm. A sludge volume of 200 mL was sampled from the reactors at the end of the aeration phase and gently mixed with 800 mL of tap water in order to prevent the build-up of a cake in the sieve. The sieving procedure was performed as described in Bin *et al.* (2011). The morphology of the flocs and granules from the reactors was regularly observed using a stereomicroscope (Olympus SZX10, Japan).

4.2.3 Results

4.2.3.1 Effect of the absence or presence of X_S on aerobic granulation (Experiment 1)

Changes in the biomass settling properties and TSS concentrations in the reactors and in their effluents are presented in Figure 19. In R1 (fed with soluble substrate (S_S)), while SVI_{30} remained nearly stable and lower than $50 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$ throughout the whole experiment (Figure 19a), TSS increased and reached a stable value around $7.0 \pm 0.6 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ after 50 days of operation (Figure 19c). At this time, an average TSS concentration in the effluent of $40.0 \pm 2.4 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ was obtained (Figure 19d) and the sludge retention time (SRT) stabilized around 55 days. A co-existence of flocs and granules was observed during the whole experiment. The fraction of granules, here referred to aggregates with diameter higher than 0.25 mm ($d > 0.25 \text{ mm}$), was dominant after 60 days of operation and stabilized around $54.0 \pm 7.4\%$ of the total biomass (Figure 20a). The SVI_{30}/SVI_{10} ratio approached a value of 1 at this period (Figure 19b), indicating a major presence of granules in the sludge, which corroborates with the results of particle size distribution.

On the other hand, the settling properties of the biomass were highly affected by the presence of X_S in the influent of R2 (fed with a mixture of soluble and particulate substrates ($S_S + X_S$)). The SVI_{30} began

to increase (up to $150 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$) and washing-out of sludge occurred, resulting in a sharp decrease of the biomass concentration inside the reactor from 3.4 to less than $1.5 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figure 19c). After 50 days of operation, SVI_{30} , $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio, TSS in the reactor, and fraction of granules ($d > 0.25 \text{ mm}$ – Figure 20a) stabilized around $119.1 \pm 14.1 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$, 0.71 ± 0.03 , $2.0 \pm 0.4 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$, and $20.8 \pm 1.3\%$, respectively. The residual TSS concentration in the effluent was significantly high during the whole experiment, varying between 55.0 and $490.0 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$. The SRT was usually lower than 4 d as a result of the loss of biomass in the effluent. The presence of X_S in the influent also influenced the morphology of the biomass. The granules grown on S_S (Figure 20a) in R1 had a spherical and defined outline, while irregular and filamentous structures could be observed at the surface of the granules cultivated in the presence X_S (Figure 20b) in R2.

Stable elimination of carbon was achieved throughout the operation of R1, with an average efficiency of $85 \pm 11\%$ for tCOD and $96 \pm 2\%$ for sCOD (Figure 22a). In R2, though sCOD removal was nearly stable, with an average efficiency of $92 \pm 2\%$, the tCOD removal varied substantially between 25 and 83% during the whole operating period, with an average value of $62 \pm 18\%$ (Figure 22b). High ammonium removal was obtained in R1, with an average removal efficiency of $94 \pm 8\%$, while only $14 \pm 8\%$ was removed in R2. Both reactors performed phosphorus removal as a result of the application of alternating anaerobic and aerobic conditions during the SBR cycles. However, the presence of X_S in the feed of R2 was correlated to lower phosphate uptake ($50 \pm 22\%$) than obtained under the sole presence of acetate in the influent R1 ($72 \pm 13\%$).

4.2.3.2 Effect of an extended anaerobic phase (Experiment 2)

The anaerobic phase in R2 was extended to 90 min (60 min of anaerobic feeding and 30 min of anaerobic reaction without mixing) in order to enhance the utilization of the particulate substrate. This led to an increase of the biomass concentration in the reactor and of the total fraction of granules to around $3.0 \pm 0.4 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ and $72.7 \pm 8.2\%$, respectively (Figure 19c and Figure 20c). Although the $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio remained at an identical level as in *Experiment I* (around 0.70),

lower SVI_{30} values down to $60 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$ resulted from the increase of the anaerobic phase length (Figure 19a).

Figure 19. Effects on SVI_{30} , SVI_{30}/SVI_{10} ratio, and concentrations of TSS in the reactor and in the effluent of R1, fed with S_S (●), and R2, fed with S_S+X_S (○), depending on the operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (*Experiment 1*), extended anaerobic phase in R2 (*Experiment 2*), increased selection pressure for fast-settling biomass (*Experiment 3*), and constant reactor working volume (*Experiment 4*).

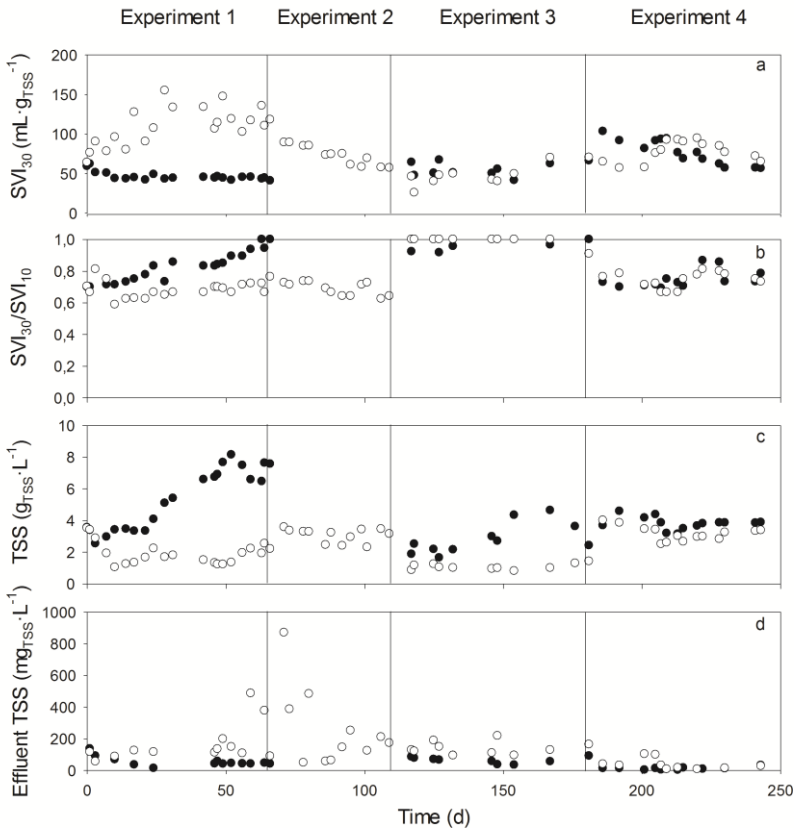


Figure 20. Effects on the size distribution of biological aggregates in R1, fed with S_S , and R2, fed with S_S+X_S , depending on the operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (*Experiment 1*), extended anaerobic phase in R2 (*Experiment 2*), increased selection pressure for fast-settling biomass (*Experiment 3*), and constant reactor working volume (*Experiment 4*). The x-axes display the classes of particle diameters according to measurements conducted with mesh openings of 0.10, 0.25, and 0.63 mm. The sludge fractions are presented as averages values over the last three weeks of each experiment.

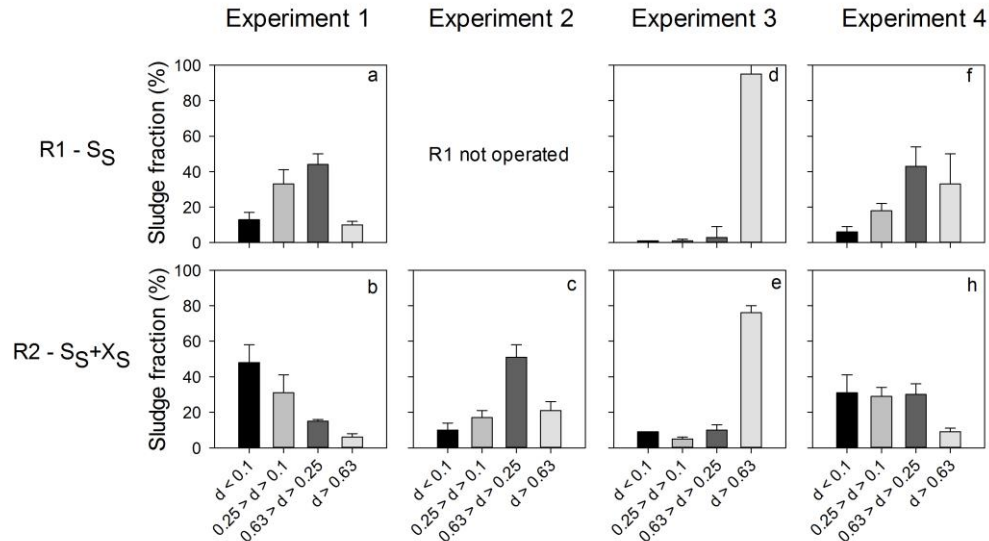


Figure 21. Stereomicroscopic images of aerobic granules cultivated in R1 with soluble substrate (S_S) and in R2 with a mixture of soluble and particulate substrates (S_S+X_S) for the different operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (*Experiment 1*), extended anaerobic phase in R2 (*Experiment 2*), increased selection pressure for fast-settling biomass (*Experiment 3*), and constant reactor working volume (*Experiment 4*). The biomass samples were taken from the reactors during the last week of each experiment. Size bars represent 0.5 mm (a, b, and c), 1 mm (d), and 2 mm (e, f, g, and h).

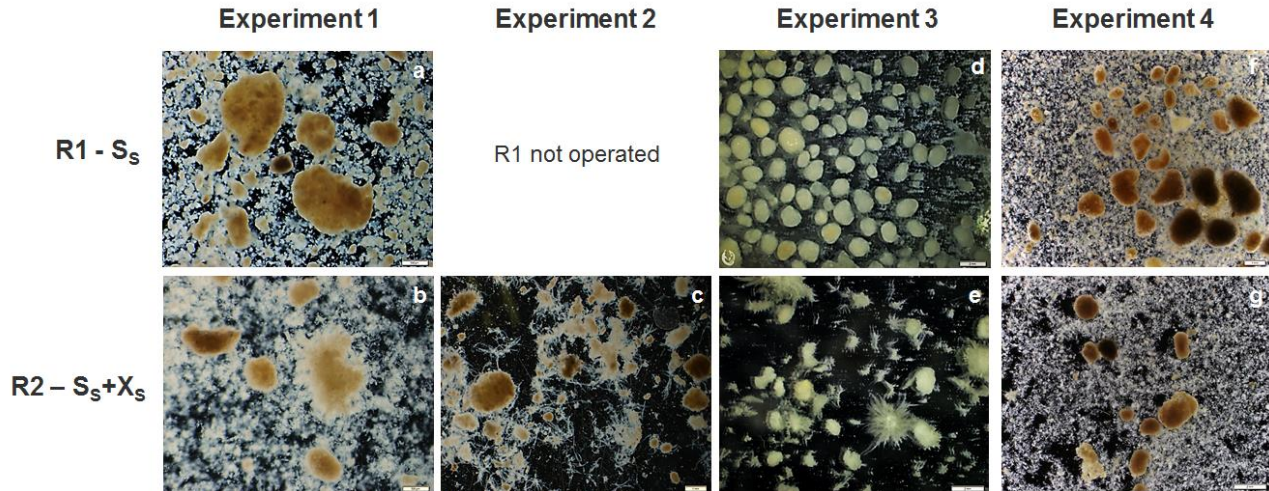
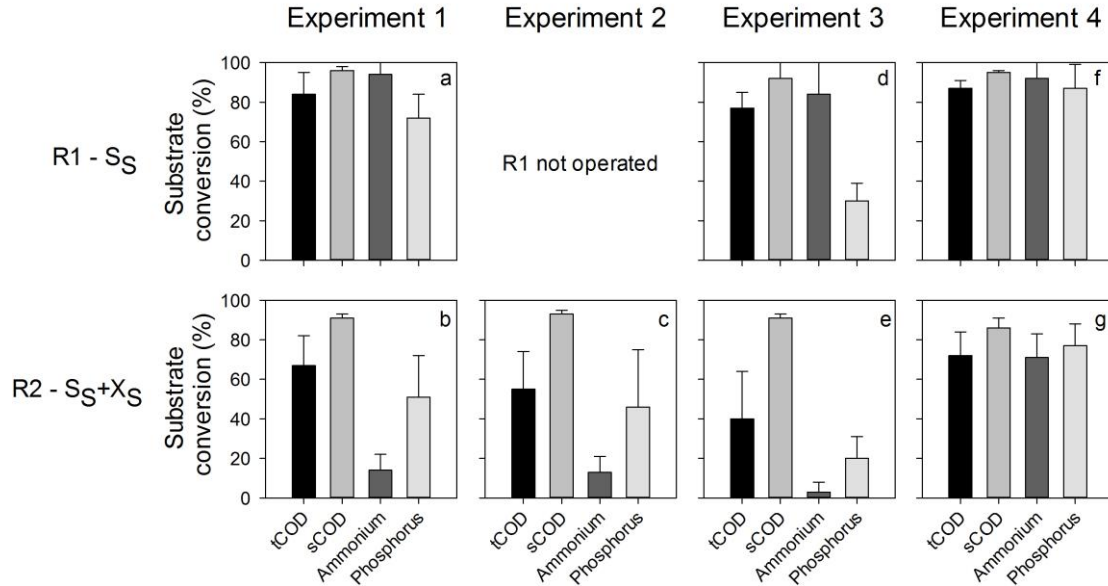


Figure 22. Effect on substrate conversion for R1 fed with S_S and R2 fed with S_S+X_S depending on the operating conditions applied: granulation process in absence or presence of X_S (*Experiment 1*), extended anaerobic phase in R2 (*Experiment 2*), increased selection pressure for fast-settling biomass (*Experiment 3*), constant reactor working volume (*Experiment 4*).



Solids were however still present in a considerable amount of around $250.0 \pm 245.8 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ in the effluent (Figure 19d), and therefore the SRT remained usually lower than 4 d. Stereomicroscopy observations revealed that the aerobic granules became less irregular, but that the presence of filamentous organisms in the bulk liquid increased (Figure 20c). The improvement of the granular sludge characteristics in terms of biomass concentration, settling ability, and morphology was nevertheless not followed by an increase in nutrient removal (Figure 22c). Removal efficiencies for tCOD, ammonium, and phosphorus were indeed slightly lower during *Experiment 2* than during *Experiment 1*, with average values of $55 \pm 19\%$, $13 \pm 8\%$, and $46 \pm 29\%$, respectively. As mentioned previously, R1 had to be reinoculated and restarted due to some operational problems that occurred in the beginning of *Experiment 2*.

4.2.3.3 Effect of an increased selection pressure for fast-settling biomass (Experiment 3)

Aerobic granules grew in both reactors under a settling time of 8 min. However, a decrease of the sedimentation time to 4 min was required to select only for the granular sludge. This selection pressure caused a wash-out of the slow-settling sludge and only the aggregates with good settling ability were retained in the reactor. As a result of the biomass wash-out, TSS decreased in both reactors down to $2.8 \pm 1.0 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ in R1 and $0.8 \pm 0.2 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ in R2 (Figure 19c). The quality of the effluents, in terms of solids concentration, ranged between 34.0 and 91.0 $\text{mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ for R1 and between 95.0 and 220.0 $\text{mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ for R2 (Figure 19d). The selection pressure for fast-settling biomass also led to an improvement of SVI_{30} and $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio, particularly in R2 (Figure 19a and Figure 19b). A $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio of around 1 was reached in both reactors. Average SVI_{30} values of 55.8 ± 8.9 and $50.3 \pm 14.3 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$ were measured in R1 and R2, respectively. The fraction of granules increased substantially and reached $97.3 \pm 1.4\%$ in R1 (Figure 20d) and $85.1 \pm 1.9\%$ in R2 (Figure 20e). As displayed in Figure 20d, the selection pressure in R1 resulted in a completely granulated sludge bed. The aerobic granules had an almost uniform size ($d > 0.63$

mm) with a nearly spherical shape and a yellowish color in R1 whereas still exhibited a considerable irregular and filamentous structure in R2 (Figure 20e). The substrate conversion capacity for both reactors was lower than in the previous experiments, especially for nitrogen and phosphorus removal. The average efficiencies for the removal of tCOD, sCOD, ammonium, and phosphorus amounted to, respectively, $77 \pm 8\%$, $92 \pm 8\%$, $84 \pm 22\%$, and $30 \pm 9\%$ in R1 (Figure 22d), and $40 \pm 24\%$, $91 \pm 2\%$, $3 \pm 5\%$, and $20 \pm 11\%$ in R2 (Figure 22e).

4.2.3.4 Effect of operating at constant reactor volume (Experiment 4)

The short settling time applied during *Experiment 3* resulted in a considerable concentration of solids in the effluent, especially for R2. This continuous biomass wash-out prevented the accumulation of solids inside the reactors, which in turn affected the overall removal performance. For this reason, the operation of the reactor was changed in *Experiment 4* from variable to constant working volume, i.e. simultaneous influent fill and effluent draw (so-called fill-and-draw phase) after the settling phase. The synthetic wastewaters were then injected at the bottom of the reactors at a low upflow velocity of $0.5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. Operating the SBRs at constant volume and low wastewater upflow velocity helped to reduce the presence of solids in the effluents of both reactors (Figure 19d). Average values of $11.1 \pm 9.6 \text{ mg}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$ for R1 and $42.0 \pm 26.5 \text{ mg}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$ for R2 were achieved. Operation under fill-and-draw condition resulted in a lower selection pressure for fast-settling biomass and led to a higher fraction of flocs inside the reactors (Figure 20f and Figure 20g). However, filamentous structures were no longer observed in R2. The concentration of solids and the fraction of granules were, respectively, $3.7 \pm 0.4 \text{ g}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$ and $76.0 \pm 6.4\%$ in R1 (Figure 19c and Figure 20f), and $3.2 \pm 0.4 \text{ g}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$ and $39.1 \pm 7.8\%$ in R2 (Figure 19c and Figure 20g). The sludge settleability was also affected by the higher presence of flocs. In R1, the SVI_{30} increased in the beginning of the experiment and stabilized around $58.4 \pm 2.6 \text{ mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$. This parameter increased more gradually in R2, up to an average value of $71.4 \pm 6.0 \text{ mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$. Working at constant volume led to an improvement of the reactors performance (Figure 22f and Figure 22g). The average removal efficiencies for tCOD, sCOD, ammonium,

and phosphorus increased, respectively, to $87 \pm 4\%$, $95 \pm 1\%$, $92 \pm 10\%$, and $87 \pm 12\%$ in R1, and to $72 \pm 12\%$, $86 \pm 5\%$, $71 \pm 12\%$, and $77 \pm 11\%$ in R2.

A summary of the results obtained for the four experiments can be found in Table 12.

4.2.4 Discussion

4.2.4.1 How does the presence of X_S in the influent together with the applied operating conditions influence the morphology, the properties, and the formation of aerobic granules?

The present study displayed that the type of substrate, namely readily biodegradable soluble (S_S) and slowly biodegradable particulate (X_S), impact significantly the morphology of the granules but also the whole granulation process (*Experiment 1*). The aggregates developed in the presence of X_S (R2) exhibited filamentous structures, which in turn affected the settling ability and the accumulation of biomass inside the reactor (*Experiment 1* –Figure 19a and Figure 19d). The growth of filamentous organisms at the surface of the granules after switching the feed water from synthetic to real domestic wastewater was previously noticed (PEYONG *et al.*, 2012). The influence of the presence of particulate substrates (starch) on the morphology of pre-cultivated aerobic granules in a pilot system fed with municipal wastewater was also reported by De Kreuk *et al.* (2010). Slowly biodegradable substrates in the influent favor the growth of filamentous and finger type structures at the granule surface (DE KREUK *et al.*, 2010). Slow hydrolysis of X_S during the anaerobic feeding and thus the subsequent availability of this substrate during the aerobic phase increase substrate gradients over the granules (DE KREUK *et al.*, 2010). This ultimately results in development of granules with an irregular morphology. However, the effect of the presence of X_S on the granulation process (e.g. kinetic of aerobic granule formation from flocs) was never evaluated.

Table 12. Summary of the main results obtained for the different operating conditions.

	<i>Experiment 1</i>		<i>Experiment 2</i>		<i>Experiment 3</i>		<i>Experiment 4</i>	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
SVI ₃₀ (mL·g _{TSS} ⁻¹)	46.6 ± 5.4	119.1 ± 14.1	-	57.9 ± 5.1	55.8 ± 8.9	50.3 ± 14.3	58.4 ± 2.6	71.4 ± 6.0
SVI ₃₀ /SVI ₁₀ (-)	0.90 ± 0.06	0.71 ± 0.03		0.69 ± 0.04	0.98 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.80 ± 0.06	0.78 ± 0.03
Granule fraction (%)	54.0 ± 7.4	20.8 ± 1.3	-	72.7 ± 8.2	97.3 ± 1.4	85.1 ± 1.9	76.0 ± 6.4	39.1 ± 7.8
TSS reactor (g _{TSS} ·L ⁻¹)	7.0 ± 0.6	2.0 ± 0.4	-	3.0 ± 0.4	2.8 ± 1.0	0.8 ± 0.2	3.7 ± 0.4	3.2 ± 0.4
TSS effluent (mg _{TSS} ·L ⁻¹)	40.0 ± 2.4	165.5 ± 124.9	-	250.0 ± 245.8	66.6 ± 21.2	139.4 ± 40.6	11.1 ± 9.6	42.0 ± 26.5
tCOD removal (%)	84 ± 11	67 ± 15	-	55 ± 19	77 ± 8	40 ± 24	87 ± 4	72 ± 12
sCOD removal (%)	96 ± 2	91 ± 2	-	93 ± 2	92 ± 8	91 ± 2	95 ± 1	86 ± 5
NH ₄ ⁺ -N removal (%)	94 ± 8	14 ± 8	-	13 ± 8	84 ± 22	3 ± 5	92 ± 10	71 ± 12
PO ₄ ³⁻ -P removal (%)	72 ± 12	51 ± 21	-	46 ± 29	30 ± 9	20 ± 11	87 ± 12	77 ± 11

In R1, after 52 d of operation, the SVI_{30}/SVI_{10} ratio was higher than 0.9 while in R2 this ratio was always lower than 0.7. A SVI_{30}/SVI_{10} ratio close to 1 accounts for full granulation of the biomass. Furthermore, the fraction of granules reached only 20.8% in R2, while in R1 this fraction was of 54.0%. The aerobic granulation process is thus much slower in the presence of X_S . This may explain why the formation of an aerobic granular sludge using real influents usually takes longer when compared to that of reactors fed with soluble and synthetic influents. Several studies performed with real municipal wastewater indeed reported periods of 140 up to 400 days to achieved more than 80% of granulation (NI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010b; WAGNER & COSTA, 2013). On the other hand, Liu *et al.* (2010b) have stated that aerobic granules cultivated in lab-scale reactors using synthetic wastewater containing only S_S are usually formed in 2–4 weeks and reach the steady state in 1–2 months.

The treatment of wastewaters that contain particulate organic substrates thus requires an adaptation of the operating conditions, e.g., to increase the anaerobic phase to maximize the hydrolysis of X_S . A too short contact time between the wastewater and the biomass during anaerobic feeding (1 h) is insufficient to hydrolyze all particulate starch (DE KREUK *et al.*, 2010). The extension of the anaerobic phase in R2 was therefore applied in order to enhance the hydrolysis of X_S . This led to the formation of more compact granules with a better settling ability ($SVI_{30} = 57.9 \pm 5.1 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$) and to a higher biomass concentration inside the reactor ($\text{TSS} = 3.0 \pm 0.4 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$). However, filamentous structures were still present in the bulk liquid suggesting that 90 min of anaerobic phase (60 min of anaerobic feeding + 30 min of anaerobic idle period) was still not sufficient to hydrolyze all the particulate starch from the influent. Furthermore, the fraction of granules ($d > 0.25 \text{ mm}$) was higher in the presence of X_S (72.7%) than with S_S only (54.0%) although microscopic observations showed opposite results (Figure 20c). A filamentous surface contributes to the existence of granules with larger diameter but with a fluffy structure (PEYONG *et al.*, 2012). Therefore, filamentous suspended growth can likely leads to an incorrect determination of the granule fraction since these organisms had an open structure and were probably retained in the sieves with the mesh openings of 0.63 and 0.25 mm.

During *Experiment 1* and *Experiment 2* the biomass was always a mixture of granules and flocs in both reactors (Figure 20a, Figure 20b, and Figure 20c). The co-existence of both types of biomass are often reported in AGS reactors treating real (NI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; LIU & TAY, 2012; WAGNER & COSTA, 2013) and synthetic (WAN *et al.*, 2009; MAÑAS *et al.*, 2011) influents. If the ratio of flocs is not controlled, granules cannot compete with flocculent sludge, leading to the deterioration of the sludge settleability and to the loss of granular sludge (LIU & TAY, 2012). To maintain a stable operation of the AGS reactor, the fraction of flocculent sludge should be kept at a low level (<35% of total biomass) by increasing the growth of granular sludge or by physically discharging the flocculent sludge (LIU & TAY, 2012). Shortening the settling time from 8 to 4 min favorably selected for granular sludge as dominant form of biomass in the reactors by significantly washing-out the fraction of flocculent sludge, as shown in Figure 20d, Figure 20e, Figure 20d, and Figure 20e. However, the continuous wash-out of the flocs resulted in a low biomass concentration inside the reactors (*Experiment 3* – Figure 19c). No biomass accumulation was observed under these conditions, indicating that the growth of aerobic granules was limited. Furthermore, the amount of solids present in the effluents remained high, especially in R2 (*Experiment 3* – Figure 19d). This may be due to the irregular morphology of the granules in R2, which can lead to a higher presence of many small biomass particles in the bulk liquid. Filaments and finger type structures can indeed break off under shear stress during reactor operation (DE KREUK *et al.*, 2010). Another hypothesis is that X_S is mainly converted into floccular biomass. At short settling time, the flocs that might be produced through the conversion of X_S are directly washed-out, which increase the effluent TSS and limits the accumulation of sludge in the reactor. This second hypothesis would therefore suggest that AGS reactors fed with X_S must contain and beneficiate from a significant fraction of floccular biomass. Based on our results, it can be concluded that the application of a strong selection pressure in order to achieve full granulation may not be an adequate operating condition when treating influents containing X_S .

At variable volume the effluents were extracted at the half of the maximum working heights of the reactors in a short withdrawal phase of less than 2 min. After settling, all the biomass that remained above this port was washed-out with the effluent. At constant volume, after the

settling phase the reactors were directly fed with the influent from the bottom resulting in a slow discharge of the effluent in the upper part of the reactors. Operating the SBRs at constant volume helped to reduce the selection pressure for fast-settling biomass, preventing a severe and constant wash-out of the biomass (flocs) at the end of each cycle. This resulted in a larger accumulation of flocs and therefore in a higher biomass concentration. The simultaneous fill-and-draw mode at a low upflow velocity ($0.5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) also led to a lower discharge of solids in the treated effluent. The operation of AGS reactors at constant volume were previously reported (DE KREUK AND VAN LOOSDRECHT, 2004; GIESEN *et al.*, 2013). A wastewater upflow velocity of $0.5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ was also applied by De Kreuk & Van Loosdrecht (2004). Under such an operation mode, the low influent upflow results in a plug-flow regime behavior of the liquid across the settled bed (WEISSBRODT *et al.*, 2014). The granules in the lower part of the settled bed will then face a higher substrate concentration than the flocs in the upper part of the settled bed (DE KREUK & VAN LOOSDRECHT, 2004). The competition for substrate between granules and flocs is then lower, and the growth of granular sludge is enhanced. However, flocs became dominant in R2 (60.9%). although no filamentous organisms were observed in the granules surface and/or in the bulk liquid. The more regular morphology of the biomass might be related to enhanced hydrolysis of X_S as a result of longer contact time between wastewater and biomass under simultaneous fill-and-draw mode. Potentially longer anaerobic contact times enhance the hydrolysis and fermentation of substrates as volatile fatty acids, which can subsequently be taken up by the microorganisms present in the granular sludge (DE KREUK *et al.*, 2010).

4.2.4.2 How does the presence of X_S in the influent together with the applied operating conditions influence the substrate conversion?

The quality of the treated effluent was also affected by the presence of X_S in the influent. The substrate removal capacity of R2 was substantially lower than that of R1 (Figure 22 – *Experiments 1-3*). Nutrient removal was more pronounced in R1, probably as a result of

the higher levels of biomass in the reactor (higher SRT). The proliferation of filamentous organisms led to a constant wash-out of fluffy biomass produced in the presence of X_S . Wash-out dynamics result in an insufficient SRT that did not enable bacterial populations with lower growth rates such as polyphosphate accumulating organisms (PAOs) and nitrifiers to grow in the system (WEISSBRODT *et al.*, 2012). Another possible explanation for a lower substrate removal in the presence of X_S is the inefficient COD removal under anaerobic conditions, and a subsequently leak of this substrate into the aerobic phase. During the anaerobic phase, most of all COD is taken up by microorganisms, such as PAOs and glycogen accumulating organisms (GAOs), which store COD as intracellular polymers. In the aerated phase, nitrification occurs while PAOs and GAOs oxidize their storage polymers (BASSIN *et al.*, 2012b). If COD is not completely stored under anaerobic conditions, nutrient removal during aerobic conditions will be then reduced. Samples taken immediately after the beginning of the aerobic phase (data not shown) displayed that the anaerobic uptake of soluble COD was incomplete in R2, while in R1 this substrate was mostly consumed during the anaerobic feeding. This may be related to the low rate of X_S hydrolysis rates under anaerobic conditions. The hydrolysis process converts slowly biodegradable particulate substrate into readily biodegradable soluble compounds. As a relatively slow process, hydrolysis is the rate-limiting step for the biodegradation of organic carbon and therefore it is generally the decisive step triggering the quality of the effluent (INSEL *et al.*, 2003). Limited biological dephosphatation and simultaneous nitrification and denitrification (SND) was previously observed in AGS reactors due to the leakage of COD into the aerobic phase (DE KREUK *et al.*, 2010; WEISSBRODT *et al.*, 2012). However, denitrification process was not the focus of our study and was therefore not evaluated. To promote the SND process the dissolved oxygen concentration should be kept at a low level during the aerobic phase by using, for example, an on/off aeration control system. In both reactors the applied airflow rate was kept constant during the aerobic phase in order to assure that the filamentous growth was predominantly resulting from the presence of X_S in the influent and not due to an oxygen limitation.

The anaerobic COD uptake might have also affected the morphology of the granules. Under conditions enabling the degradation of most organic matter during the anaerobic phase, the microorganisms

experience a famine state during the aerobic phase, which results in an improvement of microbial aggregation (SU *et al.*, 2012). Feast-famine regimes also stimulate the production of extracellular polymeric substances (EPS) that can thus sustain granulation. Full anaerobic acetate uptake in AGS reactors can further suppress filamentous overgrowth (WEISSBRODT *et al.*, 2012). In the presence of X_S , the famine period is not reached throughout the duration of one cycle, which may have caused the growth of filamentous organisms at the granules surface.

High nitrogen and phosphorus removal rates in the presence of X_S were achieved only when operating at constant reactor volume. Samples taken immediately after the beginning of the aerobic phase (data not shown) displayed that in both reactors COD was mainly consumed during the anaerobic fill-and-draw phase. These results suggest that the longer anaerobic contact time between the wastewater and the biomass led to an improved anaerobic uptake of COD that sustained nutrient removal. The operation of AGS reactors fed with X_S must therefore be adapted so that the hydrolysis rate is maximized. Furthermore, with less biomass being washed-out of the system the SRT was higher, allowing the enrichment of slow growing organisms such as PAOs and nitrifiers. Altering the operating strategy from variable to constant volume and decreasing the selection pressure for fast-settling biomass had therefore a positive effect in the overall quality of the treated effluent.

4.2.4.3 Relevance of the findings for practical applications

Lab-scale AGS reactors fed with synthetic substrate containing only soluble organic matter are usually operated in variable volume with rapid effluent withdrawal and under a high selection pressure for the fast-settling biomass by using a sedimentation time usually below 5 min. Our results demonstrated that such operating conditions cannot directly be transposed to the operation of reactors fed with influents containing X_S . The key factor triggering the formation of regular and dense aerobic granules with a high substrate removal capacity in the presence of X_S seems to be related to the establishment of an operating mode where the

uptake of particulate matter under anaerobic condition is enhanced. In our study this was achieved by decreasing the selection pressure and applying a simultaneous fill-and-draw mode. Future works should nonetheless investigate different wastewater upflow velocities during feeding. This should allow for an evaluation of the balance between the fractions of granules and flocs inside the reactor while assuring a good quality of the treated effluent, especially with regard of denitrification and biological phosphorus removal.

4.2.5 Conclusions

The conclusions of this study are:

- The formation of aerobic granules for the treatment of influents containing particulate organic matter (X_S) requires (1) reducing the selective pressure for fast-settling biomass and (2) applying a longer anaerobic phase to favor organic substrate utilization. Conventional operating conditions applied when treating influents that contain only S_S (e.g. high selective pressure) cannot be directly transposed when treating influents that contain X_S .
- Aerobic granular sludge fed with X_S was always composed of a substantial fraction of floccular biomass. At high selective pressure, the fraction of flocs was low (<20%) due to their continuous wash-out. This resulted in the formation of fluffy granules and poor substrate conversion. Reducing the selective pressure for fast-settling biomass helped to reach a low SVI_{30} (around $70 \text{ mL}\cdot\text{gTSS}^{-1}$) and a high SVI_{30}/SVI_{10} ratio (> 0.8) despite a high fraction of flocs. We believe that the presence of flocs in AGS fed with influents containing X_S cannot be completely avoided.
- Increasing the anaerobic period and decreasing the selective pressure for fast settling-biomass helped to maintain a higher biomass concentration in the reactors and thus a higher SRT. Ultimately, this helped to achieve full substrate conversion and thus very good effluent quality.

4.3 ARTIGO 3

No Artigo 2 foi exposto que o modo de operação de um reator de grânulos aeróbios deve ser adaptado de acordo com a composição do efluente, principalmente quando o mesmo apresenta material particulado. A operação do reator em volume constante, isto é, enchimento e descarte simultâneos, apresentou-se como uma boa alternativa para o tratamento de efluentes com material particulado na forma de *starch*. Isto ocorre, pois o enchimento a uma baixa velocidade ascensional de esgoto (V_{WW}) permite um maior contato do efluente a ser tratado com o lodo sedimentado na camada inferior do reator, possibilitando assim uma melhor remoção de X_S .

Neste contexto, no experimento que resultou no Artigo 3* buscou-se entender melhor até que ponto a velocidade ascensional de esgoto aplicada durante a fase de enchimento influencia as propriedades do lodo e a conversão do substrato. Para isso, o reator (*Sistema Experimental III*) foi alimentado com esgoto doméstico de baixa carga orgânica em diferentes V_{WW} : 1, 5,9, 8, 12,5 e 16 $m \cdot h^{-1}$.

A formação de grânulos aeróbios com IVL_{30} menor do que 50 $mL \cdot g_{SS}^{-1}$ foi observado tanto para baixa ($1 m \cdot h^{-1}$) quanto para alta V_{WW} ($16 m \cdot h^{-1}$). A uma V_{WW} de $16 m \cdot h^{-1}$, o lodo era composto principalmente de grânulos grandes ($d > 0,63$ mm), com uma superfície irregular e filamentosa. Por outro lado, o enchimento a uma V_{WW} de $1 m \cdot h^{-1}$, resultou em um lodo dominado por pequenos grânulos ($0,25 < d < 0,63$ mm), com uma estrutura bastante heterogênea. Além disso, observou-se uma fração significativa de flocos, como indicado pelos baixos valores de IVL_{30}/IVL_{10} (em torno de 0,8).

Ao operar o reator em volume constante, a remoção dos flocos ocorre quando a V_{WW} aplicada durante o enchimento excede a velocidade de sedimentação dos flocos. Desta forma, V_{WW} acima de $5,9 m \cdot h^{-1}$ acarretaram em um constante *washout* da biomassa. Com isso, a

*O Artigo 3 deu origem à seguinte publicação:

DERLON, N., WAGNER, J., COSTA, R.H.R., MORGENROTH, E. Formation of aerobic granules for the treatment of municipal wastewater using a sequencing batch reactor operated at constant volume.

concentração de sólidos no reator diminuiu de 6,6 para 1,2 $\text{g}_{\text{SST}}\cdot\text{L}^{-1}$ com o aumento da V_{WW} de 1 para 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. A baixa retenção de sólidos em V_{WW} maiores do que 5,9 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ resultou numa baixa remoção de substrato, afetando a qualidade do efluente tratado. Por outro lado, elevadas eficiências de nitrificação e remoção de carbono e fósforo foram obtidas a uma V_{WW} de 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, uma vez que houve uma maior retenção de biomassa no reator sob essas condições. No entanto, o processo de desnitrificação foi a etapa limitante na remoção de nitrogênio. Isto ocorreu provavelmente devido ao pequeno diâmetro dos grânulos obtidos a uma V_{WW} de 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. Em grânulos menores, a difusão do oxigênio dissolvido é maior e, conseqüentemente, o volume da camada anóxica dentro do grânulo é menor, afetando assim o processo de SND. O nitrato produzido durante o processo de nitrificação foi principalmente removido durante o enchimento anaeróbio do ciclo subsequente.

No geral, o estudo demonstrou que uma menor seleção da biomassa deve ser aplicada aos reatores de grânulos aeróbios utilizados para o tratamento de esgotos domésticos de baixa carga orgânica, tendo em vista a baixa velocidade de sedimentação dos grânulos cultivados com este tipo de efluente. Entretanto, velocidades ascensionais de esgoto levemente superiores a 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ podem ser aplicadas a fim de selecionar grânulos maiores, e assim favorecer o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas.

Transcrição do Artigo 3:

4.3.1 Introduction

The formation of aerobic granules has been extensively investigated in the last 20 years (MORGENROTH *et al.*, 1997). Granular sludge is today foreseen to be one of the main advanced technologies of the century for wastewater treatment (VAN LOOSDRECHT & BRDJANOVIC, 2014). However, its full-scale application for the treatment of domestic wastewater remains very limited. Indeed, most studies on aerobic granulation were performed at laboratory-scale using well-defined synthetic influents. Those synthetic

influent typically contain soluble and readily biodegradable substrates, such as carbohydrates or volatile fatty acids, at large concentrations, ranging from few hundreds to few thousands of $\text{mg}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$. Such high concentrations of readily biodegradable substrates allow for the cultivating of aerobic granules in few weeks (DANGCONG *et al.*, 1999; BEUN *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2011). Nevertheless, the aforesaid influents are not representative of low and medium-strength domestic wastewaters, which usually contain much lower concentrations of organic substrates (respectively 250 and 430 $\text{mg}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$) with a significant fraction (around 50%) in the particulate form (METCALF & EDDY, 2003). Furthermore, few studies were performed using complex influents such as domestic wastewaters (NI *et al.*, 2009; COMA *et al.*, 2012; WAGNER & COSTA, 2013). Nowadays the absence of studies of the granulation process under more realistic conditions critically limits the practical application of this technology.

Few studies reported successful granule formation during the treatment of domestic wastewaters (Table 13). Different observations can be drawn from these studies:

- (i) Achieving stable granulation requires long time. Ni *et al.* (2009) and Giesen *et al.* (2013), for example, reported periods of 10 and 13 months to achieve 85% and 90% granulation, respectively.
- (ii) Aerobic granules developed with real domestic wastewater are rather small, with diameters varying between 200 and 1300 μm (NI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010; WAGNER & COSTA, 2013). This is much smaller than the size of aerobic granules cultivated with synthetic influents, for which sizes of several millimeters are usually reported.
- (iii) Settling properties of aerobic granules fed with municipal wastewater are often very good. SVI_{30} values below 50 $\text{mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$ are frequently reported (GIESEN *et al.*, 2013; NI *et al.*, 2009) but higher values are also observed (i.e. slightly below 100 $\text{mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$ for Coma *et al.* (2012)). A similar observation is drawn for the SVI_{30} to SVI_{10} ratio. A ratio close to 1 is representative of full granulation. However, Coma *et al.*, (2012) and Wagner & Costa (2013) reported slightly smaller ratios

Table 13. Summary of the main results reported in the literature about the use of domestic wastewater for aerobic granulation.

Wastewater type	Substrate concentration (mg _{COD} ·L ⁻¹)	Organic load (kg _{COD} ·m ⁻³ ·d ⁻¹)	SBR operation	Time to achieve granulation	Settling properties (SVI, ratio of SVIs)	Fraction of granules	Effluent quality (mg·L ⁻¹)	Reference
Domestic (China)	tCOD 95-200 sCOD 35-120	0.6-1	Variable volume (15-30 min settling)	300 d	SVI ₅ : 40 mL·g ⁻¹ SVI ₃₀ : 40 mL·g ⁻¹ Ratio: 1	80%	Ammonia: 0.5 Nitrate: 4 Orthophosphate: 0.5 Suspended solids: 15	NI <i>et al.</i> , 2009
Domestic (40%) and industrial (60%) (China)	sCOD 250-1800		Variable volume	400 d	SVI ₃₀ < 50 mL·g ⁻¹ Ratio: 1	80-90%		LIU <i>et al.</i> , 2010
Domestic (Nereda@ plant, South Africa)	tCOD 1265		Constant volume. V _{ww} unknown		SVI ₅ : 30 mL·g ⁻¹			GIESEN <i>et al.</i> , 2013; VAN DER ROEST <i>et al.</i> , 2011
Domestic and industrial (Nereda@ plant, The Netherlands)			Constant volume. V _{ww} unknown	13 m	SVI ₅ : 60 mL·g ⁻¹ SVI ₃₀ : 40 mL·g ⁻¹ Ratio: 0.66	Around 90%	Ammonia: 0.5 Nitrate: 4 Orthophosphate: 0.5 Suspended solids: 10-20	GIESEN <i>et al.</i> , 2013; VAN DER ROEST <i>et al.</i> , 2011
Domestic and acetate (Australia)	*tCODt 326 ± 77 *sCOD 179 ± 46		Variable volume		SVI ₃₀ < 100 mL·g ⁻¹ § Ratio: ≈ 0.9§		Nitrite accumulation during aerobic phase	COMA <i>et al.</i> , 2012
Domestic (Brazil) [¶]	sCOD 430 ± 140	1-1.40	Variable volume (15 min settling)	140 d	SVI ₃₀ ≈ 53 mL·g ⁻¹ Ratio ≈ 0.9		Ammonia: 3 Suspended solids: 25-125	WAGNER & COSTA, 2013
Domestic and acetate (Germany)	tCOD 287-492	0.5–2.0	Variable volume (15-30 min settling)	125 d		98%	Orthophosphate: <3 Suspended solids: 40-100	ROCKTÄSCHEL <i>et al.</i> , 2015

*: before addition of acetate

§: data of the “100%-flocs” conditions

¶: data of Stage I and II (without addition of acetate)

- (iv) The performances of the granular sludge systems in terms of substrate conversion were not clearly evaluated until now. Information about the denitrification or phosphorus removal is often not reported. Furthermore, it is not so clear to what extent denitrification is observed simultaneously to nitrification.

Even though the studies listed in Table 13 clearly increased our understanding about the formation of aerobic granules during the treatment of domestic wastewater, they also displayed some limitations. First, some studies were performed with mixed influents and not with real domestic wastewaters, e.g. mixture of municipal and industrial wastewaters (LIU *et al.*, 2010; GIESEN *et al.*, 2013) or municipal wastewater with addition of acetate (COMA *et al.*, 2012; ROCKTÄSCHEL *et al.*, 2015). This sometimes resulted in large COD concentrations, e.g., up to $1800 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1}$ (LIU *et al.*, 2010). Such influent COD concentrations even exceed those of high-strength domestic wastewaters (METCALF & EDDY, 2003). To what extent successful granulation can be achieved with low-strength wastewater containing a significant fraction of organic substrate in the particulate form (X_S) still remains uncertain. The effect of the presence of X_S on the formation of aerobic granules and the quality of the effluent was previously evaluated (WAGNER *et al.*, submitted). The combination of a reduced selection pressure and a simultaneous fill-draw mode (constant volume) showed to be beneficial for the substrate removal efficiency and for suppressing filamentous overgrowth on the granules' surface in the presence of X_S (WAGNER *et al.*, submitted). However, the aforementioned studies did not clearly describe the system performances in terms of substrate conversion, e.g., denitrification and phosphorus removal.

A key advantage of aerobic granular sludge system is that simultaneous nitrification-denitrification can be achieved during the aerobic phase. But based on the existing literature, it remains unclear if denitrification is observed simultaneously to nitrification or if it occurs during the anoxic conditions. Finally, the operating conditions to achieve granulation seem rather diverse. Sequencing batch reactors (SBR) were operated either at variable volume (NI *et al.*, 2009; WAGNER & COSTA, 2013) or at constant volume (GIESEN *et al.*, 2013; VAN DER ROEST *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, submitted) for

aerobic granulation. Operating system at constant volume consists in feeding the reactor at its bottom with fresh wastewater while simultaneously discharging the treated water from its top. In this case the wastewater upflow velocity (V_{WW}) governs the removal of slow settling flocs. The operating conditions in terms of V_{WW} during the anaerobic feeding that must be applied to achieve full granulation need therefore to be evaluated.

The objectives of this study were: (i) to evaluate to what extent aerobic granules can form during the treatment of real low-strength domestic wastewater; (ii) to better understand how the operating conditions in terms of V_{WW} influence the formation of aerobic granules (fractions, kinetic, etc); and (iii) to quantify the performance of aerobic granular sludge systems in terms of substrate conversion, especially with regard of denitrification and biological phosphorus removal. For this purpose a 190 L column of 4 m height was operated for a period of three years for the treatment of real domestic wastewater. Different operating conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding were applied. The sludge properties (concentration, settling volume index, fraction of granules, etc.) and the reactor performances (COD, N and P removal) were monitored.

4.3.2 Materials and Methods

4.3.2.1 Experimental set-up

A sequencing batch column reactor of 190 L (0.25 m of diameter and 4 m of height) was operated in fill-draw mode (constant volume). The SBR was fed with real domestic wastewater, which was introduced anaerobically at the bottom of the reactor. The duration of a batch sequence was 4 h and was composed of the following phases: (i) anaerobic feeding phase, (ii) anaerobic standstill period, (iii) aerobic phase, and (iv) settling. The anaerobic feeding stopped after that 50% of the column volume was exchanged. The duration of the feeding was inversely proportional to the upflow velocity of the wastewater applied in the column. The duration of the full anaerobic phase (feeding plus standstill) was maintained constant (90 min). The aerobic phase and

settling were set in 140 and 10 min, respectively. Oxygen concentration was controlled between 2-2.5 mg_{O₂}·L⁻¹ during the aerobic phase using an on/off aeration control system. During the anaerobic standstill period, air was injected every 15 min during 5 s for mixing. The SBR was equipped with oxygen, ammonium, nitrate, and pH sensors (Endress & Hauser, Switzerland). All sensors were connected to a programmable logic controller (PLC). The PLC was connected to a supervisory control and data acquisition (SCADA) system.

4.3.2.2 Experimental approach

Two approaches were tested to develop aerobic granules (Table 14). The first approach consisted in converting floccular biomass into granules by improving the growth of slow-growing organisms, i.e., maintaining high solids retention time. A very low wastewater upflow velocity (V_{ww}) of 1 m·h⁻¹ was thus applied during this experimental phase to minimize the wash-out of slow-settling biomass during the anaerobic feeding (Table 14, 1st row). Two runs were performed under this operating condition. The second approach consisted in imposing a high selective pressure on the slow settling flocs, i.e., washing-out the flocs by imposing a high wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding. V_{ww} ranging from 5.9 to 16 m·h⁻¹ were tested for selecting granules.

Table 14. Details of the different experimental approaches applied in this study.

Experimental approach	V_{ww} during feeding (m·h ⁻¹)	Duration (d)	Operation period (d)
Approach 1 – conversion of flocs to granules	1.0	Run 1: 60	0 - 60
		Run 2: >150	382 - > 532
Approach 2 – flocs wash-out	5.9	83	61 - 144
	8.5	57	145 - 202
	12.5	112	113 - 315
	16	65	316 - 381

4.3.2.3 Domestic wastewater

The domestic wastewater used in this study was directly pumped from the combined sewer system of the city of Dübendorf, Switzerland. The wastewater was pre-treated to remove grit and sand before primary clarification. This primary clarified wastewater was then used in all our experiments (Table 15) and corresponds to a low-strength wastewater.

Table 15. Composition of the primary clarified wastewater.

Parameters	Unit	Average values
Total COD (tCOD)	mg·L ⁻¹	304,0 ± 127,4 (108)
Soluble COD (sCOD)	mg·L ⁻¹	127,34 ± 55,1 (111)
Total nitrogen (TN)	mg·L ⁻¹	32,0 ± 6,0 (31)
Ammonium nitrogen (NH ₄ ⁺ -N)	mg·L ⁻¹	18,2 ± 5,4 (130)
Total phosphorus (TP)	mg·L ⁻¹	5,2 ± 1,0 (31)
Orthophosphate (PO ₄ ³⁻ -P)	mg·L ⁻¹	2,1 ± 0,6 (117)
Total suspended solids (TSS)	mg·L ⁻¹	140 ± 30 (108)
Total organic loading rate	kg tCOD·m ⁻³ ·d ⁻¹	0,90 ± 0,39 (108)
Soluble organic loading rate	kg sCOD·m ⁻³ ·d ⁻¹	0,37 ± 0,17 (111)
Nitrogen loading rate	kg NH ₄ ⁺ -N·m ⁻³ ·d ⁻¹	0,05 ± 0,02 (130)
Phosphorus loading rate	kg PO ₄ ³⁻ -P·m ⁻³ ·d ⁻¹	6,39·10 ⁻³ ± 1,91·10 ⁻³ (117)

4.3.2.4 Cycle tests

Typical cycle tests were carried out in order to evaluate substrates conversions (e.g., simultaneous nitrification denitrification). During one cycle experiment, samples were taken every 15-30 minutes to measure soluble COD, nitrogen compounds, and phosphorus. During the anaerobic feeding phase the samples were collected in the upper part of the reactor (effluent). During the aerobic period the samples were collected using a port located at the half of the maximum working height of the reactor. Specific ammonium uptake rate and nitrite/nitrate formation rate were obtained by linear regression of their corresponding concentrations over time by the concentration of volatile suspended solids (VSS) in the reactor. The specific denitrification rate (SNDR) was calculated based on the difference between ammonium uptake rate and nitrite/nitrate formation rate.

4.3.2.5 Analytical methods

Total and soluble COD were measured using commercial photochemical tests (Hach-Lange, Germany). Ammonium was measured using a flow injection analyzer (FIAstar 5000, Foss, Denmark). The detection limit of this instrument is $0.2 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$. Nitrate and nitrite were measured using anion chromatography (881compact IC, Metrohm, Switzerland; detection limit for both components $0.2 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$). This study was carried out on composite samples of both influent and effluent. These samples were collected over a time period of 24 h and preserved at 4°C prior the chemical analysis. Total suspended solids (TSS) concentrations in the reactor and in the effluent were obtained by using filters with a pore size of $0.45 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Germany).

SVI and sludge size fraction were measured with a mixed liquor sample taken at the end of the aerobic phase. SVI_{10} and SVI_{30} were determined by dividing the biomass volume after a settling period of 10 and 30 min, respectively, per gram of TSS. The $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio was used in order to access granule formation, as suggested by De Kreuk *et al.* (2007a). Particle size fraction of the sludge biomass was measured using different sieves with decreasing mesh openings of 0.63 mm, 0.25 mm, and 0.1 mm. A sample of 200 mL of mixed liquor was mixed with additional 800 mL of tap water in order to prevent a build-up of a cake in the sieve. The sieving procedure was performed as described in Bin *et al.* (2011). The morphology of the biomass was regularly observed using a stereomicroscope (Olympus SZX10, Japan).

4.3.2.6 Calculation procedures

The sludge production was calculated using Equation 30:

$$P_X = P_{X_{H,STO}} + P_{X_{H,S}}$$

Equation 30

Where $P_{X_{H,STO}}$ is the sludge production using storage compounds, i.e., soluble COD stored during the anaerobic period ($g_{TSS} \cdot d^{-1}$); and $P_{X_{H,S}}$ is the sludge production using non-storage compounds, i.e., the residual soluble COD that remained after the anaerobic storage and the organic substrate in the particulate form ($g_{TSS} \cdot d^{-1}$).

These two fractions of the sludge production can be approximated using the following equations:

$$P_{X_{H,STO}} = i_{SS,XH} \cdot Y_{STO,NOx} \cdot Y_{H,O2} \cdot Q \cdot (S_{S,in} - S_{S,ana,end})$$

Equation 31

$$P_{X_{H,S}} = i_{SS,XH} \cdot Y_{H,O2} \cdot Q \cdot (X_{S,in} + S_{S,ana,end} - S_{S,aer,end})$$

Equation 32

Where $i_{SS,XH}$ is the suspended solids to biomass ratio ($0.9 g_{TSS} \cdot g_{COD}^{-1}$); $Y_{STO,NOx}$ is the anoxic yield of stored products per readily biodegradable substrate ($0.8 g_{COD} \cdot g_{COD}^{-1}$ based on Henze et al., 2000); $Y_{H,O2}$ is the aerobic yield of heterotrophic biomass ($0.64 g_{COD} \cdot g_{COD}^{-1}$ based on Henze et al., 2000); Q is the flow rate ($L \cdot d^{-1}$); $S_{S,in}$ is the concentration of readily biodegradable substrate in the influent ($0.3 g_{COD} \cdot L^{-1}$ based on our measurements); $S_{S,ana,end}$ is the concentration of readily biodegradable substrate remaining at the end of the anaerobic period ($0.04 g_{COD} \cdot L^{-1}$ based on our measurements); $X_{S,in}$ is the concentration of slowly biodegradable substrate in the influent ($0,15 g_{COD} \cdot L^{-1}$ based on our measurements); and $S_{S,aer,end}$ is the concentration of readily biodegradable substrate remaining at the end of the cycle ($0.02 g_{COD} \cdot L^{-1}$ based on our measurements).

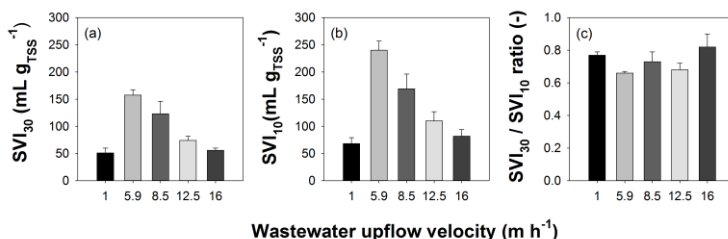
4.3.3 Results

4.3.3.1 Characteristics of the granular sludge

The SVI_{30} , SVI_{10} and SVI_{30}/SVI_{10} ratio were measured for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding (Figure 23). It is important to mention that the presented results from the Approach 1 (conversion of flocs to granules –

V_{WW} of $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) are the sum of the results obtained in both runs. Low SVI_{30} and SVI_{10} were achieved either at a very low ($1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) or at a very high wastewater upflow velocity ($16 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) (Figure 23a and Figure 23b). SVI_{30} values of 51 ± 9 and $56 \pm 3 \text{ mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$ were measured at V_{WW} of 1 and $16 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively. Also for the same applied V_{WW} , SVI_{10} values of 68 ± 11 and $80 \pm 12 \text{ mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$ were obtained. This corresponded to $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio of around 0.8 (Figure 23c). Such low SVI values were not achieved for intermediary V_{WW} (i.e., between 5.9 and $12.5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) even if a clear trend was observed. Indeed, increasing the V_{WW} from 5.9 to $16 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ resulted in a gradually decrease of the SVI values.

Figure 23. (a) SVI_{30} , (b) SVI_{10} and (c) $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio measured for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding.



The solids concentrations (in the reactor and in the effluent) (Table 16) and the size fractions (Figure 24) were monitored for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding. The presented results from the Approach 1 (conversion of flocs to granules – V_{WW} of $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) are the sum of the results obtained in both runs. The increase of the applied V_{WW} resulted in a decrease of the sludge concentration in the reactor. TSS gradually reduced from 6.6 to $1.2 \text{ g}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$ when V_{WW} increased from 1 to $16 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. On the other hand, no correlation between TSS concentration measured in the effluent and the amount of sludge measured in the reactor was observed. The lowest value of $\text{TSS}_{\text{effluent}}$ ($9 \pm 5 \text{ mg}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$) was indeed obtained when the reactor was operated at the lowest V_{WW} ($1.0 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$), despite the highest sludge concentration ($> 6.6 \text{ g}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$). For

higher values of V_{WW} , higher TSS concentration of $102 \pm 20 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ to $172 \pm 100 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$ were observed in the treated effluent. These values must be compared with sludge production values. The high TSS effluent concentrations observed at high V_{WW} induced a massive loss of biomass (60 to $100 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{d}^{-1}$). This biomass loss is in the same order of magnitude than the approximated biomass production ($85 \text{ g}_{\text{TSS}} \cdot \text{d}^{-1}$).

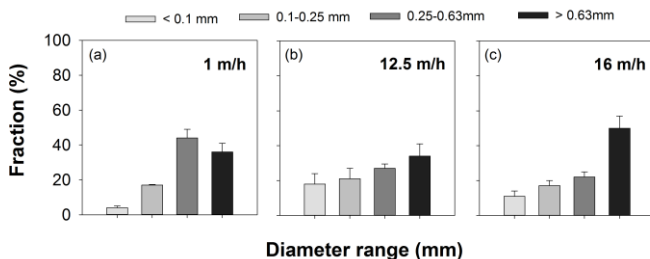
Table 16. TSS concentrations measured in the reactor and in the effluent.

Parameters	Experimental approach				
	Approach 1 – conversion of flocs to granules	Approach 2 – flocs wash-out			
$V_{\text{WW}} (\text{m} \cdot \text{h}^{-1})$	1.0	5.9	8.5	12.5	16
TSS _{reactor} ($\text{mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$)	up to 6600	3000 ± 400	2700 ± 250	1700 ± 300	1200 ± 300
TSS _{effluent} ($\text{mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$)	9 ± 5	172 ± 100	143 ± 40	102 ± 20	117 ± 45

The different size fractions of the sludge were quantified when the system was operated at V_{WW} of 1, 12.5, and $16 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$. The presented results from the Approach 1 refer to results obtained only in Run 2. Figure 24 shows that a co-existence of flocs and granules was observed for all the applied conditions. However, the sludge was mainly composed of granules, here referred to aggregates with diameter higher than 0.25 mm ($d > 0.25 \text{ mm}$). The total fraction of granules stabilized around 80, 61, and 87% of the total biomass for the V_{WW} of 1, 12.5, and $16 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. Furthermore, increasing the wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding helps to select granules based on their size. At very low V_{WW} of $1 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ the sludge was mainly composed of small granules ($0.25 < d < 0.63 \text{ mm}$: $44 \pm 5\%$). For higher values of V_{WW} , the sludge was mainly composed of larger granules ($d > 0.63 \text{ mm}$). The fraction of larger granules was $34 \pm 7\%$ and $65 \pm 11\%$ for V_{WW} of 12.5 and $16 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively.

Pictures of the sludge are shown for V_{WW} of 1, 12.5 and $16 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figure 25). At $1 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ the sludge was mainly composed of small granules. The shape of these granules was irregular. A higher upflow velocity helped to select for larger granules with a round shape. Filamentous outgrowths could be observed in the surface of the granules at $16 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$.

Figure 24. Size fractions of the sludge measured for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding.



4.3.3.2 Substrate conversion

The system performances in terms of substrate conversion were monitored for the different operating conditions (Figure 26). The presented results from the Approach 1 refer to results obtained only in Run 2. This figure displays the results obtained for the V_{WW} of 1, 12.5 and 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, since only the sCOD removal was measured when the system was operated at V_{WW} of 5.9 and 8.5 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. High COD removal efficiencies ($> 80\%$) were measured for all applied V_{WW} . At high V_{WW} the extensive floc wash-out resulted in a decrease of the ammonium and phosphorus removal. Ammonium efficiencies of $58 \pm 24\%$ and of $28 \pm 18\%$ were measured at 12.5 and 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively. Higher ammonium and phosphorus removal were observed when the system was fed at very low V_{WW} of 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. For this condition, average removal efficiencies of $96 \pm 4\%$ for ammonium and $89 \pm 7\%$ for phosphorus were obtained, resulting in a treated effluent with excellent quality. Besides, at a V_{WW} of 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, nitrite concentrations were always below the limit of quantification and an average nitrate concentration of $3.9 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was measured.

Figure 25. Stereomicroscopic images of aerobic granules for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding. White bars indicate a size of 1 mm.

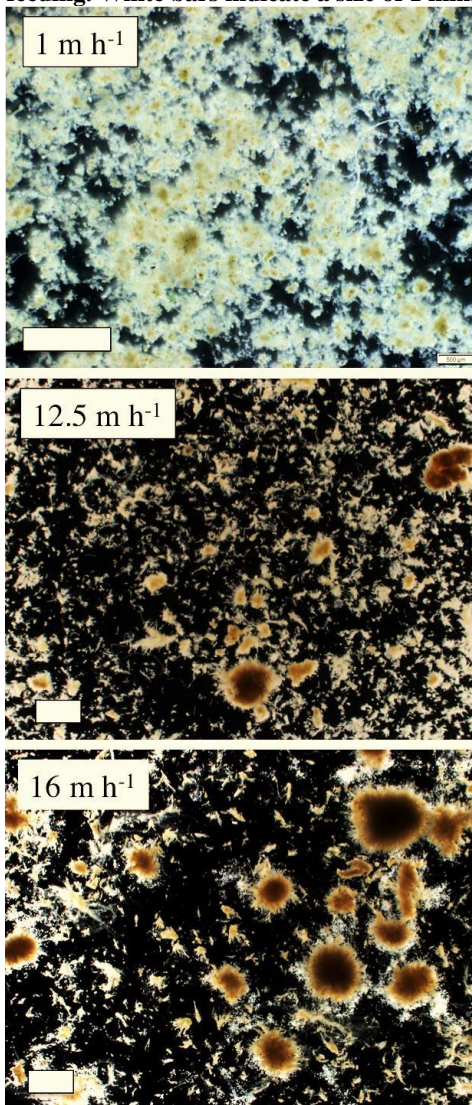
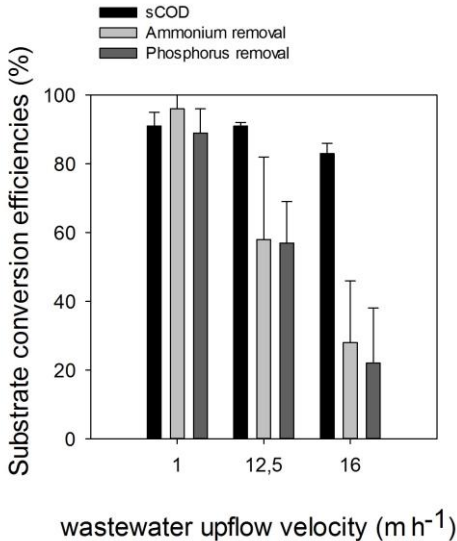


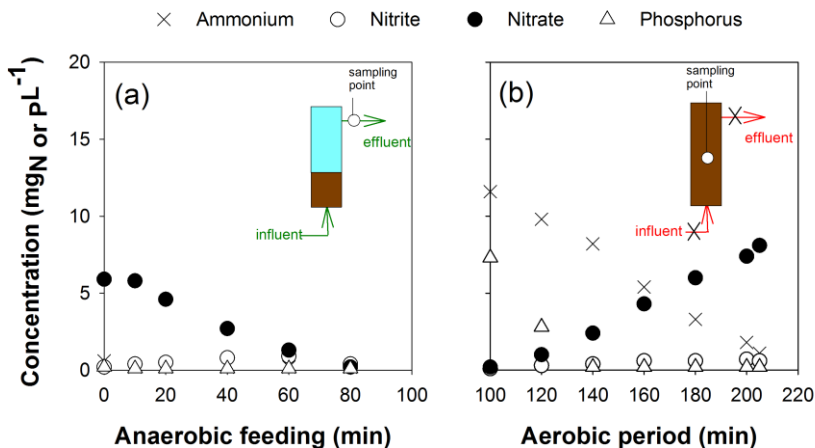
Figure 26. Efficiencies of substrate conversion measured for the different conditions in terms of wastewater upflow velocity during the anaerobic feeding.



Cycle studies were carried out in order to monitor the nutrient conversion during the (a) anaerobic feeding and (b) the aerobic phase. An example of a cycle obtained at V_{WW} of $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ (Run 2) is given in Figure 27. As mentioned before, during the anaerobic feeding phase the samples were collected in the upper part of the reactor (effluent). During the aerobic period the samples were collected using a port located at the half of the maximum working height of the reactor. The sludge did not completely settle during the 10 min of sedimentation phase of the previous cycle. When the simultaneous fill-and-draw phase started, the height of the sludge bed was usually around 2-2.5 m from the bottom of the reactor. The remaining nitrate from the previous cycle was thus denitrified during the anaerobic feeding by the sludge bed. The nitrate concentration in the treated effluent decreased from 6 to $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (SDNR of $0.045 \text{ g}\cdot\text{g}_{\text{VSS}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) during the 90 min of the simultaneous fill-and-draw phase. At the same period the ammonium, nitrite, and ortho-

phosphate concentrations remained constant in the treated effluent. During the following aerobic phase the ammonium concentration decreased from 12 to 0.5 $\text{mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ in the bulk liquid. Meanwhile the nitrate concentration increased from 0.2 to 8 $\text{mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ and no nitrite accumulation occurred. The ammonium depletion (11.5 $\text{mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$) and the nitrate release (7.8 $\text{mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$) at the end of the aerobic phase were unbalanced. This indicates that not only nitrification but also denitrification took place under aerobic conditions. However, the denitrification efficiency during the aerobic phase was only 30%.

Figure 27. Cycle test performed on the SBR reactor during the (a) anaerobic feeding (samples taken from the effluent) and during the (b) aerobic period (samples taken from the mixed liquor).



The phosphate concentration sharply decreased from 7.3 to 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ during the first 40 min of the aerobic phase. The amount of phosphate in the beginning of the aerobic phase was higher than the average values usually measured in the influent. This indicates that the phosphate released into the bulk liquid occurred during the anaerobic phase, followed by phosphate uptake during the aerobic phase.

4.3.4 Discussion

4.3.4.1 Successful granulation can be achieved using a low strength domestic wastewater

Our study aimed at evaluating two different approaches to cultivate aerobic granules during the treatment of low-strength municipal wastewater: (i) conversion of the flocs into granules by feeding the reactor at a low V_{WW} , in order to maintain high biomass concentration and thus high substrate conversion, (ii) wash-out of flocs and selection of granules by feeding the reactor at high V_{WW} . Both approaches were successful for cultivating a significant amount of aerobic granules (fraction > 50 %) with a good settleability.

When operating the reactor in fill-draw mode, the removal of the flocs occurs when the V_{WW} applied during the anaerobic feeding exceeds the floc settling velocity. According to Liu & Tay (2004) typical settling velocities of around 8 to 10 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ are usually reported for activated sludge flocs. On the other hand, much larger settling velocities (> 50 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$) are reported for aerobic granules fed with synthetic influents (KONG *et al.*, 2009; VLAEMINCK *et al.*, 2009). Settling velocities in a range of 18-40 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ were obtained for the aerobic granules cultivated with real domestic wastewater (NI *et al.*, 2009). This suggests that a feeding velocity between 8 and 18 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ should be applied to wash-out the flocs while maintaining the granules. However, in our study, a V_{WW} higher than 5.9 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ led to a severe wash-out of the biomass, resulting in a decrease of the TSS concentration inside the reactor. Under these conditions, this biomass loss is in the same order of magnitude than the biomass production. The increase of the V_{WW} from 5 to 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ was associated with a reduction of the sludge concentration from 3.0 ± 0.4 to $1.2 \pm 0.3 \text{ g}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$ in the system (Table 16). The quality of the treated effluent was therefore affected, i.e., high presence of solids in the effluent (> 100 $\text{mg}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$) and low nutrient removal efficiency. On the other hand, when the reactor was operated at very V_{WW} of 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ (no wash-out of flocs) a large amount of biomass was maintained in the reactor and very low TSS were measured in the effluent (Table 16). High efficiencies of substrate conversion were thus

obtained (Figure 26). At high V_{WW} , a strong selective pressure was thus applied for the fast-settling biomass. However, this selective pressure was too high to allow the formation and accumulation of biomass as indicated by the low sludge concentrations observed at high wastewater upflow velocities. This might be explained by the settling velocity of aerobic granular sludge (AGS) fed with influents containing particulate organic substrate, which is much lower than those reported for granules fed with synthetic feed water. For granules fed with pre-treated sewage, reducing the selective pressure was required to avoid the loss of granules with settling velocities of 2 to 5 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ (DE KREUK & DE BRUIN, 2004). Reducing the selective pressure has also been required to form AGS with synthetic influent that contained particulate organic substrate (WAGNER *et al.*, submitted).

Low SVI_{30} values ($< 60 \text{ mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$) were either achieved at very low ($1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) or at very high ($> 16 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) V_{WW} (Figure 23). Such values are similar to those reported in previous studies on aerobic granulation using real domestic wastewaters (NI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010; VAN DER ROEST *et al.*, 2011; GIESEN *et al.*, 2013; WAGNER & COSTA, 2013). However, a low SVI_{30} does not automatically imply in a granulated sludge bed and the $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio should also be considered when evaluating the extent of granulation. The $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratios measured at 1 and 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ were 0.75 and 0.85, respectively. These values are lower than those reported in previous studies (between 0.9 and 1), as shown in Table 13 (NI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010; COMA *et al.*, 2012; WAGNER & COSTA, 2013). The low $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio measured might be linked to the morphology of the granules. At low V_{WW} of 1 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ the main sludge fraction was composed of heterogeneous granules with a small average diameter (between 0.25 and 0.63 mm). At 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ the granules had a round but irregular surface, with filamentous outgrowths. The irregular surface of the granules results from the presence of organic substrate in the particulate form (DE KREUK *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, submitted). The $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio is also linked to the fraction of granules contained in the sludge, i.e., a higher fraction of granules increases this ratio. Our values thus indicate that the sludge was not entirely composed by granules. A large fraction of flocs remained in the reactor, which was confirmed by our measurements of the sludge size fractions (Figure 24). At V_{WW} of 1 and 16 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, the sludge contained 80% and 87% of granules ($d > 0.25 \text{ mm}$), respectively. In the previous studies on aerobic

granulation during treatment of domestic wastewater, almost full granulation (> 90%) was achieved. However, extended periods (more than 1 year) were necessary to achieve such high granulation (LIU *et al.*, 2010; VAN DER ROEST *et al.*, 2011; GIESEN *et al.*, 2013; ROCKTÄSCHEL *et al.*, 2015). The fraction of granules, for example, increased from 40% to 90% in around 1.5 years in the study of Van der Roest *et al.* (2011). However, the shorter duration of our experiments can explain the lower granule fractions compared to other studies. Each applied condition (in terms of V_{WW}) finished after around 2 months of operation.

Achieving a higher granule fraction and a $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio closer to 1 is thus a slower process than achieving a SVI_{30} lower than $50 \text{ mL}\cdot\text{g}_{\text{TSS}}^{-1}$. Over-long term, adjusting the operating conditions might be required to increase the fraction of large granules and in turn the $\text{SVI}_{30}/\text{SVI}_{10}$ ratio. This might include to slightly increase the V_{WW} or to selectively remove the flocs at the top of the sludge bed after settling.

4.3.4.2 Excellent effluent quality, in terms of COD, ammonium, phosphorus, and TSS, can be achieved

Our study demonstrates that excellent effluent quality can be achieved when feeding the reactor from the bottom at low wastewater upflow velocity ($V_{\text{WW}} = 1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) while simultaneously discarding the effluent from the top (fill-and-draw operation). High COD removal, nitrification, and biological phosphorus removal were obtained under these operating conditions. After 3 months of operation (Approach 1 – Run 2), the ammonium, nitrite, and phosphorus concentrations measured in the effluent were even below the limits of quantification of our instruments ($0.2 \text{ mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ for ammonium, $0.1 \text{ mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ or $\text{mg}_\text{P}\cdot\text{L}^{-1}$ for nitrite and phosphorus, respectively). Carbon and phosphorus can thus be almost completely removed with aerobic granular sludge treating low-strength domestic wastewater. Cycle analysis displayed that phosphorus is released during the anaerobic feeding and then incorporated to the biomass in the subsequent aerobic phase. The release of phosphorus under anaerobic conditions and low phosphorus concentrations in the effluent are not only helpful to meet discharge

limits, but also to achieve a stable growth of aerobic granules (ROCKTÄSCHEL *et al.*, 2015). Such high performances of aerobic granular sludge system were also reported by Ni *et al.* (2009), Van der Roest *et al.* (2011), and Giesen *et al.* (2013). Excellent nitrification efficiencies were also achieved, but denitrification was the limiting process for complete nitrogen removal. During granular N-removal process, nitrification is easy to be achieved when aeration is sufficiently supplied, while denitrification is normally a rate limiting step due to deficient anoxic conditions and/or carbon source supply (CHEN *et al.*, 2011). The denitrification process will be further discussed in item 4.3.4.3

Additionally, very low TSS concentrations were measured in the effluent: $9 \pm 5 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$. This value is in the same range than those reported by Ni *et al.* (2009) ($15 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$) or by Giesen *et al.* (2013) for the Nereda® process of Epe ($10\text{-}20 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$). Nevertheless, in our study low TSS concentrations were achieved despite a significant fraction of flocs in the sludge (around 20%). This suggests that the floccular biomass of our system was dense enough to remain in the reactor while feeding from the bottom at a V_{WW} of $1 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$. Furthermore, it has been reported that the higher the content of the granules, the higher the TSS effluent concentrations (ROCKTÄSCHEL *et al.*, 2015). This may be due to the fact that higher floc content in granular reactors may provide a higher surface area where protozoa find place to settle (ROCKTÄSCHEL *et al.*, 2015). The presence of large amounts of protozoa have a positive impact of the effluent quality as those organisms consume high amounts of suspended solids (SCHWARZENBECK *et al.*, 2004; DE KREUK *et al.*, 2010; ROCKTÄSCHEL *et al.*, 2015). Rocktäschel *et al.* (2015) therefore recommends granule fractions between 70 and 80% to achieve TSS effluent concentrations below $50 \text{ mg}_{\text{TSS}} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.3.4.3 But only partial denitrification is observed

The main parameters governing the simultaneous nitrification denitrification (SND) in granular sludge are the concentration of dissolved oxygen in the bulk liquid, the granule size, and the microbial activity (LOCHMATTER *et al.*, 2013). In the present study the

dissolved oxygen (DO) concentration was controlled between 2-2.5 $\text{mg}_{\text{O}_2}\cdot\text{L}^{-1}$ during the aeration phase in order to limit oxygen penetration depth in the granules and enhance denitrification. From an operating perspective, lowering the DO has been previously proposed as a solution to SND in aerobic granular sludge (BEUN *et al.*, 2001; LOCHMATTER *et al.*, 2013). However, only partial denitrification ($> 60\%$) was obtained when operating the reactor at $V_{\text{WW}} = 1 \text{ m h}^{-1}$. An average nitrate concentration of $3.9 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was measured in the effluent. This value is in the same order of magnitude than those reported for the Nereda® process of Epe (GIESEN *et al.*, 2013). Despite the good effluent quality, in terms of NOx concentrations, it is relevant to discuss why only partial denitrification occurred during our study.

AGS are mass-transfer limited system. Thus, denitrification can in theory occur during the aerobic phase simultaneously to nitrification (SND). In our study, denitrification occurred: (i) during the anaerobic feeding; and (ii) during the aerobic phase, simultaneously with nitrification. Nonetheless, SND only contributed to a minor fraction to the overall denitrification ($16 \pm 11 \%$), and most part of the nitrate formed during nitrification was removed throughout the subsequent feeding phase. About 84% of the nitrogen load was present as $\text{NO}_3^- \text{-N}$ at the end of the cycle, leading to anoxic conditions in the subsequent feeding phase. This can ultimately lead to a competition for COD between denitrifying bacteria and polyphosphate accumulating organisms (PAO) (LOCHMATTER *et al.*, 2013).

Two aspects can explain the partial SND: (i) the diffusion of oxygen inside the granules and/or (ii) the availability of organic substrate. Granule size and density, biomass spatial distribution and activity of diverse bacteria species, are associated with DO diffusion in granules (DE KREUK *et al.*, 2007b). This will ultimately influence the volume of the aerobic and anoxic zones and therefore the total nitrogen removal. The extent of SND is indeed directly linked to the granule size (CHEN *et al.*, 2011). The ratio of denitrified nitrate to the produced nitrate increased with the mean granule diameter, i.e., with an increasing anoxic volume (ROCKTÄSCHEL, 2013). Chen *et al.* (2011) reported an increase of the total nitrogen removal efficiency of 67.9 to 71.5% with the increase of the size of the granules of 0.7 to 1.5 mm. An optimum nitrogen removal was found with granules larger than 1.3 mm (DE KREUK *et al.*, 2005a). In our study, although the DO concentration was

controlled at a low level, the size of the granules was relatively small. After 3 months of operation at $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, the sludge was composed of around 36% of granules larger than 0.63 mm and 44% of granules with diameter between 0.25 and 0.63 mm. It is thus hypothesized that the size of our granules might have triggered the partial SND during the aerobic phase. Selecting larger granules with a V_{WW} slightly larger than $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ might thus be beneficial to maintain high SND.

4.3.5 Conclusions

The main conclusions of this study are:

- Successful granulation was achieved during treatment of low-strength domestic wastewater. The AGS reactor contained a significant fraction of granules with a good settleability. These granules were rather small and had an irregular structure.
- Applying a low selective pressure for fast-settling biomass is required to start-up AGS reactors for the treatment of complex influents such as domestic wastewater. This can be achieved by operating the reactor in a simultaneous fill-and-draw mode at low wastewater upflow velocity ($1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$). Under these operating conditions, excellent effluent quality was achieved in terms of solids concentration ($< 10 \text{ mg}_{\text{TSS}}\cdot\text{L}^{-1}$), nitrification, and COD and phosphorus removal.
- Simultaneous nitrification and denitrification remained limited ($16 \pm 11\%$) at V_{WW} of $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, and most part of the nitrate formed during nitrification was removed throughout the subsequent feeding phase. The small volume of the anoxic zone volume due to the small diameter of the granules explains this observation.

4.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS

Em relação ao processo de granulação aeróbia:

De maneira geral, é possível desenvolver grânulos aeróbios utilizando esgoto doméstico de baixa carga orgânica ($< 2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ de DQO) (*SE-I* e *SE-III*). Entretanto, como reportado no Artigo 1, este processo é bem mais lento se comparado ao tempo de granulação usualmente reportado nos estudos com esgoto sintético solúvel de elevada carga orgânica. Os grânulos cultivados com esgoto doméstico apresentam uma superfície irregular e filamentosa, além de diâmetros menores. Isto está relacionado à presença de material particulado (X_S) no esgoto. Como demonstrado no Artigo 2 (*SE-II*), a cinética de granulação e as características da biomassa granular são fortemente afetadas pela presença de X_S .

Por outro lado, frações significativas de flocos foram observadas nos reatores. A operação do reator em volume constante, em condições de baixa velocidade ascensional de esgoto ($0,5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ *SE-II* e $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ *SE-III*), acarretou em uma maior retenção de biomassa e, conseqüentemente, em uma maior remoção do substrato. Entretanto, isso levou a um menor *wash-out* dos flocos e os mesmos foram retidos no reator. Torna-se, portanto, necessário avaliar até que ponto a presença de flocos não afeta a manutenção e estabilidade dos grânulos, tendo em vista a possível competição por substrato entre os dois tipos de biomassa.

Em relação à remoção de nitrogênio:

Os resultados apresentados no Artigo 1 (*SE-I*) indicam que a assimilação do nitrogênio pelos grânulos maduros cultivados com esgoto doméstico contribuiu pouco para a remoção global de nitrogênio. As condições para a ocorrência dos processos de nitrificação e, principalmente, desnitrificação devem ser, portanto estimuladas, a fim de obter uma maior remoção de nitrogênio. Observou-se que a desnitrificação foi a etapa limitante na remoção do nitrogênio, tanto no *SE-I* quanto no *SE-II*. Isto pode ter ocorrido devido à baixa

disponibilidade de uma fonte de carbono facilmente biodegradável. No caso do *SE-I*, a DQO facilmente biodegradável era rapidamente consumida nos primeiros 30 min da fase de aeração. Já no *SE-III*, a DQO era principalmente removida durante a fase de enchimento anaeróbico. Como a formação de nitrito e/ou nitrato durante o processo de nitrificação ocorre geralmente após a remoção de DQO, a baixa disponibilidade de carbono pode ter sido um fator limitante para a ocorrência da desnitrificação.

Outro fator que pode ter afetado o processo de desnitrificação foi o tamanho dos grânulos. Os grânulos cultivados com esgoto doméstico geralmente apresentam diâmetros menores do que aqueles cultivados em esgoto sintético de elevada carga orgânica. Neste caso, a resistência à penetração de oxigênio dentro do grânulo é menor e, conseqüentemente, o volume da camada anóxica será menor. Com isso, o processo de desnitrificação, que ocorre na camada anóxica dentro dos grânulos, não é suficiente para remover todo o nitrito e ou/nitrato produzidos durante a nitrificação. Torna-se, portanto, necessário inserir fases anóxicas ao longo do ciclo ou ainda limitar a concentração de oxigênio aplicada ao reator utilizando, por exemplo, um sistema de aeração intermitente (sistema *on/off*). Uma menor concentração de oxigênio implica em uma menor penetração do mesmo dentro do grânulo, aumentando assim o volume da zona anóxica. Além disso, a aeração intermitente resulta em uma considerável redução do consumo de energia, trazendo benefícios econômicos. No *SE-III* um sistema *on/off* de aeração foi utilizado, a fim de manter a concentração de OD durante a fase aeróbia entre 2-2,5 mg·L⁻¹. Mesmo mantendo uma concentração relativamente baixa de OD, o diâmetro de grande parte da biomassa granular era pequeno, limitando o processo de desnitrificação. Desta forma, torna-se necessário encontrar um ponto ótimo entre o tamanho do grânulo e o fornecimento do oxigênio (em termos de vazão de ar aplicada), de maneira que a capacidade de remoção de nitrogênio do sistema seja otimizada.

Em relação à remoção de fósforo:

O processo de remoção de fósforo não foi detalhadamente explorado como a remoção de nitrogênio. No geral, percebeu-se que a remoção de fósforo dependeu fortemente da concentração de biomassa

dentro do reator, bem como da configuração do ciclo de tratamento. Os Artigos 2 e 3 mostraram que é importante ter um tempo de retenção de sólidos adequado, visto que os organismos acumuladores de fósforo são de lento crescimento. Uma elevada seleção da biomassa acarreta em um constante *wash-out* da mesma, dificultando a retenção dos micro-organismos de lento crescimento no sistema.

A operação do reator em volume constante (enchimento-descarte simultâneos) em condições de baixa velocidade ascensional de esgoto ($0,5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ SE-II e $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ SE-III) permitiu um maior contato entre o esgoto a ser tratado e o lodo sedimentado na camada inferior do reator. Desta forma, ocorreu a liberação de fósforo no meio líquido durante o enchimento anaeróbio, seguida pela absorção de fósforo pelos micro-organismos em condições aeróbias.

Em relação à operação do reator:

Reatores de grânulos aeróbios, alimentados com substrato sintético solúvel, são geralmente operados em volume variável, com descarte rápido do efluente tratado e sob uma forte seleção da biomassa (tempo de sedimentação geralmente inferior a 5 min). Como consequência, a biomassa de pior sedimentabilidade (flocos) é constantemente eliminada com o efluente tratado ao fim do ciclo de tratamento (*wash-out*). Entretanto, como observado durante o *Experimento 2* do SE-II, apesar desse modo de operação selecionar a biomassa granular, um constante *wash-out* da biomassa acarreta em uma baixa concentração de biomassa dentro do reator. Os flocos formados a cada ciclo são continuamente lavados do reator dificultando a acumulação de biomassa. A qualidade do efluente tratado é, portanto, afetada, uma vez que a velocidade de crescimento dos organismos nitrificantes e removedores de fósforo é bastante lenta. Isso ainda é mais crítico no tratamento de esgoto de baixa carga orgânica, tendo em vista a menor disponibilidade de substrato.

A operação de reatores com grânulos aeróbios deve, portanto, ser modificada para o tratamento de esgoto doméstico de baixa carga orgânica, o qual contém uma considerável fração de material particulado de difícil degradação em sua composição. Os reatores do SE-II operados com esgoto sintético, em condições controladas em termos de carga

aplicada, foram essenciais para testar diferentes condições operacionais. As condições testadas tiveram como objetivo avaliar os efeitos causados pela presença de X_S . Os resultados apresentados no Artigo 2 indicaram que a operação do reator em volume constante foi uma boa alternativa para o tratamento de efluentes com X_S . Isto ocorre, pois o enchimento a uma baixa velocidade ascensional de esgoto (V_{WW}) permite um maior tempo de contato do efluente a ser tratado com o lodo sedimentado na camada inferior do reator, possibilitando assim uma melhor remoção de X_S . Além disso, as diferentes V_{WW} estudadas no *SE-III* (Artigo 3) indicaram que velocidades baixas são mais indicadas, uma vez que há uma menor seleção da biomassa, ou seja, um menor *wash-out* dos flocos.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que, para as condições operacionais testadas na pesquisa, as hipóteses formuladas nesta tese foram confirmadas. Com base nessas hipóteses e nas questões norteadoras, têm-se as seguintes conclusões:

- É possível desenvolver grânulos maduros e estáveis com esgoto doméstico em condições de baixa carga orgânica ($COV < 2,0 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ de DQO) utilizando reatores em bateladas sequenciais (RBS). Entretanto, a presença de material particulado nesse tipo de efluente afeta o processo de formação e as características dos grânulos, bem como a qualidade do efluente tratado.
- O modo de operação dos reatores granulares deve ser adaptado de acordo com o tipo de efluente a ser tratado, principalmente aqueles que contem material particulado em sua composição, como é o caso do esgoto doméstico. Dentre as modificações estudadas, pode-se concluir que a operação do reator em volume constante (enchimento e descarte simultâneos, a uma baixa velocidade ascensional de esgoto) garantiu a formação de grânulos regulares e não filamentosos, com boa capacidade de sedimentação e excelente remoção de substrato. O enchimento anaeróbio a uma baixa velocidade ascensional de esgoto permitiu um maior tempo de contato do efluente a ser tratado com o lodo sedimentado na camada inferior do reator. Um tempo de enchimento anaeróbio de 90 min mostrou-se suficiente para uma melhor remoção do material particulado, bem como do fósforo.
- O constante *wash-out* da biomassa flocular não é um pré-requisito para a formação e manutenção da biomassa granular. A menor seleção entre biomassa granular e flocular, resultante da operação dos RBS em volume constante, acarretou em uma maior retenção de biomassa dentro do reator, o que refletiu diretamente na qualidade do efluente tratado. Nessas condições, elevadas eficiências de nitrificação e remoção de carbono e fósforo foram obtidas em uma única unidade operacional.

- Além de criar condições mais propícias para a ocorrência do processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas durante a fase aeróbia, a utilização de um sistema de aeração intermitente pode ainda levar a um menor consumo energético do sistema. Entretanto, a nitrificação e desnitrificação ocorreram de modo parcial. A desnitrificação foi a etapa limitante para a remoção total de nitrogênio, mesmo com o controle do oxigênio dissolvido em baixas concentrações (entre 2-2,5 mg·L⁻¹). O tamanho relativamente pequeno dos grânulos desenvolvidos com esgoto doméstico pode não ter sido suficiente para garantir um volume satisfatório da zona anóxica, no qual a desnitrificação pudesse ocorrer completamente. Torna-se, portanto, necessário encontrar um ponto ótimo entre o tamanho do grânulo e a concentração de oxigênio dissolvido aplicada ao sistema, a fim de otimizar a ocorrência do processo de desnitrificação durante a fase aeróbia.

6 RECOMENDAÇÕES

Tendo em vista os resultados obtidos com a presente pesquisa, sugerem-se as seguintes recomendações para futuros trabalhos com grânulos aeróbios cultivados com esgoto doméstico:

- Estudar mais profundamente o processo de nitrificação e desnitrificação via nitrito, avaliando quais outros fatores podem influenciar a ocorrência do mesmo. Além disso, avaliar as possíveis causas de acumulação de nitrito no reator, buscando alternativas que evitem que elevadas concentrações de nitrito sejam descartadas junto com o efluente tratado.
- Aperfeiçoar o processo de desnitrificação, a partir da inclusão de fases anóxicas ao longo do ciclo, por exemplo. Outra opção seria encontrar um ponto ótimo entre o tamanho do grânulo e o fornecimento do oxigênio, a fim de garantir um aumento do volume da camada anóxica dentro do próprio grânulo.
- Quantificar a produção de óxido nitroso (N_2O) durante o processo de desnitrificação, tendo em vista o seu grande potencial para mudanças climáticas.
- Avaliar a existência de uma possível competição entre a biomassa flocular e granular durante a operação do reator em longo prazo. Ademais, estabelecer até que ponto a presença de flocos pode afetar a estabilidade dos grânulos aeróbios.
- Verificar o efeito da presença/ausência de material particulado na composição microbiológica e na distribuição dos microorganismos dentro dos grânulos, utilizando técnicas de biologia molecular.
- Melhor compreender como ocorre o processo de hidrólise do material particulado nos grânulos aeróbios.

REFERÊNCIAS

AKABOCI, T.R.V. **Tratamento de esgoto sanitário em reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios: desempenho do processo e modelagem matemática.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2013.

AL-REKABI, W.S., QIANG, H., QIANG, W.W. Review on sequencing batch reactors. **Pakistan Journal of Nutrition**, 6 (1): 11-19, 2007.

ALVES, K.C.G. **Tratamento de efluentes têxteis usando reator de leito fluidizado trifásico aeróbio com pré ou pós ozonização.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2000.

AMANN, R. In situ identification of microorganism by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: AKKERMAN, A.D.L., VAN ELSAS, J.D., DE BRUJIN, F.J. (eds). **Molecular microbial ecology manual.** 1995, p. 1-15.

ANA - Agência Nacional de Águas. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: informe 2011.** Brasília: ANA, 2011. 112 p.

ANTHONISEN, A.C., LOEHR, R.C., PRAKASAM, T.B., SRINATH, E.G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Water Pollution Control Federation**, 48 (5): 835-852, 1976.

APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 21ed., Washington, 2005.

ARTAN, N., ORHON, D. **Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal.** Scientific and Technical Report No. 19, London: IWA Publishing, 2005. 100 p.

ARTAN, N., WILDERER, P., ORHON, D., MORGENROTH, E., ÖZGÜR, N. The mechanism and design of sequencing batch reactor

systems for nutrient removal – the state of the art. **Water Science and Technology**, 43 (3): 53-60, 2001.

ASLAN, S., MILLER, L., DAHAB, M., Ammonium oxidation via nitrite accumulation under limited oxygen concentration in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, 100: 659 - 664, 2009.

BAEK, S.H., PAGILLA, K.R. Simultaneous nitrification and denitrification of municipal wastewater in aerobic membrane bioreactors. **Water Environment Research**, 80 (2): 109-117, 2008.

BAO, R., YUA, S., SHIA, W., ZHANGE, X., WANGA, Y. Aerobic granules formation and nutrients removal characteristics in sequencing batch airlift reactor (SBAR) at low temperature. **Journal of Hazardous Materials**, 168: 1334-1340, 2009.

BARBOSA, S.R. **Tratamento de efluentes em reator de leito fluidizado sequencial em batelada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2004.

BARTHEL, L. **Estudo de biofilme desenvolvido em reator de leito fluidizado trifásico aeróbico no tratamento de efluentes têxteis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 1998.

BASSIN, J.P. 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 efluentes e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011, p. 91-170.

BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, R., DEZOTTI, M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Simultaneous nitrogen and phosphate removal in aerobic granular sludge reactors operated at different temperatures. **Water Research**, 46 (12): 3805-3816, 2012a.

BASSIN, J.P., KLEEREBEZEM, R., DEZOTTI, M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Measuring biomass specific ammonium, nitrite and phosphate uptake rates in aerobic granular sludge. **Chemosphere**, 89: 1161-1168, 2012b.

BASSIN, J.P., PRONK, M., KRAAN, R., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Ammonium adsorption in aerobic granular sludge, activated sludge and anammox granules. **Water Research**, 45 (16): 5257-5265, 2011.

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

BERNET, N., SPÉRANDIO, M. Principles of nitrifying processes. In: CERVANTES (editor), F.J. **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution: Principles and Engineering**. London: IWA Publishing, 2009, p. 23-39.

BEUN, J.J., HENDRIKS, A., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., MORGENROTH, E., WILDERER, P.A., HEIJNEN, J.J. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Water Research**, 33 (10): 2283-2290, 1999.

BEUN, J.J. HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. N-Removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 75 (1): 82-92, 2001.

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

BIN, Z., ZHE, C., ZHIGANG, Q., MIN, J., ZHIQIANG, C., ZHAOLI, C., JUNWEN, L., XUAN, W., JINGFENG, W. Dynamic and distribution of ammonia-oxidizing bacteria communities during sludge granulation in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor. **Water Research**, 45: 6207-6216, 2011.

BORTOLOTTO NETO, A.F. **Estratégias para a nitrificação em reator de leito fluidizado sequencial em batelada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2004.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 430/11**, de 24 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 de Meio Ambiente. Brasília, DF.

CHANGYONG, W., YONGZHEN, P., SHUYING, W., XIAOLING, L., RANDENG, W. Effect of sludge retention time on nitrite accumulation in real-time control biological nitrogen removal sequencing batch reactor. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 19 (3): 512-517, 2011.

CHEN, F., XIA, Q., JU, L.K. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (11): 6715-6722, 2003.

CHEN, F.Y., LIU, Y.Q., TAY, J.H., NING, P. Operational strategies for nitrogen removal in granular sequencing batch reactor. **Journal of Hazardous Materials**, 189: 342-348, 2011.

CHEN, Y., JIANG, D., LI, J., LI, J, SUN, F., WANG, L., WANG, S., ZHANG, D., ZHANG, Q. Morphological and structural characteristics of aerobic granulation, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 81 (5): 823-830, 2006.

CHEN, Y.C., LIN, C.J., CHEN, H.L., FU, S.Y., ZHAN, H.Y. Cultivation of biogranules in a continuous flow reactor at low dissolved oxygen. **Water, Air, and Soil Pollution: Focus**, 9: 213-221, 2009.

CHIU, Y.C., LEE, L.L., CHANG, C.N., CHAO, A.C. Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 59: 1-7, 2007.

CHUANG, H. P., OHASHI, A., IMACHI, H., TANDUKAR, M., HARADA, H. Effective partial nitrification to nitrite by downflow hanging sponge reactor under limited oxygen condition. **Water Research**, 41: 295-302, 2007.

COMA, M., VERA-WATY, M., PIJUAN, M., YUAN, Z., BOND, P.L. Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. **Bioresource Technology**, 103: 101-108, 2012.

COSTA, T.B. **Desempenho de reator em batelada sequencial (RBS) com enchimento escalonado no tratamento de esgoto sanitário doméstico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2005.

CUERVO-LÓPEZ, F., HERNANDEZ, S.M., TEXIER, A.C., GOMEZ, J. Principles of denitrifying processes. In: CERVANTES (editor), F.J. **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution: Principles and Engineering**. London: IWA Publishing, 2009, p. 41-65.

DAIMS, H., MAIXNER, F., SCHMID, M.C. The nitrifying microbes: ammonia oxidizers, nitrite oxidizers, and anaerobic ammonium oxidizers. In: NIELSEN, P.H., DAIMS, H., LEMMER, H. **FISH handbook for biological wastewater treatment: identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH**. London: IWA Publishing, 2009, p. 9-17.

DANGCONG, P., BERNET, N., DELGENES, J. P., MOLETTA, R. Aerobic granular sludge – a case report. **Water Research**, 33(3): 890-893, 1999.

DAUDT, G.C. **Estudo da dinâmica de nitrogênio e da emissão de óxido nitroso (N₂O) em um reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios (RBSG) operado em escala piloto**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2015.

DE KREUK, M.K. **Aerobic granular sludge scaling up a new technology**. Ph.D. thesis, Delft University of Technology, Delft, The Netherland, 2006.

DE KREUK, M.K., BRUIN, L.M.M. **Aerobic granule reactor technology**. Water and Wastewater Practitioner Series, STOWA Report. London: IWA Publishing, 2004.

DE KREUK, M.K., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. **Biotechnology and Bioengineering**, 90: 761-769, 2005a.

DE KREUK, M.K., KISHIDA, N., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Aerobic granular sludge – state of the art. **Water Science and Technology**, 55 (8–9): 75-81, 2007a.

DE KREUK, M.K., KISHIDA, N., TSUNEDA, S., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. **Water Research**, 44: 5929-5938, 2010.

DE KREUK, M.K., MCSWAIN, B.S., BATHE, S., TAY, S.T.L., SCHWARZENBECK, N., WILDERER, P.A. Discussion outcomes. In: Aerobic granular sludge. **Water and Environmental Management Series**. London: IWA Publishing, 2005b, 155-169.

DE KREUK, M.K., PICIOREANU, C., HOSSEINI, M., XAVIER, J.B., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Kinetic model of a granular sludge SBR: influences on nutrient removal. **Biotechnology and Bioengineering**, 97: 801-815, 2007b.

DE KREUK, M.K., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. **Water Science and Technology**, 49 (11-12): 9-17, 2004

DE KREUK, M.K., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Formation of aerobic granules with domestic sewage. **Journal of Environmental Engineering**, 132 (6): 694-697, 2006.

DI BELLA, G., TORREGROSSA, M. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated

with high dissolved oxygen concentration. **Bioresource Technology**, 142: 706-713, 2013.

EKAMA, G.A., WENTZEL, M.C. Nitrogen Removal. In: HENZE, M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., EKAMA, G., BRDJANOVIC, D. **Biological wastewater treatment principles, modelling and design**. London: IWA Publishing, 2008, p. 87-138.

FERNANDES, H. **Estrutura da comunidade microbiana e sua influência no desempenho de reatores em bateladas sequenciais em escala real**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2013.

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

FIGUEROA, M., VAL DEL RÍO, A., CAMPOS, J.L., MOSQUERA-CORRAL, A., MÉNDEZ, R. Treatment of high loaded swine slurry in an aerobic granular reactor. **Water Science and Technology**, 63 (9): 1808-1814, 2011.

FIGUEROA, M., VAL DEL RÍO, A., CAMPOS, J.L., MÉNDEZ, R., MOSQUERA-CORRAL, A. Filamentous bacteria existence in aerobic granular reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, in press, 2014.

FLOWERS, J.J., HE, S., YILMAZ, S., NOGUERA, D.R., MCMAHON, K.D. Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different "*Candidatus Accumulibacter*" clades. **Environmental Microbiology Reports**, 1(6): 583-588, 2009.

GAO, D., LIU, L., LIANG, H., WU, W.M. Comparison of four enhancement strategies for aerobic granulation in sequencing batch reactors. **Journal of Hazardous Materials**, 186(1): 320-327, 2011.

GAO, S.Y., PENG, Y.Z., WANG, S.Y., BAI, L. Study of partial nitrification and simultaneous nitrogen removal under low dissolved oxygen condition. **Chinese High Technology Letters**, 16 (10): 1067-1072, 2006.

GERARDI, M. H. **Wastewater microbiology: nitrification and denitrification in the activated sludge process**. 1ª Edição. New York: John Wiley and Sons, 2002. 208 p.

GERARDI, M.H. **Wastewater Bacteria**. 1ª Edição. New Jersey: John Wiley and Sons, 2006. 267 p.

GERARDI, M. H. **Troubleshooting the sequencing batch reactor**. 1ª Edição. New Jersey: John Wiley and Sons, 2010. 216 p.

GIESEN, A., DE BRUIN, L.M.M., NIERMANS, R.P., VAN DER ROEST, H.F. Advancements in the application of aerobic granular biomass technology for sustainable treatment of wastewater. **Water Practice & Technology**, 8 (1): 47-54, 2013.

GRADY, C.P.L, DAIGGER, G.T., LIM, H.C. **Biological Wastewater Treatment**. 2ª Edição. Florida: Taylor & Francis Group. Boca Raton, 1999.

GUIMARÃES, L.B. **Dinâmica e funções de populações microbianas de lodo granular aeróbio no tratamento de esgoto doméstico**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, em andamento.

HE, S.B., XUE, G., WANG, B.Z. Factors affection simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, 168: 704-710, 2009.

HEIJNEN J.J., VAN LOOSDRECHT M.C.M. **Method for acquiring grain-shaped growth of a microorganism in a reactor**. European patent EP0826639, 1998.

HEIN DE CAMPOS, R. **Estudo da remoção de carbono e nitrogênio de efluentes urbanos em um reator de leito fluidizado operado em bateladas sequenciais**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2006.

HEIN DE CAMPOS, R. **Utilização de reator de leito fluidizado trifásico aeróbio em sistema de tratamento combinado de águas residuárias**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2001.

HELLINGA, C., SCHELLEN, A.A.J.C, MULDER, J.W., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J. The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium rich waste water. **Water Science and Technology** 37 (9): 135–42, 1998.

HENZE, M., GUJER, W., MINO, T. VAN LOOSDRECHT, M.C.M. **Activated sludge models: ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3**. London: IWA Publishing, 2000. 128 p.

HUANG, H.K., TSENG, S.K. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 55: 90-94, 2001.

IPCC. **Climate Change 2001: The Scientific Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

INSEL, G., ORHON, D., VANROLLEGHEM, P.A. Identification and modelling of aerobic hydrolysis – application of optimal experimental design. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 78: 437-445, 2003.

ISANTA, E., SUÁREZ-OJEDA, M.E., VAL DEL RÍO, A., MORALES, N., PÉREZ,J., CARRERA, J. Long term operation of a granular sequencing batch reactor at pilot scale treating a low-strength wastewater. **Chemical Engineering Journal**, 198-199: 163-170, 2012.

JEYANAYAGAM, S. True Confessions of the Biological Nutrient Removal Process. **Florida Water Resources Journal**, January 2005.

JOO, H.S., HIRAI, M., SHODA, M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification - aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 100 (2): 184-191, 2005.

JORDÃO, E.P., PESSÔA, C.A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 4.ed. Rio de Janeiro: ABES, 2005. 932 p.

JU, L.K., HUANG, L., TRIVEDI, H. Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in single-tank low-dissolved-oxygen systems under cyclic aeration. **Water Environment Research**, 79 (8): 912-920, 2007.

JUANG, Y.C., SUNIL, S.A., LEE, D.J., TAY, J.H. Stable aerobic granules for continuous-flow reactors: precipitating calcium and iron salts in granular interiors. **Bioresource Technology**, 101 (21): 8051-8057, 2010.

JUNGLES, M.K. **Desenvolvimento de grânulos aeróbios no tratamento de esgoto sanitário em reatores operados em bateladas sequenciais (RBS)**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2011.

KAPPELER, J., GUJER, W. Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modeling. **Water Science and Technology**, 25 (6): 125-140, 1992.

KIM, M., JEONG, S.Y., YOON, S.J., CHO, S.J., KIM, Y.H., KIM, M.J., RYU, E.Y., LEE, S.J. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 106 (5): 498-502, 2008.

KISHIDA, N., TSUNEDA, S., SAKAKIBARA, Y., KIM, J.H., SUDO, R. Real-time control strategy for simultaneous nitrogen and phosphorus removal using aerobic granular sludge. **Water Science and Technology**, 58 (2): 445-450, 2008.

- KOCH G., KÜHL, M., GUJER, W., SIEGRIST, H. Calibration and validation of activated sludge model no. 3 for Swiss municipal wastewater. **Water Research**, 34 (14): 3580-3590, 2000.
- KONG, Y., LIU, Y.Q., TAY, J.H., WONG, F.S., ZHU, J. Aerobic granulation in sequencing batch reactors with different reactor height/diameter ratios. **Enzyme and Microbial Technology**, 45: 379-383, 2009.
- KONNEKE, M., BERNHARD, A.E., DE LA TORRE, J.R., WALKER C.B., WATERBURY, J.B., STAHL, D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, 437 (7058): 543-546, 2005.
- KUBA, T., SMOLDERS, G., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. & HEIJNEN, J.J. Biological phosphorus removal from waste-water by anaerobic–anoxic sequencing batch reactor. **Water Science and Technology**, 27 (5–6): 241-252, 1993.
- LAMEGO NETO, L.G. **Tratamento de esgoto urbano em reator híbrido operado em bateladas sequenciais (RHBS) submetido a variações de cargas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2008.
- LEE, D.S., JEON, C.O., PARK, J.M. Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system. **Water Research**, 35 (16): 3968-3976, 2001.
- LEE, D.J., CHEN, Y.Y., SHOW, K.Y., WHITELEY, C.G., TAY, J.H. Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. **Biotechnology Advances**, 28: 919-934, 2010.
- LEE, J.K., LEE, K.H., YIM, S.B. Optimization of nitrogen removal in a sequencing batch reactor system by variation of the time distribution. **Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, 42 (11): 1655-1663, 2007.

LEMAIRE, R., WEBB, R., YUAN, Z. Micro-scale observation of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater. **The ISME Journal**, 2: 528-541, 2008.

LI, A.J., LI, X.Y., YU, H.Q. Aerobic sludge granulation facilitated by activated carbon for partial nitrification treatment of ammonia-rich wastewater. **Chemical Engineering Journal**, 218: 253-259, 2013.

LI, J., ELLIOTT, D., NIELSEN, M., HEALY, M.G., ZHAN, X. Long-term partial nitrification in an intermittently aerated sequencing batch reactor (SBR) treating ammonium-rich wastewater under controlled oxygen-limited conditions. **Biochemical Engineering Journal**, 55: 215-222, 2011.

LI, X.M., YANG, G.J., ZENG, G.M., LIAO, D.X., HU, M.F., WU, Y.M. Simultaneous phosphorus and nitrogen removal by aerobic granular sludge in single SBR system. In: **Aerobic Granular Sludge**. Water and Environmental Management Series. London: IWA Publishing, 2005, p. 71-78.

LI, Y., ZOU, J., ZHANG, L., SUN, J. Aerobic granular sludge for simultaneous accumulation of mineral phosphorus and removal of nitrogen via nitrite in wastewater. **Bioresource Technology**, 154: 178-184, 2014.

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

LIN, Y.M., LIU, Y.Q., TAY, J.H. Development and characteristics of phosphorus-accumulating microbial granules in sequencing batch reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 62: 430-435, 2003.

LIU, H., XIAO, H., HUANG, S., MA, H., LIU, H. Aerobic granules cultivated and operated in continuous-flow bioreactor under particle-size

selective pressure. **Journal of Environmental Sciences**, 26 (11): 2215-2221, 2014.

LIU, X.W., YU, H.Q, NI, B.J, SHENG, G.P. Characterization, modeling and application of aerobic granular sludge for wastewater treatment. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 113: 275-303, 2009.

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

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

LIU, Y., WANG, Z.W., QIN, L., LIU, Y.Q., TAY, J.H. Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 67: 26-32, 2005.

LIU, Y.Q., KONG, Y., TAY, J.H., ZHU, J. Enhancement of start-up of pilot-scale granular SBR fed with real wastewater. **Separation and Purification Technology** 82: 190-196, 2011.

LIU, Y.Q., MOY, B., KONG, Y., TAY, J.H. Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, 46 (6): 520-525, 2010b.

LIU, Y.Q., TAY, J.H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, 22: 533-563, 2004.

LIU, Y.Q., TAY, J.H. Variable aeration in sequencing batch reactor with aerobic granular sludge. **Journal of Biotechnology**, 124: 338-346, 2006.

LIU, Y.Q, TAY, J.H. Influence of cycle time on kinetic behaviors of steady-state aerobic granules in sequencing batch reactors. **Enzyme and Microbial Technology**, 41: 516-522, 2007.

LIU, Y.Q., TAY, J.H. The competition between flocculent sludge and aerobic granules during the long-term operation period of granular sludge sequencing batch reactor. **Environmental Technology**, 33 (23): 2619-2626, 2012.

LOCHMATTER, S., GONZALEZ-GIL, G., HOLLIGER, C. Optimized aeration strategies for nitrogen and phosphorus removal with aerobic granules sludge. **Water Research**, 47: 6187-6197, 2013.

LOCHMATTER, S., MAILLARD, J., HOLLIGER, C. Nitrogen removal over nitrite by aeration control in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 11, 6955-6978, 2014.

MAÑAS, A., BISCANS, B., SPÉRANDIO, M. Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process. **Water Research**, 45 (12): 3776-3786, 2011.

MARTINS, A.M.P., KARAHAN, O., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Effect of polymeric substrate on sludge settleability. **Water Research**, 45: 263-273, 2011.

MARTINS, A.M.P., PICIOREANU, C., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Three-dimensional dual-morphotype species modeling of activated sludge. **Environmental Science & Technology**, 38: 5632-5641, 2004.

MARTINS, C.L. **Comportamento de reator de leito fluidizado trifásico aeróbico utilizando diferentes materiais suporte**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2003.

MATSUO, T., HANAKI, K., TAKIZAWA, S., SATOH, H. **Advances in water and wastewater treatment technology: molecular**

technology, nutrient removal, sludge reduction and environmental health. Elsevier Science, 2001. 337 p.

MCSWAIN, B.S., IRVINE, R.L. Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. **Water Science & Technology**, 58 (4): 781-787, 2008.

METCALF & EDDY. **Wastewater engineering: treatment and reuse.** 4.ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 1819 p.

MISHIMA, K., NAKAMURA, M. Self-immobilization of aerobic activated sludge - a pilot study of the aerobic upflow sludge blanket process in municipal sewage treatment. **Water Science and Technology**, 23: 981–990, 1991.

MORALES, N., FIGUEROA, M., MOSQUERA-CORRAL, A., CAMPOS, J.L., MÉNDEZ, R. Aerobic granular-type biomass development in a continuous stirred tank reactor. **Separation and Purification Technology**, 89: 199-205, 2012.

MORGENROTH, E., KOMMEDAL, R., HARREMOËS, P., 2002. Processes and modeling of hydrolysis of particulate organic matter in aerobic wastewater treatment – a review. **Water Science and Technology**, 45 (6): 25-40, 2002.

MORGENROTH, E., SHERDEN, T., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., WILDERER, P.A. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. **Water Research**, 31: 3191-3194, 1997.

MOSQUERA-CORRAL, A., ARROJO, B., FIGUEROA, M., CAMPOS, J.L., MÉNDEZ, R. Aerobic granulation in a mechanical stirred SBR: treatment of low organic loads. **Water Science and Technology**, 64 (1): 155-161, 2011.

MUNCH, E.V., LANT, P., KELLER, J. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. **Water Research**, 30 (2): 277-284, 1996.

NAKANO, K., IWASAWA, H., ITO, O., LEE, T.J., MATSUMURA, M. Improved simultaneous nitrification and denitrification in a single reactor by using two different immobilization carriers with specific oxygen transfer characteristics. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 26: 141-145, 2004.

NEIWPCC - New England interstate water pollution control commission. **Sequencing batch reactor design and operational considerations**. September 2005.

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

NUNES, J.A. **Tratamento biológico de águas residuárias**. 2ª edição. Aracaju: Gráfica Editora J. Andrade. 2011, 273 p.

OEHMEN, A., LEMOS, P. C., CARVALHO, G., YUAN, Z., KELLER, J., BLACKALL, L.L., REIS, M.A.M. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. **Water Research**, 41 (11): 2271-2300, 2007.

OKABE, S., AOI, Y., SATOH, H., SUWA, Y. Nitrification in wastewater treatment. In: WARD, B.B., ARP, D.J., KLOTZ, M.G. **Nitrification**. Washington: ASM Press, 2011, p. 405-433.

ORHON, O., ÇOKGÖR, E.U. COD fractionation in wastewater characterization - the state of the art. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 68: 283-293, 1997.

OSELAME, M.C. **Simulação e calibração de reator em bateladas sequenciais (RBS) no tratamento de esgoto sanitário em escala real**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2013.

PARK, H.D., WELLS, G.F., BAE, H., CRIDDLE, C.S., FRANCIS, C.A. Occurrence of ammonia-oxidizing Archaea in wastewater

treatment plant bioreactors. **Applied and Environmental Microbiology**, 72 (8): 5643-5647, 2006.

PATUREAU, D., BERNET, N., BOUCHEZ, T., DABERT, P., DELGENES, J.P., MOLETTA, R. Biological nitrogen removal in a single aerobic reactor by association of a nitrifying ecosystem to an aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 5: 435-439, 1998.

PATUREAU, D., BERNET, N., MOLETTA, R. Combined nitrification and denitrification in a single aerated reactor using the aerobic denitrifier *Comamonas sp.* strain SGLY2. **Water Research**, 31 (6): 1363-1370, 1997.

PEYONG, Y.N., ZHOU, Y., ABDULLAH, A.Z., VADIVELU, V. The effect of organic loading rates and nitrogenous compounds on the aerobic granules developed using low strength wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, 67 (15): 52-59, 2012.

PIJUAN, M., WERNER, U., YUAN, Z. Reducing the startup time of aerobic granular sludge reactors through seeding floccular sludge with crushed aerobic granules. **Water Research**, 45: 5075-5083, 2011.

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

RAHIMI, Y., TORABIAN, A., MEHRDADI, N., SHAHMORADI, B. Simultaneous nitrification–denitrification and phosphorus removal in a fixed bed sequencing batch reactor (FBSBR). **Journal of Hazardous Materials**, 185 (2-3): 852-857, 2011.

REGINATTO, V., SCHMIDELL, W. Remoção biológica de fósforo. In: SCHMIDELL, W., SOARES, H.M., ETCHEBEHERE, C., MENES, R.J., BERTOLA, N.C., CONTRERAS, E.M. **Tratamento biológico de águas residuárias**. Florianópolis: Gráfica PaperPrint, 2007, p. 511-530.

RITTMANN, B.E., MCCARTY, P.L. **Environmental Biotechnology: principles and applications**. McGraw Hill, 2001.

ROBERTSON, L.A., VAN NIEL, E.W.J., TORREMAN, R.A.M., KUENEN, J.G. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. **Applied and Environmental Microbiology**, 54 (11): 2812-2818, 1988.

ROCKTASCHEL, T. **Treatment of municipal wastewater with aerobic granules - Influence of feeding strategies**. PhD Thesis. 2013.

ROCKTÄSCHEL, T., KLARMANN, C., OCHOA, J., BOISSON, P., SØRENSEN, K., HORN, H. Influence of the granulation grade on the concentration of suspended solids in the effluent of a pilot scale sequencing batch reactor operated with aerobic granular sludge. **Separation and Purification Technology**, 142: 234-241, 2015.

SALES, R. **Cinética de degradação de efluente têxtil por biofilme em leito fluidizado trifásico aeróbio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 1999.

SANT'ANNA JR., G.L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2010, 398 p.

SANTA CATARINA. **Lei n° 14.675**, de 13 de abril de 2009. Institui o Código Estadual do Meio Ambiente e estabelece outras providências.

SCHMIDELL, W., REGINATTO, V. Processos de eliminação de nitrogênio in tratamento biológico de águas residuárias. In: SCHMIDELL, W., SOARES, H.M., ETCHEBEHERE, C., MENES, R.J., BERTOLA, N.C., CONTRERAS, E.M. **Tratamento biológico de águas residuárias**. Florianópolis: Gráfica PaperPrint, 2007, p. 449-508.

SCHWARZENBECK, N., ERLEY, R., WILDERER, P.A. Aerobic granular sludge in an SBR-sytem treating wastewater rich in particulate matter. **Water Science & Technology**, 49 (11-12): 41-46, 2004.

SCHWARZENBECK, N., BORGES, J.M., WILDERER, P.A. Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing

batch reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 66: 711-718, 2005.

SHI, Y.J., WANG, X.H., YU, H.B., XIE, H.J., TENG, S.X., SUN, X.F., TIAN, B.H., WANG, S.G. Aerobic granulation for nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor and the emission of nitrous oxide. **Bioresource Technology** 102: 2536 - 2541, 2011.

SHOW, K.Y., LEE, D.J., TAY, J.H. Aerobic granulation: advances and challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 167: 1622-1640, 2012.

SINGH, M., SRIVASTAVA, R.K. Sequencing batch reactor technology for biological wastewater treatment: a review. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, 2010.

SOUTO, V.S. **Utilização de reatores híbridos de fluxo contínuo e em bateladas sequenciais para remoção conjunta de carbono e nitrogênio de esgoto urbano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2007.

SU, B., CUI, X., ZHU, J. Optimal cultivation and characteristics of aerobic granules with typical domestic sewage in an alternating anaerobic/aerobic sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, 110: 125-129, 2012.

SU, K.Z., YU, H.Q. Formation and characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor treating soybean-processing wastewater. **Environmental and Science Technology**, 39: 2818-2828, 2005.

TAY, J.H., LIU, Q.S., LIU, Y. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. **Journal of Applied Microbiology**, 91: 168-175, 2001.

TAYLOR, S.M., HE, Y., ZHAO, B., HUANG, J. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL. **Journal of Environmental Sciences**, 21 (10): 1336-1341, 2009.

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

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Nutrient control design manual: state of technology review report.** EPA/600/R-09/012, 2009.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Nutrient control design manual.** EPA/600/R-10/100, 2010.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Wastewater treatment fact sheet: external carbon sources for nitrogen removal.** EPA/832/F-13/016, 2013.

VAN DER ROEST, H. F., DE BRUIN, B., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., PRONK, W. Dutch sustainable Nereda technology takes an impressive step towards maturity. **11th IWA Specialised Conference on Design, Operation and Economics of large wastewater treatment plants.** 4-8 September, 2011. Budapest, Hungary. 177-182, 2011.

VAN HAANDEL, A.C., KATO, M., VON SPERLING, M. Remoção biológica de nitrogênio: aplicações para o sistema de lodo ativado. In: MOTA, F.S.B., VON SPERLING, M. **Nutrientes de esgoto sanitários: utilização e remoção.** Rio de Janeiro: ABES, 2009a. p. 174-226.

VAN HAANDEL, A.C., GIRARD, L., MENDONÇA, N., TEIXEIRA, M., VON SPERLING, M. Remoção biológica de fósforo: mecanismos e configurações. In: MOTA, F.S.B., VON SPERLING, M. **Nutrientes de esgoto sanitários: utilização e remoção.** Rio de Janeiro: ABES, 2009b. p. 227-261.

VAN HULLE, S.W.H., VOLCKE, E.I.P., TERUEL, J.L., DONCKELS, B., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., VANROLLEGHEM, P.A. Influence of temperature and pH on the kinetics of the SHARON

nitritation process. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology** 82 (5): 471 - 480, 2007.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M., BRDJANOVIC, D. Anticipating the next century of wastewater treatment. **Science**, 344 (6191): 1452-1453. 2014.

VÁZQUEZ-PADÍN, J.R., MOSQUERA-CORRAL, A., CAMPOS, J.L., MÉNDEZ, R., CARRERA, J., PÉREZ, J. Modelling aerobic granular SBR at variable COD/N ratios including accurate description of total solids concentration. **Biochemical Engineering Journal**, 49: 173-184, 2010.

VLAEMINCK, S. E., CLOETENS, L. F. F., DE CLIPPELEIR, H., CARBALLA, M., VERSTRAETE, W. Granular biomass capable of partial nitritation and anammox. **Water Science and Technology**, 59 (3): 606-617, 2009.

VOGEL. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 488 p.

VON SPERLING, M. **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, 2002. 428 p.

VON SPERLING, M. **Biological Wastewater Treatment. Volume 2: basic principles of wastewater treatment**. London: IWA Publishing, 2007. 195 p.

WAGNER, J. **Desenvolvimento de grânulos aeróbios e tratamento de esgoto doméstico em um reator em bateladas sequenciais (RBS) sob diferentes condições operacionais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2011.

WAGNER, J., COSTA, R.H.R. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor using real domestic wastewater. **Journal of Environmental Engineering**, 139: 1391-1396, 2013.

WAGNER, J., PACHECO, R.M., BATTISTELLA, J.A.C., COSTA, R.H.R. The formation of aerobic granules in a sequencing batch reactor (SBR) using domestic wastewater. In: **IWA World Water Congress**, IWA, Montreal, Canada, 2010.

WAGNER, J., WEISSBRODT, D.G., MANGUIN, V., COSTA, R.H.R., MORGENROTH, E., DERLON, N. Effect of particulate organic substrate on aerobic granulation and operating conditions of sequencing batch reactors. **Water Research**, submetido.

WAN, C., YANG, X., LEE, D.J., LIU, X., SUN, S. Partial nitrification using aerobic granule continuous-flow reactor: operations and microbial community. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 45 (5): 2681-2687, 2014.

WAN, J., BESSIÈRE, Y., SPÉRANDIO, M. Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate. **Water Research**, 43 (20): 5097-5108, 2009.

WANG, F., LU, S., WEI, Y., JI, M. Characteristics of aerobic granule and nitrogen and phosphorus removal in a SBR. **Journal of Hazardous Materials**, 164: 1223-1227, 2009.

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

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

WANG, S.G., LIU, X.W., GONG, W.X., GAO, B.Y., ZHANG, D.H., YU, H.Q. Aerobic granulation with brewery wastewater in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, 98: 2142-2147, 2007.

WANG, X.H., JIANG, L.X., SHI, Y.J., GAO, M.M., YANG, S., WANG, S.G. Effects of step-feed on granulation processes and nitrogen removal performances of partial nitrifying granules. **Bioresource Technology**, 123: 375-381, 2012.

WEF - WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Biological nutrient removal (BNR) operation in wastewater treatment plants**. Alexandria: Mc Graw Hill, 2005. 643 p.

WEF - WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Nutrient Removal**. Alexandria: Mc Graw Hill, 2010. 676 p.

WEISSBRODT, D.G., HOLLIGER, C., MORGENROTH, E. Modelling bacterial selection during the plug-flow feeding phase of aerobic granular sludge reactors operated for biological dephosphatation. In: NOPENS et al. (eds.), **Proceedings of the 4th IWA/WEF Wastewater Treatment Modelling Seminar (WWTmod)**, Spa, Belgium, 322-325, 2014.

WEISSBRODT, D.G., LOCHMATTER, S., EBRAHIMI, S., ROSSI, P., MAILLARD, J., HOLLIGER, C. Bacterial selection during the formation of early-stage aerobic granules in wastewater treatment systems operated under wash-out dynamics. **Frontiers in Microbiology**, 3: 332, 2012.

WENTZEL, M.C., LOTTER, L.H., EKAMA, G.A., LOEWENTHAL, R.E., MARAIS, G.V.R. Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal. **Water Science and Technology**, 23 (4-6): 567-576, 1991.

WIESMANN, U., CHOI, I.S., DOMBROWSKI, E.M. **Fundamentals of Biological Wastewater Treatment**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 392 p.

WOLFF, D.B. **Estudo da tratabilidade de um efluente têxtil por biomassa fixa através de um reator de leito fluidizado trifásico aeróbio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 1997.

WOLFF, D.B. **Remoção biológica de carbono e nitrogênio de esgoto urbano em reatores híbridos utilizando dois materiais suporte flutuantes**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2005.

WUNDERLIN, P., MOHN, J., JOSS, A., EMMENEGGER, L., SIEGRIST, H. Mechanisms of N₂O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. **Water Research**, 46: 1027-1037, 2012.

XU, G., XU, X., YANG, F., LIU, S. Selective inhibition of nitrite oxidation by chlorate dosing in aerobic granules. **Journal of Hazardous Materials**, 185: 249–254, 2011.

YOO, H., AHN, K.H., LEE, H.J. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. **Water Research**, 33 (1): 145-154, 1999.

YU, X., WANA, C., LEI, Z., LIU, X., ZHANG, Y., LEE, D.J., TAY, J.H. Adsorption of ammonium by aerobic granules under high ammonium levels. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 45 (1): 202-206, 2014.

YUAN, X., GAO, D. Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor. **Journal of Hazardous Materials**, 178: 1041-1045, 2010.

ZENG, W., ZHANG, Y., LI, L., PENG, Y.Z., WANG, S.Y. Control and optimization of nitrifying communities for nitrification from domestic wastewater at room temperatures. **Enzyme Microbiology and Technology**, 45: 226-232, 2009.

ZHANG, Y., SHI, Z., CHEN, M., DONG, X., ZHOU, J. Evaluation of simultaneous nitrification and denitrification under controlled conditions by an aerobic denitrifier culture. **Bioresource Technology**, 175: 602-605, 2015.

ZHENG, Y.M., YU, H.Q., LIU, S.J., LIU, X.Z. Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. **Chemosphere**, 63 (10): 1791-1800, 2006,

ZHOU, D., NIU, S., XIONG, Y., YANG, Y., DONG, S. Microbial selection pressure is not a prerequisite for granulation: dynamic granulation and microbial community study in a complete mixing bioreactor. **Bioresource Technology**, 161: 102-108, 2014.

ZHU, L., DAI, X., LV, M., XU, X. Correlation analysis of major control factors for the formation and stabilization of aerobic granule. **Environmental Science and Pollution Research**, 20 (5): 3165-3175, 2013.

ZOU, S., YAO, S., NI, J. High-efficient nitrogen removal by coupling enriched autotrophic-nitrification and aerobic-denitrification consortiums at cold temperature. **Bioresource Technology**, 161: 288-296, 2014.