

Lorena Bittencourt Guimarães

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LODO
GRANULAR NA REMOÇÃO DE NUTRIENTES E POTENCIAL
DE RECUPERAÇÃO DE EXOPOLÍMEROS DE EFLUENTES
EM REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS**

**MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF GRANULAR
SLUDGE FOR NUTRIENT REMOVAL AND POTENTIAL OF
EXOPOLYMER RECOVERY FROM EFFLUENTS IN
SEQUENCING BATCH REACTORS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientadora:

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

Coorientador:

Prof. Dr. David Gregory Weissbrodt

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Guimarães, Lorena
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LODO GRANULAR NA
REMOÇÃO DE NUTRIENTES E POTENCIAL DE RECUPERAÇÃO DE
EXOPOLÍMEROS DE EFLUENTES EM REATORES EM BATELADAS
SEQUENCIAIS / Lorena Guimarães ; orientador,
Rejane Costa; coorientador, David Weissbrodt - SC,
2017.
261 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Lodo granular. . 3.
Comunidade microbiana. 4. Remoção de nutrientes. 5.
Recuperação de exopolímeros do tipo alginato. I.
Costa, Rejane. II. Weissbrodt, David. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.



TERMO DE APROVAÇÃO

“Caracterização Microbiológica do Lodo Granular na Remoção de Nutrientes e Potencial de Recuperação de Exopolímeros de Efluentes em Reatores em Bateladas Sequenciais”

Lorena Bittencourt Guimarães

A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de “Doutora em Engenharia Ambiental”.

Florianópolis, 17 de março de 2017.

Aprovado por:



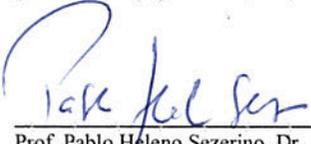
Prof.ª Rejane Helena Ribeiro da Costa, Dr.ª
(Orientadora)



Prof. David Gregory Weissbrodt, Dr.
(Coorientador) (Videoconferência)



Prof.ª Cátia Regina S. de Carvalho Pinto, Dr.ª



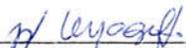
Prof. Pablo Heleno Sezerino, Dr.



Prof. Paulo Belli Filho, Dr.



Prof.ª Juliana Calábria de Araújo, Dr.ª



Prof.ª Maria de Lourdes F. dos Santos, Dr.ª
(Videoconferência)



Prof.ª Maria Eliza Nagel Hassemer, Dr.
(Coordenadora)

Este trabalho é dedicado ao meu irmão
José Roberto Guimarães Júnior, meu
maior parceiro e meu eterno amor.
(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos se iniciam direcionados às três instituições de ensino Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Universidade Técnica de Delft (TU Delft) e Universidade de Aalborg (AAU), as quais me proporcionaram uma formação acadêmica de alto nível. Junto à estas, agradeço as instituições financiadoras CNPq, CAPES, FAPESC, FINEP, NSF, que tornaram possível o desenvolvimento da pesquisa de doutorado.

Agradecimentos seguem também aos laboratórios contribuintes com esta pesquisa. Ao laboratório integrado de meio ambiente (LIMA) da UFSC pelo suporte nas análises físico-químicas. Ao laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC pela realização das análises de granulometria. Aos laboratórios LAMEB e LCME da UFSC, pelas análises microscópicas.

Agradeço aos membros da banca e professores Maria de Lourdes Florêncio dos Santos, Juliana Calábria de Araújo, Paulo Belli Filho, Pablo Heleno Sezerino e Cátia Regina S. de Carvalho Pinto pela leitura e pelas contribuições para esta tese.

Quanto às pessoas que participaram da minha formação, tenho minha maior gratidão à minha orientadora Rejane Helena Ribeiro da Costa. Esta grande mulher esteve ao meu lado me guiando em diferentes tipos de situações, sendo meu maior apoio na UFSC e me ensinando a acreditar em mim mesma. Com seu jeito prático e muito presente, aprendi com este exemplo de ser humano a encarar as circunstâncias da vida de uma maneira mais leve. Rejane, agradeço muito a confiança depositada em mim, desde o convite ao doutorado, passando pela grande responsabilidade de carregar o nome da senhora e do grupo para fora do país, até ao fechamento deste documento e aos próximos passos que ainda daremos juntas.

Meu grande agradecimento ao meu coorientador David G. Weissbrodt. David me abriu as portas e me orientou durante minha formação internacional. Com ele aprendi o rigor com a escrita e com a ciência, além da grande importância das contribuições com outros pesquisadores. Tivemos longas, bem longas reuniões, eu com sede de aprender e David sempre com muita disposição de ensinar e discutir a pesquisa e a vida acadêmica. David teve muita paciência com minhas limitações e acompanhou meu desenvolvimento, afinal no início eu gravava nossas reuniões e depois precisava ouvir algumas vezes a gravação e estudá-la em casa para entender tudo o que havia sido falado.

Obrigada por sua impactante contribuição, da qual atingimos ótimos resultados!

My great acknowledgement to my co-advisor David G. Weissbrodt. David opened the international doors to me and guided me during my one year abroad experience. With him I learned the writing and science, and the great importance of contributions with other researchers. We had long, very long meetings, as a result of my thirsty to learn and David always with a lot of willingness to teach and discuss research and academic life. David had a lot of patience with my limitations and followed my development, after all at the beginning I needed to record our meetings and then had to listen to the recording sometimes and study it at home to understand everything that had been said. Thanks for your impacting and inspiring contribution with great achievements!

Agradeço aos professores Mark van Loosdrecht e Per Nielsen pela aconchegante e enriquecedora hospitalidade em seus grupos de pesquisa. Estas grandes personalidades, mundialmente reconhecidas, são seres humanos admiráveis pela simplicidade de viver e de lidar com todos ao seus arredores. Foi uma honra trabalhar com vocês e com suas equipes.

I appreciate professors Mark van Loosdrecht and Per Nielsen for their warm and enriching hospitality in their research groups. These great personalities, world-renowned in water and microbiology research area, are admirable human beings for the simplicity of living and dealing with all of their surroundings. It was an honor to work with you and your teams.

Meus agradecimentos seguem para à todos os integrantes do grupo EBT em Delft. Aos meus colegas de sala Maaïke, Mario Pronk e especialmente à Yuemei Lin, quem me ajudou com muitos conselhos para a adaptação em Delft, me ajudou muito com todas as análises dos exopolímeros e que foi uma grande amiga. Agradeço também ao Jure pelas conversas e ajudas nas análises dos exopolímeros. O meu muito obrigada aos técnicos de laboratório Udo, Ben, Cor, especialmente ao Mitchell, por me ajudar com muita competência com os reatores enquanto estive fora e pela grande amizade. Agradeço ao Laurens Welles pelas discussões sobre PAO e ao Khaled pela imensa ajuda no laboratório e na coleta de grânulos na estação de Groningen em um dos dias que mais senti frio na vida. Agradeço aos meus amigos Simon, Mônica, Marissa, Leoni, Emma, Leonor, Stefani, Jules, Eveline, Emmanoli, Bart, Jelmer, Herber, e ao Danny pelos momentos divertidos e com as ajudas no laboratório. Agradeço em especial à Nina Gubser por

todos os ensinamentos sobre os reatores e análises e pela parceria de trabalho no mesmo projeto, além das divertidas horas de lazer juntas.

My thanks go to all members of the EBT Group in Delft. To my classmates, Maaïke, Mario Pronk and especially Yuemei Lin, who helped me with many advices about adaptation in Delft, with all exopolymers analysis and was a great friend. Thanks also to Jure for the conversations and exopolymers analysis. My thanks to the lab technicians Udo, Ben, Cor, especially Mitchell, for the tremendous help with the reactors and for the friendship. Thanks to Laurens Welles for discussions about PAO and Khaled for the immense help in the laboratory and granules collecting at Groningen Plant in on one of the coldest days of my life. I thank my friends Simon, Monica, Marissa, Leoni, Emma, Leonor, Stefani, Jules, Eveline, Emmanole, Bart, Jelmer, Herber, and Danny for the funny moments and help in the lab. Thanks in particular to Nina Gubser for all reactors and analyzes teachings and the partnership in the same project, besides the fun hours of leisure together.

Agradeço a toda equipe do grupo EB de AAU, especialmente à Marta pela grande ajuda à minha chegada em Aalborg e à Jannie por dividir aquela silenciosa sala com seu aconchegante sorriso e cheiro de café. Agradeço às técnicas Jannie and Marianne, ao Simon pela ajuda com FISH e à Bianca, Kamila e Nadie pela amizade. Agradeço pela contribuição de Mads nas análises de sequenciamento, bioinformática e discussões sobre meu tema de doutorado.

I thank the entire team of the EB group of AAU, especially Marta for great help on my arrival in Aalborg and Jannie for sharing that quiet room with her warm smile and smell of her coffee. I appreciate the technicians Jannie and Marianne. I really appreciate Simon for help with FISH and Bianca, Kamila and Nadie for the friendship. I am grateful for Mads's contribution to sequencing, bioinformatics, and discussions on my doctoral topic.

Eu agradeço à equipe de grânulos do LABEFLU. Jamile Wagner e Tiago Akaboci me ajudaram a dar os primeiros passos no assunto, dando risada quando eu ainda chamava lodo de fezes, e me ajudando muito com os cuidados com nosso Bob (nosso reator piloto de grânulos). Mas, meu principal agradecimento foi à grande amizade que ficou entre nós, amizade que não há oceano que separe. Agradeço ao Gilberto Daudt pela parceria durante o período experimental e dados coletados para esta tese. Dividimos a responsabilidade do reator e juntos passamos por frustrações com problemas no sistema e alegrias a cada grânulo formado! Meu grande agradecimento vai também aos bolsistas de

iniciação científica: Maurício de Jesus, Ana Clara Neves, Alan Guimarães, Jéssica Prats, Marina Strossi e Ademir Degering. Foram muitas coletas, análises e trabalho que eu não conseguiria fazer sem vocês. Muito obrigada meus queridos!

À todos da equipe LABEFLU o meu muito obrigada. Ao Rodrigo pelas conversas enriquecedoras de café, à Helô pelos ensinamentos de microbiologia, à Cláudia pelos ensinamentos burocráticos de gestão de projetos, à Vivi que na sua quietude e silêncio mostra a sua grandeza e amizade, à Dani pela parceria com a biologia molecular, ao Jorge pela grande amizade e apoio, e às mais fofas mestradas e amigas Bruna, Jéssica (quase doutoranda), Katiane e Maria Joana, vocês deixaram meu último ano de doutorado mais divertido meninas! Muito obrigada equipe!

Agradeço à Melissa Mezzari, quem desde o Mestrado me acompanha e me ajuda em minha formação profissional.

Ao amigos brasileiros na Holanda, Wesley, Philipe Hanna e família, Ismael e Camila eu agradeço por muitas ajudas, momentos de descontração e pela amizade.

Meus agradecimentos à minha querida Louise, que além de uma grande amiga, foi aquela holandesa de referência para as muitas dúvidas que surgiram durante o ano em Delft.

My thanks to my dear Louise, who, besides a great friend, was the Dutch person of reference for the many doubts that arose during the year in Delft.

Agradeço aos amigos do PPGEA: Tiago Belli, Cássio, Edivan, Edvaldo (não é PPGEA, mas é quase), Gui, Hugo e Henrique pelos vários momentos divertidos.

Deixo como um agradecimento especial ao meu amigo Wanderli Leite. O destino nos apresentou desde o primeiro dia em que chegamos a Florianópolis, uma de Minas e o outro lá do Pará para seguir um caminho bem parecido. Nossa caminhada desde 2009, passando por mestrado e doutorado nos fez enfrentar muitas felicidades e muitas dores juntos, das quais resultaram na nossa irmandade incondicional. É meu irmão, mesmo longe estamos perto, sem palavras para agradecer à vida por ter colocado alguém tão especial como você no meu caminho. Me aguarde que logo apareço para dançar um frevo com você em Recife!

Agradeço à longa e sólida amizade que se iniciou na graduação de Fernanda Parolin, Paula Castelo Branco e Carol. E também agradeço à cumplicidade de todas as minhas amigas Araxaenses.

Deixo também o meus agradecimentos às amigas *nerds* de Florianópolis: Débora, Juliana, Karina, Franciele e Isabela. Aquelas

estão no meu dia-a-dia e que presenciam a Lorena de todos os dias, me amando e me respeitando na minha maneira de ser. Delícia são os momentos com vocês minhas lindas! Junto às nerds, meus agradecimentos inclui minha amiga argentina quase brasileira Pilar, por dividir tantos momentos comigo e pela leveza e liberdade em nossa amizade.

Agradeço à Márcia Michele e família, por serem o meu porto seguro em Florianópolis. Agradeço pela clareza e integridade de nossa amizade.

Agradeço imensamente a Guilherme e Sônia de Domenico pelo carinho, companheirismo, e cuidado comigo nos momentos que mais precisei. Vocês foram grandes parceiros na minha caminhada de vida.

Agradeço à minha família Bittencourt e à Guimarães pelo amor, união e equilíbrio durante toda minha vida.

Agradeço a minha irmã de criação Noeme, pela pureza de nossa relação com o mais sincero sentimento de amor. Agradeço por sua paciência e pelas incontáveis ajudas desde que me lembro por gente.

Qualquer palavra de agradecimento é muito pequena e insignificante para expressar o quanto sou grata aos meus pais, Dóris e José Roberto. São eles que me apoiam incondicionalmente, que me incentivam a voar, e que me aterrizam em minha base e em minha essência. São os pais que mesmo vivendo na dor da saudade imposta por uma distância imensurável, estão de cabeça erguida sendo os meus grandes exemplos de força e de determinação. O meu eterno obrigada por me apoiarem nesta conquista!

Por fim agradeço ao meu irmão, José Roberto, por ser o meu maior orgulho, a minha maior inspiração e a minha maior fonte de força. Agradeço ao apoio que me deu durante o doutorado e ao seu imenso companheirismo. Porém, a vida nos impôs no meio desta minha caminhada um inesperado desafio, o qual tornou nossa parceria invisível, mas não menos intensa. Hoje agradeço ao meu anjo Zé, por me iluminar e me proteger nas adversidades desta vida.

“Don’t worry about a thing,
cause every little thing
gonna be alright”

(Bob Marley, 1977)

RESUMO

A tecnologia de lodo granular desenvolvida em reatores em bateladas sequenciais (RBS) é uma nova geração de processo alternativa aos lodos ativados para tratamento de águas residuárias. Porém, estudos utilizando esgoto real destacaram dificuldades para alcançar estabilidade dos grânulos e completa remoção de nutrientes. Além disso, atualmente existe a demanda pelo desenvolvimento de tecnologias inovadoras e sustentáveis que alcancem além da proteção ambiental, a recuperação de recursos, a eficiência energética e espacial. Neste contexto, os objetivos desta tese de doutorado foram (i) identificar o papel da comunidade microbiana para sustentar granulação, remoção de nutrientes e formação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), e (ii) investigar o potencial de biorrefinaria de exopolímeros do tipo alginato, em sistemas de tratamento de esgoto sanitário utilizando lodo granular. No primeiro estudo da tese (§ 4.1), as investigações iniciaram-se com a granulação e remoção de nitrogênio em um RBS piloto, tratando esgoto sanitário (0,6-1,0 g DQO_{solúvel} L⁻¹ d⁻¹). Os grânulos formados (300 µm) eram compostos por protozoários e bactérias, com predominância de organismos oxidante de amônia (AOB) nas camadas externas do grânulo. A nitrificação parcial foi a principal via metabólica da conversão de nitrogênio. As rotas de desnitrificação via nitrito, desnitrificação autotrófica, desnitrificação completa e incompleta também foram verificadas, com moderadas emissões de N₂O (2,8 % da carga total de nitrogênio afluente). No segundo estudo da tese (§ 4.2), o desempenho da granulação e da remoção de nutrientes foram comparadas entre dois regimes de enchimento: rápido (estratégia operacional EO1: 18 L min⁻¹) e lento (estratégia operacional EO2: 3,5 L min⁻¹), em um RBS piloto com esgoto sanitário. O enchimento lento foi benéfico para formar grânulos maiores, para aumentar a fração de grânulos no lodo e para melhorar a sedimentabilidade (EO1: 290 µm, 55% grânulos, 109 mL g_{SST}⁻¹; EO2: 450 µm, 78%, 74 mL g_{SST}⁻¹). O lento enchimento em EO2 também foi vantajoso para a hidrólise da matéria orgânica particulada, no acúmulo de biomassa (0,7 g_{SSV} L⁻¹ em EO1 e 1,5 g_{SSV} L⁻¹ em EO2) e na remoção de fósforo (33% em EO1 e > 97,5% em EO2 a partir de 165 dias). Porém, em ambas EO a biomassa não se acumulou substancialmente e houve o acúmulo de nitrito no sistema. Estas falhas de processo foram relacionadas com a configuração do ciclo do RBS e aos micro-organismos selecionados pela operação. Os organismos heterotróficos ordinários (OHO) de crescimento rápido foram predominantes em ambas EO (30% *Thauera* em EO1; 56%

Comamonas em EO2). As populações afiliadas à *Rhodocyclaceae*, como o gênero *Thauera*, contribuíram positivamente para a granulação nas condições operacionais utilizadas para a remoção de C-N (EO1), porém resultou na formação de grânulos irregulares, levando à desintegração dos grânulos após 274 dias em EO1. Por outro lado, no terceiro estudo da tese (§ 4.3), a aplicação de condições de seleção de organismos acumuladores de poli-fosfato (PAO) de crescimento lento do gênero “*Candidatus Accumulibacter*” (também membro da família *Rhodocyclaceae*) em um RBS de bancada, resultou em granulação robusta, demonstrando uma relevante diferença no impacto, a nível de gênero, no desempenho da estabilidade. O quarto estudo desta tese (§ 4.4), revelou que condições de aumento gradual da carga orgânica ($0,3$ a $2,0$ g DQO_{acetato} dia⁻¹ L⁻¹), razão C:P ($8-16$ g DQO g⁻¹P), e razão Ca:Mg ($0,37-1$ mol Ca mol⁻¹ Mg), levaram à elevada seleção de “*Ca. Accumulibacter*” (máximo 83% de contagem de leitura total) em condições ambientais de pH 7,5 e 18 °C, e sustentaram a formação de substancial fração em massa de exopolímero no lodo granular (máximo $0,53$ g ST_{EPS} g⁻¹ SV_{bm}). O exopolímero extraído do lodo granular apresentou um comportamento reológico típico de alginato. Em conclusão, a seleção de PAO por meio da gestão da operação do reator leva à efetiva coesão dos grânulos, promove remoção de fósforo e sustenta a produção de biopolímeros de elevado valor agregado ao interesse industrial, inserindo, portanto, a tecnologia de lodo granular na economia circular.

Palavras-chave: Lodo granular. Comunidade microbiana. Estabilidade granular. Remoção de nutrientes. Recuperação de exopolímeros. Biomateriais do tipo alginato.

ABSTRACT

The granular sludge technology developed in sequential batch reactors (SBR) is a new-generation process alternative to activated sludge, and is being considered as standard for the intensification of biological nutrient removal (BNR) from wastewater. However, studies using real sewage have highlighted difficulties to achieve granules stability and complete nutrient removal. In addition, there is a demand for the development of innovative and sustainable technologies that achieve besides environmental protection, resource recovery and efficiency on energy and space. In this context, the doctoral thesis aimed (i) to clarify the role of microbial communities to sustain granulation, nutrient removal, and formation of extracellular polymeric substances (EPS), and (ii) to investigate the biorefinery potential of alginate-like exopolymers in sanitary wastewater treatment systems using granular sludge. Investigations began in the first research chapter (§ 4.1) with the study of granulation and nitrogen removal in a pilot SBR treating sanitary wastewater (0,6-1,0 g DQO_{soluble} L⁻¹ d⁻¹). The granules formed (300 µm) were composed of protozoa and bacteria, with predominance of ammonia oxidizing organisms (AOB) in the outer layers of granules. Partial nitrification was the main metabolic pathway of nitrogen conversion. Nitrogen conversion routes as denitrification via nitrite, autotrophic denitrification, complete and incomplete denitrification were also verified, with moderate emission of N₂O (2.8 % of total nitrogen influent). In the second research chapter (§ 4.2), granulation and nutrient removal performances were compared between two feeding regimes: rapid (operational strategy OS1: 18 L min⁻¹) and slow (operational strategy OS2: 3.5 L min⁻¹), in the pilot SBR fed with sanitary sewage. The slow feeding was beneficial to form bigger granules and to increase the fraction of granules in the sludge and to improve their settling performance (OS1: 290 µm, 55% granules, 109 mL g_{TSS}⁻¹; OS2: 450 µm, 78%, 74 mL g_{TSS}⁻¹). The slow OS2 was also advantageous for the hydrolysis of particulate organic matter, the accumulation of biomass (0.7 g_{VSS} L⁻¹ under OS1 and 1.5 g_{VSS} L⁻¹ under OS2), and the removal of phosphorus (33% under OS1 and > 97.5% under OS2 from 165 days onward). However, under both OS the biomass did not accumulate substantially and nitrite accumulated in the system. These process failures were related to the SBR configuration cycle and to the microorganisms selected by the operation. Fast-growing ordinary heterotrophic organisms (OHO) were predominant under both OS (30% *Thauera* under OS1 and 56% *Comamonas* under OS2). *Rhodocyclaceae*

populations, such as the *Thauera* genus, positively contributed to granulation under C-N removal conditions (OS1), but resulted in the formation of irregular granules, leading to granules disintegration after 274 days under OS1. On the other hand, in the third research chapter (§ 4.3), the application of conditions selecting for slow-growing polyphosphate-accumulating organisms (PAO) affiliating with the genus "*Candidatus Accumulibacter*" (also a member of the *Rhodocyclaceae* family) in a bench-scale SBR resulted in robust granulation, demonstrating a significant difference on the impact of the genus level on the granulation performance. The fourth and last research chapter (§ 4.4) revealed that conditions of gradual increase in organic load (0.3 a 2.0 g COD_{acetate} dia⁻¹ L⁻¹), C:P ratio (8 - 16 g COD g⁻¹ P), and Ca:Mg ratio (0.37 - 1 mol Ca mol⁻¹ Mg) highly selected for "*Ca. Accumulibacter*" (maximum 83% of amplicon sequencing read count) under environmental conditions of pH 7.5 and 18°C, and sustained the formation of a substantial mass fraction of exopolymers in the granular sludge (maximum 0.53 g TS_{EPS} g⁻¹ VS_{bm}, 0.40 g VS_{EPS} g⁻¹ VS_{bm}). The exopolymer extracted from granular sludge presented the typical rheological behavior of alginate biomaterials. In conclusion, PAO selection through reactor operation management leads to an effective granule cohesion, promotes phosphorus removal, and sustains the production of high-value biopolymers of industrial interest for the civil engineering and coating industries, thus incorporating the granular sludge technology in the circular economy.

Keywords: Granular sludge. Microbial community. Granule stability. Nutrient removal. Exopolymer recovery. Alginate-like biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA GERAL DA TESE.....	42
FIGURA 2: ESQUEMA ILUSTRATIVO DE UM PROCESSO DE LODO ATIVADO CONVENCIONAL	46
FIGURA 3: ESQUEMA ILUSTRATIVO DO FUNCIONAMENTO DE UM REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS.....	49
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE GRÂNULOS AERÓBIOS E DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS EM CADA ETAPA.	54
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE GRÂNULOS AERÓBIOS FORMADOS QUANDO CULTIVADOS EM SUBSTRATO CONTENDO MATERIAL PARTICULADO.....	55
FIGURA 6: DIFERENÇA ESTRUTURAL ENTRE A) LODO FLOCULENTO E B) LODO GRANULAR AERÓBIO.....	59
FIGURA 7: DISTRIBUIÇÕES NO LGA DE PROTEÍNAS, LIPÍDIOS, A- E B-POLISSACARÍDEOS, CÉLULAS E CÉLULAS MORTAS.(A) PROTEÍNAS EM VERDE; (B) LIPÍDEOS EM AMARELO; (C) A-POLISSACARÍDEO EM AZUL CLARO; (D) CÉLULAS TOTAIS EM VERMELHO; (E) CÉLULAS MORTAS EM VIOLETA; (F) B-POLISSACARÍDEOS EM AZUL ESCURO.	60
FIGURA 8: ILUSTRAÇÕES DAS ESTRUTURAS PROPOSTAS DOS EXOPOLISSACARÍDEOS DO LODO GRANULAR AERÓBIO. (A) ESTRUTURA DO ALGINATO E SEUS MONÔMEROS COMO SENDO SIMILAR AOS DOS EXOPOLISSACARÍDEOS DO LGA, O QUAL SE COMPORTOU COMO ESTE POLÍMERO, CONHECIDO COMO <i>ALE</i> PROPOSTO POR (LIN ET AL., 2008); (B) ESTRUTURA DO <i>GRANULAN</i> PROPOSTA POR (SEVIOUR ET AL., 2010B).	62
FIGURA 9: CONVERSÕES BIOLÓGICAS DO NITROGÊNIO. ETAPAS DE 1 A 3 COMPREENDEM NA NITRIFICAÇÃO E ETAPAS DE 4 A 7 NA DESNITRIFICAÇÃO.....	64
FIGURA 10: MODELO CONCEITUAL DOS PRINCIPAIS PROCESSOS BIOLÓGICOS NA REMOÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO EM LODO GRANULAR AERÓBIO. ESTRUTURAS DE BIOFILME PODEM SER MAIS COMPLEXAS ACOMPANHADAS DO MUITAS OUTRAS ROTAS METABÓLICAS.....	70
FIGURA 11: METABOLISMO ANAERÓBIO E AERÓBIO DE PAO E PAO. ...	73
FIGURA 12: PERFIS DE AGV, AMÔNIA, NITRATO E FOSFATO NO MEIO LÍQUIDO; E PERFIS DE PHA E BIOMASSA NO LODO.....	76
FIGURA 13: MODELO CONCEITUAL DO ECOSISTEMA BACTERIANO DE SISTEMA RBS-LGA OPERADO SOB REGIME ANAERÓBIO-AERÓBIO PARA COMPLETA REMOÇÃO DE NUTRIENTES. PROCESSOS DE	

CONVERSÃO BACTERIANA ESTÃO REPRESENTADOS POR SETAS ESPESAS. A FUNÇÃO DOS ORGANISMOS EM PARÊNTESES DEVEM SER CONFIRMADAS POR INVESTIGAÇÕES FISIOLÓGICAS.....	78
FIGURA 14: ILUSTRAÇÃO REPRESENTANDO O SISTEMA DE TRATAMENTO DE ESGOTO INSERIDO NA ECONOMIA CIRCULAR.....	81
FIGURA 15: CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA EXPERIMENTAL I (SEI).	84
FIGURA 16: DIMENSÕES ESQUEMÁTICAS (<i>ESQUERDA</i>) E FOTOGRAFIA (<i>DIREITA</i>) DO REATOR PILOTO RBS DE LODO GRANULAR DO SISTEMA EXPERIMENTAL I (SEI).....	85
FIGURA 17: CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA EXPERIMENTAL II (SEII).....	89
FIGURA 18: DIMENSÕES ESQUEMÁTICAS (<i>ESQUERDA</i>) E FOTOGRAFIA (<i>DIREITA</i>) DO REATOR DE BANCADA DO SEII OPERADO PARA GRANULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EXOPOLÍMERO POR “ <i>CA. ACCUMULIBACTER</i> ”.	91
FIGURA 19: ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE EXOPOLÍMEROS DO TIPO ALGINATO (ALE)	96
FIGURA 20: FLUXOGRAMA QUE DETALHA OS SISTEMAS EXPERIMENTAIS E AS ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS UTILIZADOS EM CADA ESTUDO APRESENTADO NESTE ITEM.	115
FIGURA 21: DESENVOLVIMENTO DO INÓCULO FLOCULENTO DE LODO ATIVADO PARA GRÂNULOS EM TERMOS DE (A) TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS E % DE GRÂNULOS QUE CONSISTEM NA QUANTIDADE DE PARTÍCULAS COM DIÂMETRO SUPERIOR A 200 μ M; (B) RAZÕES IVL_{30} / IVL_{10} E IVL_{30} / IVL_5	123
FIGURA 22: CICLO OPERACIONAL DO DIA 156 DO SISTEMA LGA NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO. O CICLO DE 240 MIN CONSISTIU DE TRÊS FASES: (I) 3 MIN DE ALIMENTAÇÃO, SEGUIDO DE 10 MIN DE ANOXIA SEM MISTURA; (II) 211 MIN DE AERAÇÃO; (III) 13 MIN DE SEDIMENTAÇÃO SEGUIDO DE 3 MIN DE RETIRADA DE EFLUENTE. PERFIL DE CONCENTRAÇÃO DE $DQO_{SOLÚVEL}$ E OD (A); NITROGÊNIO COMO AMÔNIO, NITRITO E NITRATO, E ALCALINIDADE (B); E EMISSÃO DE N_2O (C) FORAM MEDIDOS AO LONGO DO TEMPO.	128
FIGURA 23: COMPOSIÇÃO MICROBIANA DOS GRÂNULOS CULTIVADOS EM ESGOTO REAL. (A) IMAGENS DE MEV E (B, C, D, E E F) IMAGENS DE FISH. (A) CILIADOS PEDUNCULADOS - MAJORITARIAMENTE REPRESENTADOS POR <i>EPISTYLIS</i> SP., (B) COLÔNIAS BACTERIANAS CORADAS COM DAPI ENVOLVIDAS NA MATRIZ DE EPS APOIADAS PELAS HASTES DOS CILIADOS. (C) FATIA DE GRÂNULO CORADA COM SONDA NSO190, REPRESENTANDO O LOCAL ONDE AS COLÔNIAS BACTERIANAS FORAM IDENTIFICADAS NAS IMAGENS D, E E F. (D)	

DETECÇÃO DE AOB COM SONDA NSO190 NA CAMADA EXTERNA DO GRÂNULO. (E) DETECÇÃO DE COLÔNIAS DE <i>NITROSPIRA</i> SP. COM A SONDA NTSPA662 E (F) DETECÇÃO DE <i>PARACOCCLUS DENITRIFICANS</i> COM A SONDA PDV1031 NO NÚCLEO DO GRÂNULO.	131
FIGURA 24: DISTRIBUIÇÃO DE GENES BACTERIANOS QUE COMPÕEM O SISTEMA LGA COM ESGOTO SANITÁRIO. AS BARRAS DE ERRO REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO DAS TRIPLICATAS.	135
FIGURA 25: IMPACTO DA MATÉRIA ORGÂNICA AFLUENTE E ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS NO ACÚMULO DE BIOMASSA NO REATOR: (A) FLUTUAÇÕES DO ESGOTO REAL RESULTARAM EM MAIOR DQO TOTAL AFLUENTE EM EO2, ENQUANTO A DQO SOLÚVEL NÃO MOSTROU MUITA DIFERENÇA. EM EO2, O RBS APRESENTOU MAIOR CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA (SSV), PORÉM, O ACÚMULO DE SÓLIDOS NO REATOR FOI CONSIDERADO BAIXO EM AMBAS AS ESTRATÉGIAS. (B) MAIORES VELOCIDADES DE REMOÇÃO DE DQO FORAM OBSERVADAS EM EO2 COMO RESULTADO DO REGIME DE ENCHIMENTO LENTO, MELHORANDO A HIDRÓLISE DA MATÉRIA ORGÂNICA.	147
FIGURA 26: PERFIL DE UM CICLO OPERACIONAL EM EO1 (A) E EM EO2 (B). PARA AMBAS AS EO NOTA-SE O CONSUMO DE DQO NAS FASES SUPOSTAMENTE ANAERÓBIAS DE REPOUSO (EO1) E ENCHIMENTO (EO2), MAS QUE FORAM NA VERDADE ANÓXICAS, E NO INÍCIO DA AERAÇÃO. OD ESTEVE NA MAIOR PARTE DO TEMPO NA SATURAÇÃO EM AMBAS EO.	150
FIGURA 27: AS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO AMONÍACAL (Q_{NH4}) OBSERVADAS EM EO1 E EO2 AO LONGO DE 200 DIAS NO RBS PILOTO PARA GRANULAÇÃO E BNR DE ESGOTO SANITÁRIO DE BAIXA CARGA EM CONDIÇÕES CLIMÁTICAS SUBTROPICAIS.	153
FIGURA 28: PERFIL DO CICLO OPERACIONAL EM EO1 (A, C) E EM EO2 (B, D). PARA AMBAS AS EO NOTA-SE O ACÚMULO DE NITRITO, SENDO PREFERENCIAL NA EO2, COM MAIORES CONCENTRAÇÕES DE AL.	155
FIGURA 29: AS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE REMOÇÃO DE FÓSFORO (Q_{Ptot}) OBSERVADAS EM EO1 E EO2 AO LONGO DE 200 DIAS NO RBS PILOTO PARA GRANULAÇÃO E BNR DE ESGOTO SANITÁRIO DE BAIXA CARGA EM CONDIÇÕES CLIMÁTICAS SUBTROPICAIS.	156
FIGURA 30: PERFIL DAS COMUNIDADES MICROBIANAS RELACIONADAS COM BNR DO SISTEMA ESTUDADO PARA AS DIFERENTES EO. UM MAPA COMPLETO COM MAIS ORGANISMOS IDENTIFICADOS É FORNECIDO NO APÊNDICE B.	162

FIGURA 31: CICLO OPERACIONAL DOS REATORES RBS UTILIZADOS NOS SISTEMAS EXPERIMENTAIS I E II. O SISTEMA EXPERIMENTAL I FOI COMPOSTO POR UM RBS PILOTO TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO PARA REMOÇÃO DE C E N. O SISTEMA EXPERIMENTAL II CONSISTIU DE REATOR RBS DE BANCADA OPERADO PARA SELEÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE PAO.....	170
FIGURA 32: (A) EVOLUÇÃO DA GRANULAÇÃO-DESINTEGRAÇÃO DESCRITA PELA PORCENTAGEM DE LODO COM TAMANHO ABAIXO DE 200 MM (SVP-SB200) E DISTRIBUIÇÃO MÉDIA DO DIÂMETRO DOS AGREGADOS. (B) IMAGENS DIGITAIS DE ESTEREOMICROSCOPIA MOSTRANDO A FORMAÇÃO DE BIOAGREGADOS GRANULARES.	174
FIGURA 33: (A) CONDIÇÕES APLICADAS DE AUMENTO GRADUAL DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA E EM PARALELO A EVOLUÇÃO DA CARGA ORGÂNICA ESPECÍFICA; (B) IMAGENS DIGITAIS DE ESTEREOMICROSCOPIA MOSTRANDO A FORMAÇÃO DE BIOAGREGADOS GRANULARES.	182
FIGURA 34: CONDIÇÕES OPERACIONAIS, SELEÇÃO BACTERIANA E ESTABILIDADE DOS GRÂNULOS. (A) AS CONDIÇÕES APLICADAS EM ESCALA PILOTO APENAS PARA REMOÇÃO DE C-N LEVARAM À FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DOMINADOS POR ORGANISMO HETEROTRÓFICO DE RÁPIDO CRESCIMENTO (OHO/DHO), COM PREDOMINÂNCIA DO GÊNERO DESNITRIFICANTE <i>THAUERA</i> . PORÉM, ESTES GRÂNULOS NÃO PERMANECERAM ESTÁVEIS AO LONGO DO TEMPO E DESINTEGRARAM-SE. (B) O ESTUDO EM ESCALA DE BANCADA ENFATIZOU QUE A APLICAÇÃO DE UM SELETOR ANAERÓBIO BEM CONTROLADO FAVORECE A GRANULAÇÃO POR PAO DE CRESCIMENTO MAIS LENTO, PREDOMINANTEMENTE DO GÊNERO "Ca. ACCUMULIBACTER". OS GRÂNULOS DOMINADOS POR PAO ERAM ROBUSTOS E ABRIGAVAM UMA FRAÇÃO SUBSTANCIAL DE EXOPOLÍMEROS.	185
FIGURA 35: CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS NO RBS. (A) GRADUAL AUMENTO NA CONCENTRAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO AFLUENTE E DIMINUIÇÃO NO TEMPO DE SEDIMENTAÇÃO; (B) ADAPTAÇÕES REALIZADAS NAS RAZÕES C:P E Ca:MG.	195
FIGURA 36: (A) EVOLUÇÃO DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA E ESPECÍFICA NO SISTEMA E (B) DA BIOMASSA; (C) COMPOSIÇÃO ORGÂNICA E INORGÂNICA DA BIOMASSA AO LONGO DO TEMPO. ÁREA CINZA ESCURO: <i>START-UP</i> ANTES DA ADAPTAÇÃO DE C:P DE 8 PARA 16 M/M DO DIA 30; ÁREA CINZA CLARO: PERÍODO ONDE OCORREU A ADAPTAÇÃO DA RAZÃO Ca: MG DE 0,37 PARA 1	

MOL/MOL NO DIA 42. ÁREA BRANCA: PERÍODO SEM AJUSTES OPERACIONAIS.....	197
FIGURA 37: EVOLUÇÃO DA FORMAÇÃO DOS GRÂNULOS A PARTIR DE LODO FLOCULENTO DE UMA ETE MUNICIPAL DE DELFT, PAÍSES BAIXOS, OPERADA PARA COMPLETA REMOÇÃO DE CARBONO E NUTRIENTES.....	199
FIGURA 38: EVOLUÇÃO DO ENRIQUECIMENTO DE PAO. (A) TÍPICO CICLO EBPR COM LIBERAÇÃO DE ORTO-FOSFATO E CONSUMO DE DQO E POSTERIOR CONSUMO DO ORTO-FOSFATO. CICLOS DOS DIAS 30 E 138, EM VERMELHO E PRETO, RESPECTIVAMENTE. ÁREA CINZA: FASE DE ENCHIMENTO (0,25 H) + INJEÇÃO DE GÁS N ₂ (0,16 H) + FASE ANAERÓBIA MISTURADA (2,92 H). ÁREA BRANCA: FASE AERÓBIA COM OD EM 50%. (B) IMAGENS DE FISH DOS DIAS 42 E 138. A SONDA PAOMIX FOI UTILIZADA ESPECÍFICA PARA “CA. ACCUMULIBACTER” MARCADA COM CY3 (VERMELHA), GAOMIX ESPECÍFICA PARA “CA. COMPETIBACTER” COM FLUOS (VERDE) E EUB338MIX PARA TODAS AS BACTÉRIAS COM CY5 (AZUL). (C) ABUNDÂNCIAS RELATIVAS (ACIMA DE 5%) DAS POPULAÇÕES MICROBIANAS IDENTIFICADAS PELO GENE 16S rRNA.	200
FIGURA 39: PRODUÇÃO DE EXOPOLÍMEROS EM CONDIÇÕES DE ENRIQUECIMENTO DE PAO EM LODO GRANULAR. (A) EVOLUÇÃO DA FRAÇÃO DE MASSA DOS EXOPOLÍMEROS EM TERMOS DE SÓLIDOS TOTAIS E VOLÁTEIS; (B) EVOLUÇÃO DOS ORGANISMOS HETEROTRÓFICOS DE CRESCIMENTO LENTO PAO (SOMA DE “CA. ACCUMULIBACTER, <i>TETRASPHERA</i> E <i>DECHLOROMONAS</i>) E GAO (SOMA DE “CA. COMPETIBACTER”, “CA. CONTENDOBACTER”, E CPB_S60). ÁREA CINZA ESCURO: START-UP ANTES DA ADAPTAÇÃO DE C:P DE 8 PARA 16 M/M DO DIA 30; ÁREA CINZA CLARO: PRIMEIRO PLATÔ DE EXOPOLÍMEROS E PERÍODO ONDE OCORREU A ADAPTAÇÃO DA RAZÃO CA: MG DE 0,37 PARA 1 MOL/MOL. ÁREA BRANCA: SEGUNDO PLATÔ DE EXOPOLÍMEROS E ESTABILIDADE DO SISTEMA.	203
FIGURA 40: COMPORTAMENTO DE ALGINATO IDENTIFICADO NO EXOPOLÍMERO PRODUZIDO EM LODO GRANULAR ENRIQUECIDO EM “CA. ACCUMULIBACTER”. (A) DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DOS EXTRATOS DOS DIAS 1, 30, 84 E 115 E AS PORCENTAGENS DE MATERIAL ORGÂNICO E INORGÂNICO IDENTIFICADAS EM CADA DIA. (B) REPRESENTAÇÃO FOTOGRÁFICA DO ÁCIDO ALGÍNICO EXTRAÍDO E POSTERIOR FORMAÇÃO DO FILME DE ALGINATO DE SÓDIO E DOS GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO.....	206

FIGURA 41: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ALE DE LODO GRANULAR ENRIQUECIDO COM “Ca. ACCUMULIBACTER”. ESPECTRÔMETRO DE RAMAN COM PICOS REFERENTES AOS POLISSACARÍDEOS, INCLUINDO O BLOCO M TÍPICO DE ALGINATO, E PROTEÍNAS.....	209
FIGURA 42: DETECÇÃO DE GLICOCONJUGADOS EM FATIAS DE GRÂNULOS ENRIQUECIDOS COM “Ca. ACCUMULIBACTER”. AS LECTINAS HPA E VGA REVELARAM A PRESENÇA DE A- E B-GALNAC, RESPECTIVAMENTE. A LECTINA WGA DETECTOU OS GLICOCONJUGADOS B-GLCNAC E ÁCIDO SIÁLICO. LECTINA AAL DEMONSTROU EXISTÊNCIA DE A-FUCOSE. IMAGENS EM TAMANHO ORIGINAL COM O TAMANHO DE PIXEL SENDO 0,3µM. AS IMAGENS DIGITAIS CLSM FORAM GRAVADAS POR NEU & KUHCLICKE (UFZ MAGDEBURG, ALEMANHA).....	210
FIGURA 43: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA SIMPLIFICADA DA TÉCNICA DE FISH.	255
FIGURA 44: MONITORAMENTO DAS EFICIÊNCIAS DE REMOÇÃO DE DQO SOLÚVEL E TOTAL, NITROGÊNIO AMONIACAL (NH ₄) E FÓSFORO TOTAL (P TOTAL) NO REATOR RBS COM LGA NAS DUAS ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS EO1 E EO2.	256
FIGURA 45: VELOCIDADES VOLUMÉTRICAS DE CONSUMO DE DQO, NITROGÊNIO AMONIACAL E FÓSFORO AO LONGO DO TEMPO EM CADA EO.	257
FIGURA 46: VELOCIDADES ESPECÍFICA DE CONSUMO DE DQO, NITROGÊNIO AMONIACAL E FÓSFORO AO LONGO DO TEMPO EM CADA EO.	257
FIGURA 47: PERFIL DA TEMPERATURA AO LONGO DOS 200 DIAS OPERADOS EM CADA ESTA ESTRATÉGIA OPERACIONAL AVALIADA.	258
FIGURA 48: PERFIL DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA E ESPECÍFICA NAS DUAS EO AO LONGO DE 200 DIAS. A CARGA ORGÂNICA ESPECÍFICA É TAMBÉM CONHECIDA COMO RELAÇÃO ALIMENTO/MICRO-ORGANISMO (A/M).....	258
FIGURA 49: CÉLULAS BACTERIANAS HIBRIDIZADAS COM AS SONDAS DE FISH DESCRITAS EM CADA FOTO. IMAGENS DE FISH DÃO SUPORTE AOS RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS ENCONTRADOS E PRINCIPALMENTE ATUA COMO UMA FERRAMENTA AUXILIAR À TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE AMPLICON.	259
FIGURA 50: RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DE AMPLICONS DAS AMOSTRAS COLETADAS DURANTE EO1 E EO2. OTU COM ABUNDÂNCIA RELATIVA MENOR QUE 0,03% NÃO FORAM INSERIDOS NESTE GRÁFICO.	260

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DO AFLUENTE (ESGOTO MUNICIPAL DE FLORIANÓPOLIS, SC, BRASIL) DO REATOR PILOTO DO SEI.	87
TABELA 2: PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ANALISADOS NO SEI E SEII	95
TABELA 3: DESCRIÇÃO DAS SONDAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADAS NA ANÁLISE DE FISH (rRNA).....	101
TABELA 4: DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA, PERFIL DO CICLO E TAMANHO EM PARES DE BASE (PB) DOS INICIADORES UTILIZADOS NESTE ESTUDO	105
TABELA 5: RESUMO DO TEMPO DE GRANULAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS GRÂNULOS, PARA DIFERENTES TIPOS DE AFLUENTES, EM REATORES RBS NAS ESCALAS DE BANCADA, PILOTO E REAL, RELATADOS POR DIVERSOS AUTORES.	124
TABELA 6: CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL, DESCRIÇÃO DAS ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS ESTUDADAS E CARACTERÍSTICAS DO ESGOTO SANITÁRIO.....	142
TABELA 7: PROPRIEDADES FÍSICAS DO LODO GRANULAR NO ESTADO ESTACIONÁRIO SOB AMBAS AS ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS (EO).	145
TABELA 8. QUANTIDADE DE POLISSACARÍDEOS (PS) E PROTEÍNAS (PN) NOS EXOPOLÍMEROS EXTRAÍDOS DA BIOMASSA DO SISTEMA PILOTO (SEI) TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO. OS VALORES DE MEDIANA SÃO FORNECIDOS JUNTO COM O PRIMEIRO (Q1) E TERCEIRO (Q3) QUARTIS.	176
TABELA 9: CARACTERÍSTICAS DO AFLUENTE E EFLUENTE DO RBS (SEI). COMPARAÇÃO DOS PADRÕES DE LANÇAMENTO DE EFLUENTES ENTRE AS DIRETRIZES DO BRASIL, ESTADO DE SANTA CATARINA E UNIÃO EUROPÉIA.	178
TABELA 10: COMPOSIÇÃO DO ESGOTO SINTÉTICO E AS ADAPTAÇÕES REALIZADAS. COMPOSIÇÃO BASEADA EM WEISSBRODT ET AL. (2013B).....	253
TABELA 11: COEFICIENTE DE PEARSON DAS CORRELAÇÕES ENTRE A PRODUÇÃO DE ALE E AS VARIÁVEIS CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA, RAZÃO C:P E CA:MG, E ABUNDÂNCIA RELATIVA DE PAO E GAO. (N=29)	261
TABELA 12: LECTINAS COM SINAL POSITIVO NAS AMOSTRAS DE GRÂNULOS ENRIQUECIDOS COM “Ca. ACCUMULIBACTER”.	261

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAU - *Aalborg University*, Universidade de Aalborg
A/D – Razão de altura útil e diâmetro
AGV - Ácidos graxos voláteis
AL - Amônia livre
ALE - *Alginate-like exopolymer*, exopolímero do tipo alginato
ANA - Agência Nacional de Águas
ANL - Ácido nitroso livre
AOA - *Ammonium-oxidizing archaea*, arqueas oxidadoras de amônia
AOB - *Ammonium-oxidizing bacteria*, bactérias oxidadoras de amônia
APHA - *American Public Health Association*
ATP - Adenosina tri-fosfato
AUSB - *Aerobic upflow sludge blanket*, aeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo
AWWA - *American Water Works Association*
BAF - *Biological aerated filters*, filtros biológicos aerados
BAS - *Biofilm airlift suspension reactors*, reatores airlift com biofilme em suspensão
BNR - *Biological nutrient removal*, remoção biológica de nutrientes
CLP - Controlador lógico programável
CLSM - *Confocal laser scanning microscopy*, microscópio confocal de varredura à laser
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COD – *Chemical oxygen demand*
COMAMMOX - *Complete ammonia oxidizing organisms*, oxidadores completos de amônia
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONSEMA - Conselho Estadual de Meio Ambiente de Santa Catarina
DAPI - 4,6-diamidino-2-phenilindol
DHO - *Denitrifying heterotrophic organisms*, organismos heterotróficos desnitrificantes
DNA - *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico
DBO – Demanda bioquímica de oxigênio
DQO – Demanda química de oxigênio
DQOx – Demanda química de oxigênio particulada
DQOpb – Demanda química de oxigênio prontamente biodegradável
EO1- Estratégia operacional 1
EO2 – Estratégia operacional 2

EPS - *Extracellular polymeric substances*, substâncias poliméricas extracelulares

ETE - Estação de tratamento de esgoto

FAPESC - Fundação de amparo à pesquisa e inovação do estado de Santa Catarina

FINEP - Financiadora de estudos e projetos

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*, Hibridização in situ por fluorescência

FLBA - *Fluorescence lectin-binding analysis*, análise de ligação de lectinas por fluorescência

GAO - *Glycogen-accumulating organisms*, organismos acumuladores de glicogênio

IWA - *International Water Association*

LABEFLU - Laboratório de efluentes líquidos e gasosos

LAMEB - Laboratório Multiusuário de estudos em biologia

LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

LGA - Lodo granular aeróbio

LIMA - Laboratório integrado de meio ambiente

MBBR - *Moving-bed biofilm reactor*, reatores de leito móvel com biofilme

MBR - *Membrane bioreactor*, bioreatores com membranas

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

NOB - *Nitrite-oxidizing bacteria*, bactérias oxidadoras de nitrito

NDA - Nitrificação-Desnitrificação alternadas

NDS - Nitrificação-Desnitrificação simultâneas

OHO - *Ordinary heterotrophic organisms*, organismos heterotróficos ordinários

OS1, OS2 – Operational strategy 1, Operational strategy 2

OTU - *Operational taxonomic unit*, unidades taxonômicas operacionais

PAO - *Polyphosphate-accumulating organisms*, organismos acumuladores de polifosfato

PH2MB - Poli- β -hidroxi-2-metilbutirato

PH2MV - Poli- β -hidroxi-2-metilvalerato

PHA - Poli- β -hidroxialcanoatos

PHB - Poli- β -hidroxibutirato

PHV - Poli- β -hidroxivalerato

PN - Proteínas

PRONEX - Programa de Apoio a Núcleos de Excelência

PS - Polissacarídeos

qPCR - *Polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase

RBC - *Rotating Biological Contactors*, contactores biológicos rotativos

RBSG - Reator em bateladas sequenciais de grânulos
RENUTRES - Rede de Desenvolvimento e Aperfeiçoamento de
Tecnologias de Tratamento Terciário de Esgotos Sanitários
RNA - *Ribonucleic acid*, ácido ribonucleico
SCADA - *Supervisory control and data acquisition*
SEI - Sistema experimental I
SEII - Sistema experimental II
SNF - *Swiss National Science Foundation*
SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SVP-SB200 - *Sludge volume percentage with size below 200 μm*
TU Delft - *Delft University of Technology*, Universidade Técnica de
Delft
UASB - *Upflow anaerobic sludge blanket*
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
UNICEF - *United Nations Children's Fund*, Fundo das Nações Unidas
para a Infância
USEPA - *United States Environmental Protection Agency*, Agência de
Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WEF - *Water Environment Federation*
WHO - *World Health Organization*
WRRF - *Water resource recovery facilities*, Instalações de Recuperação
de Recursos Hídricos
WWTP - *Wastewater treatment plants*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	35
1.1 JUSTIFICATIVA (MOTIVAÇÃO)	38
1.2 HIPÓTESE	43
1.3 QUESTÕES DA PESQUISA	43
1.4 OBJETIVOS	44
1.4.1 Objetivo geral	44
1.4.2 Objetivos específicos	44
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	45
2.1 TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO.....	45
2.1.1 Sistemas Convencionais.....	45
2.1.2 Sistemas Compactos	46
2.1.2.1 Reator em bateladas sequenciais (RBS)	47
2.2 TECNOLOGIA DE LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA)....	50
2.2.1 O LGA e sua formação	52
2.2.1.1 Mecanismos propostos de granulação	53
2.2.1.2 Fatores determinantes para granulação.....	55
2.2.1.3 Estabilidade e desintegração dos grânulos	56
2.2.2 Composição do LGA	58
2.2.2.1 Camadas dos grânulos	58
2.2.2.2 O papel das substâncias poliméricas extracelulares (EPS)	
.....	59
2.3 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NUTRIENTES.....	63
2.3.1 Conversões biológicas do nitrogênio.....	63
2.3.1.1 Nitrificação	64

2.3.1.2	Desnitrificação	66
2.3.1.3	Nitrificação e desnitrificação no LGA	68
2.3.2	Conversões biológicas do fósforo (<i>enhanced biological phosphorus removal</i> - EBPR)	71
2.3.2.1	Remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo no LGA.....	74
2.4	ECOLOGIA MICROBIANA EM SISTEMAS DE LGA	76
2.5	TECNOLOGIA DE LGA DENTRO DA ECONOMIA CIRCULAR.....	79
3.	METODOLOGIA.....	83
3.1	SISTEMA EXPERIMENTAL I (SEI).....	83
3.1.1	Características gerais.....	83
3.1.2	Operação do reator	86
3.1.3	Monitoramento do reator.....	88
3.2	SISTEMA EXPERIMENTAL II (SEII)	88
3.2.1	Características Gerais	88
3.2.2	Operação do reator	90
3.2.3	Monitoramento do reator.....	92
3.3	ANÁLISES DOS GRÂNULOS	93
3.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	93
3.5	MEDIÇÃO DO GÁS ÓXIDO NITROSO (N ₂ O).....	94
3.6	EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS)	96
3.6.1	Análises físico-químicas nos extratos de EPS	97
3.7	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	99

3.7.1. Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	99
3.7.2 Extração de DNA	103
3.7.3 Amplificação quantitativa por reação em cadeia da polimerase (qPCR)	103
3.7.4 Sequenciamento de nova geração	104
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	107
3.9 CÁLCULOS	107
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	114
4.1 ROTAS MICROBIANAS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO EM LODO GRANULAR AERÓBIO NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO	116
4.1.1 Introdução	118
4.1.2 Materiais e métodos	119
4.1.3 Resultados e discussões	122
4.1.4 Conclusões.....	135
4.2 ESCLARECENDO FALHAS NO DESEMPENHO DO LODO GRANULAR NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO SOB CONDIÇÕES DE CLIMA SUBTROPICAL	136
4.2.1 Introdução.....	139
4.2.2 Materiais e Métodos	141
4.2.3 Resultados e discussão.....	145
4.2.4 Conclusões.....	163
4.3 EFEITOS DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA SELEÇÃO BACTERIANA EM REATORES RBS VISANDO A GRANULAÇÃO ESTÁVEL E A PRODUÇÃO DE EPS.	164
4.3.1 Introdução.....	167
4.3.2 Materiais e Métodos	168
4.3.3 Resultados.....	173
4.3.4 Discussão.....	184
4.3.5 Conclusões.....	185

4.4	RECUPERAÇÃO DE EXOPOLÍMERO DO TIPO ALGINATO DE LODO GRANULAR FORMADO POR PAO: “DO LODO RESIDUAL A UM PRODUTO VALORIZADO”	187
4.4.1	Introdução	190
4.4.2	Materias e métodos	191
4.4.3	Resultados e discussões	194
4.4.4	Conclusões	210
5.	DISCUSSÃO INTEGRADA	212
6.	CONCLUSÕES	219
7.	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	223
	REFERÊNCIAS	225
	LISTA DE PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES	249
	ARTIGOS PUBLICADOS	249
	ARTIGO SUBMETIDO	249
	ARTIGOS EM PREPARAÇÃO	249
	TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS	250
	APÊNDICE A	253
	APÊNDICE B	256
	APÊNDICE C	261

1. INTRODUÇÃO

“We live in a society exquisitely dependent on science and technology, in which hardly anyone knows anything about science and technology. ... Science is much more than a body of knowledge. It is a way of thinking. This is central to its success.”

(Carl Sagan, 1990)

O Brasil tem demonstrado um lento avanço no setor do saneamento diante, principalmente, das barreiras políticas, econômicas e falta de planejamento urbano do país. Na classificação mundial, o Brasil é o 102º país com relação à população com acesso ao saneamento (WHO; UNICEF, 2015). Em cinco anos (2011-2015) a melhora no tratamento de água ficou em 0,9% e na coleta de esgoto em 2,3%. Atualmente, o acesso à água encanada chega a 93,1% nas áreas urbanas brasileiras, no entanto um contingente de apenas 58% da população urbana recebe atendimento por redes de esgotos, destacando-se a região Sudeste, com média de 81,9% (SNIS, 2017). Quanto ao tratamento dos esgotos, observa-se que o índice médio do país chega a 42,7% para a estimativa dos esgotos gerados. Cabe ressaltar, que o volume de esgotos tratados aumentou de 3,624 bilhões de m³ em 2013 para 3,764 bilhões de m³ em 2014, correspondendo a um incremento de 3,9% (SNIS, 2016) e para 3,805 bilhões de m³ em 2015, correspondendo a 1,1% (SNIS, 2017). Um dos problemas relacionados ao lançamento de esgoto não tratado são os altos níveis de contaminação da água, especialmente por nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (P), os quais estão presentes em diferentes formas nos ambientes aquáticos. Lançamentos excessivos desses nutrientes podem levar à eutrofização das águas superficiais. A constante degradação da qualidade das águas receptoras de despejos leva à necessidade de ações que visam prevenir a eutrofização por meio de uma eficaz redução dos níveis de nutrientes nos descartes de esgoto.

A eutrofização é um problema especialmente grave em ambientes hídricos lênticos, tais como os reservatórios, uma vez que estes são muito utilizados como mananciais para o abastecimento público. Um problema sério decorrente da eutrofização em relação ao abastecimento é a proliferação de algas tóxicas nos mananciais, visto que seu controle e remediação ainda são bastante complexos. Além dos riscos para o

abastecimento público e à saúde, os efeitos da eutrofização também podem comprometer diversos usos dos recursos hídricos, como a navegação, produção de energia hidrelétrica, dessedentação de animais, pesca e recreação, por exemplo (ANA, 2016).

Dentre as várias tecnologias existentes para o tratamento de esgoto sanitário, os sistemas biológicos são os mais utilizados e explorados comercialmente, sendo a tecnologia de lodos ativados a mais aplicada mundialmente. Entretanto, os sistemas convencionais demandam diversas etapas de tratamento, principalmente quando projetados para remover nutrientes, requerendo assim grande área e um alto aporte energético para implantação e operação. Uma vez que sistemas de tratamento de esgoto são necessários em regiões populosas, o espaço é limitado. Geralmente, o espaço disponível em estações de tratamento de esgoto (ETE) já existentes também é limitado, o que pode causar problemas quando estas plantas precisam ser ampliadas em função de novas atividades humanas que surgem ao redor. Dentro desta necessidade de intensificação de processo e limitação de espaço, a tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) (comercialmente conhecido como Nereda[®]) atua como um novo modelo para a remoção biológica de nutrientes e sedimentação secundária em um único reator de batelada sequencial (RBS) (GIESEN; THOMPSON, 2013). Plantas de tratamento de esgoto em escala real utilizando LGA foram implantadas nos Países Baixos (PRONK et al., 2015), e atualmente chegam em vários países, inclusive naqueles em desenvolvimento, como no Brasil.

A tecnologia de LGA é baseada na rápida sedimentação de biofilmes esféricos, chamados grânulos, obtidos pela autoagregação de micro-organismos (DE KREUK; LOOSDRECHT, 2006; WEISSBRODT et al., 2013a). A estrutura do grânulo possui diferentes camadas e nichos microbiológicos como resultado do gradiente de oxigênio e substrato que se forma entre a borda e seu interior (DE KREUK; LOOSDRECHT, 2006). Este fenômeno possibilita a remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo de águas residuárias. Apesar das vantagens do LGA, ainda há relutância para a aceitação desta tecnologia em função de baixa estabilidade dos grânulos e longos períodos de *start-up* (2 a 8 meses) (LEE et al., 2010; PRONK et al., 2015). Na tentativa de responder como e por que os grânulos se formam e se estruturam, os pesquisadores têm colocado seus esforços sobre o papel das substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Os EPS são macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, excretadas para o meio pelos micro-organismos, melhorando a aderência na formação do biofilme granular (SEVIOUR et al., 2009a). Desta forma, o conhecimento sobre a produção destas substâncias, suas composições e

comportamento ajuda na compreensão do processo de granulação e na estabilidade do grânulo.

Além de dificuldades com a estabilidade dos grânulos, autores reportaram problemas relacionados à eficiência do tratamento com remoção de fósforo e acúmulo de nitrito (AKABOCI, 2013; COMA et al., 2012; DAUDT, 2015; ISANTA et al., 2012; JUNGLES et al., 2011; WAGNER et al., 2015a). Os fatores associados a estes problemas estão ligados às condições operacionais aplicadas ao sistema. O processo de lodo granular bem sucedido em escala real para esgoto municipal foi recentemente relatado (PRONK et al., 2015). Porém, as características complexas dos esgotos sanitários continuam a ser um desafio para o desempenho do processo. Semelhante à impressionante quantidade de pesquisas sobre sistemas de lodos ativados, os sistemas de lodo granular também devem se beneficiar de investigações que se aproximem de condições reais. Os esgotos sanitários abrigam uma ampla gama de fontes de carbono dissolvido e particulado, cujos impactos na granulação e na remoção de nutrientes precisam ser desvendados. Os impactos da carga de carbono baixa e flutuante também são de interesse relevante, no entanto, foram pouco testados (WAGNER, 2015). Além disso, questões como o longo tempo de granulação, a imprevisível morfologia dos grânulos e sua desintegração, e a ineficiente remoção biológica de nutrientes ainda são reportadas (SARMA; TAY; CHU, 2017).

A condição operacional aplicada ao sistema determina a seleção dos micro-organismos presente, como diz a hipótese de Baas Becking (1934): *“Everything is everywhere, but the environment selects”* (DE WIT; BOUVIER, 2006). A tecnologia com lodo granular tem sido bem utilizada em RBS, onde se tem ciclos que funcionam em fases de enchimento, aeração/reação, sedimentação e descarte. A configuração destes ciclos operacionais afeta diretamente na seleção dos micro-organismos, e conseqüentemente, na eficiência do tratamento e na estrutura do grânulo. Desta forma, a elucidação da comunidade microbiana participante dos processos de granulação e de remoção dos nutrientes se faz necessária para uma compreensão dos processos de engenharia que se deseja alcançar.

Do ponto de vista microbiológico, sabe-se que os organismos acumuladores de fósforo (PAO) além de intensificar o processo de tratamento podem conferir estabilidade aos grânulos (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004; WEISSBRODT et al., 2013a) em função do tipo de matriz de EPS que os mesmos são capazes de formar. Até o momento, pouco se sabe sobre os EPS em biofilmes de LGA. Lin et al.

(2010, 2008) extrairam quantidades consideráveis de exopolímeros de LGA de ETE reais e notou suas similaridades, em termos de comportamento de gel, com o alginato (*Alginate-like exopolymer*, ALE). Desta forma, os PAO se apresentam como fortes candidatos a produtores de exopolímeros, os quais conferem a estabilidade dos grânulos e também podem apresentar grande potencial de biorrefinaria. Biorrefinaria é um complexo integrado capaz de produzir diferentes produtos, no presente caso sendo água tratada e biopolímeros com base na biomassa do lodo residual, dentro de um conceito que permite um alcance de maiores eficiências, tanto do ponto de vista termodinâmica quanto do ponto de vista econômico e ambiental. Neste contexto, a tecnologia de lodo granular se mostra atrativa para alta remoção de nutrientes e recuperação de produtos, sendo incluída, deste modo, no novo paradigma da economia circular, onde as águas residuárias não são apenas uma fonte de poluição, mas também um recurso sustentável de nutrientes, como o fósforo, e de biopolímeros como o exopolímero do tipo alginato (VAN LOOSDRECHT; BRDJANOVIC, 2014).

1.1 JUSTIFICATIVA (MOTIVAÇÃO)

O desenvolvimento deste trabalho foi motivado tendo como base os pilares que deixam claros a necessidade do investimento público: como os argumentos sociais/locais, ambientais, legais e científicos. Do ponto de vista social, o saneamento está diretamente relacionado à saúde pública. Os locais onde a população tem menos acesso ao saneamento básico são exatamente os locais onde ocorrem os maiores índices de morbidade e mortalidade por enfermidades diarréicas, entre outras doenças, como dengue e leptospirose (TRATA BRASIL, 2017). Além desta preocupante e direta consequência social à falta de saneamento, os despejos de nutrientes presentes no esgoto resultam em graves impactos ambientais e sociais em função da eutrofização dos recursos hídricos.

Do ponto de vista legal, a fim de evitar a eutrofização e proteger os recursos hídricos, os padrões de lançamentos são necessários para controlar os despejos de carbono, nitrogênio e fósforo. De acordo com a Resolução 430/11 do CONAMA, os padrões de lançamento de efluentes sanitários permitem uma concentração máxima de 120 mg L⁻¹ ou 60% de remoção de DBO, não sendo exigível o padrão de nitrogênio amoniacal total. A resolução nacional apenas exige padrão de lançamento de nitrogênio amoniacal (20 mgN L⁻¹) para efluentes provenientes de outras atividades ou processos. O fósforo não é considerado pela norma nacional no lançamento de efluentes

(CONAMA, 2011). A legislação ambiental de Santa Catarina é mais restritiva, por meio da Lei nº 14.675/09, a qual estabelece que os efluentes somente podem ser lançados direta ou indiretamente em trechos de lagoas, lagunas e estuários, quando a concentração de fósforo total for igual ou inferior a 4 mg L^{-1} ou, se houver tratamento do efluente, quando a eficiência de remoção de fósforo for no mínimo de 75%, desde que não altere as características do corpo de água receptor (CONSEMA-SC, 2009). Além de estabelecer padrões para o fósforo, as normas catarinenses são mais exigentes do que a nacional quanto ao carbono, cujo valor máximo permitido para DBO é de 60 mg L^{-1} ou 80% de eficiência de remoção. Estes valores máximos permitidos para lançamento de efluentes pelas normas brasileiras são bem mais altos do que aqueles legislados nos países desenvolvidos, como países da União Européia, por exemplo. Neste caso, os limites de DBO, nitrogênio total e fósforo são de 25 mgDBO L^{-1} (ou 70-90% de remoção), 15 ou 10 mgN L^{-1} dependendo da população (ou 70-80%) e 2 ou 1 mgP L^{-1} dependendo da população (ou 80%), respectivamente (EUR-Lex, 1991).

Várias tecnologias de tratamento de esgoto para remoções de carbono, nitrogênio e fósforo têm sido propostas, sendo a tecnologia de lodo ativado a mais utilizada. Porém, esses sistemas demandam grande área e um alto aporte energético para implantação e operação. A tecnologia de lodo granular (comercialmente conhecido como Nereda[®]) atua com as remoções combinadas de carbono, nitrogênio e fósforo, mediadas por micro-organismos que se agregam em estruturas de grânulos e não de flocos. Como resultado, elevadas velocidades de sedimentação são alcançadas com o lodo granular, dispensando os decantadores secundários, o que resulta em uma possível redução de 80% em espaço quando comparado com o sistema convencional de lodo ativado (DE BRUIN et al., 2004). Portanto, do ponto de vista econômico e científico, esta nova tecnologia se mostra atraente para o tratamento de esgoto sanitário municipal.

No contexto mundial, a tecnologia Nereda[®], recentemente, se mostrou eficiente no continente europeu (PRONK et al., 2015), porém as características dos esgotos e as condições climáticas se modificam em cada local, e têm sido demonstrados, em outros estudos, problemas com longos períodos de *start-up*, instabilidade de grânulos e a ineficiente remoção de nutrientes (SARMA; TAY; CHU, 2016). No Brasil, o LABEFLU-UFSC é o grupo pioneiro nos estudos de LGA. Os estudos tiveram foco, inicialmente, na formação dos grânulos aeróbios utilizando esgoto sintético (JUNGLES et al., 2011), seguido de esgoto real misto com sintético (JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014) e

depois apenas com esgoto sanitário real (WAGNER; COSTA, 2013, 2015) sob diferentes condições de operação em escala de bancada. Mais tarde o processo de granulação no tratamento de esgoto sanitário passou a ser explorado em escala piloto (AKABOCI, 2013; WAGNER, 2015; WAGNER et al., 2015a). Além do aprofundamento nas pesquisas em relação à granulação e à eficiência de tratamento, o grupo LABEFLU-UFSC também explorou a modelagem matemática do RBS-LGA (AKABOCI, 2013) e a dinâmica do nitrogênio com medições de N_2O (DAUDT, 2015). Juntamente às dificuldades com a estabilidade dos grânulos, os trabalhos realizados reportaram problemas relacionados à eficiência do tratamento com remoção de fósforo e acúmulo de nitrito (AKABOCI, 2013; DAUDT, 2015; JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; WAGNER, 2015; WAGNER et al., 2015a; WAGNER; COSTA, 2013, 2015). Portanto, a presente pesquisa surge para se aprofundar na comunidade microbiana atuante nos processos de granulação e de remoção dos nutrientes no tratamento de esgoto sanitário real, a fim de compreender falhas e propor novos caminhos de aprimoramento desse processo biotecnológico.

O tratamento do esgoto por si só, ainda não é uma solução sustentável, uma vez que as transformações do carbono, nitrogênio e fósforo presentes no líquido passam a compor a biomassa, a qual se acumula no sistema e passa a ser um resíduo para a ETE. Este lodo residual continua sendo um problema ambiental e sua disposição um problema econômico. Desta forma, uma nova frente de recuperação de recursos hídricos - ‘*Water Resource Recovery Facilities*’ (WRRF) (WEF, 2014), vem focando no reaproveitamento dos recursos e agregando valor às águas residuárias. A partir do lodo de ETE, podem ser extraído energia, fósforo, bioplásticos (como os PHA) e biopolímeros. O alginato é um biopolímero predominantemente produzido por algas, mas sabe-se que bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii* também são capazes de produzi-lo (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008). Uma vez que o cultivo das algas depende de condições sazonais e geográficas, a produção do alginato varia, ocasionando em produções limitadas em alguns períodos do ano e preços elevados no mercado. A produção de alginato por bactérias apresenta vantagens por ocorrer em condições controladas sem sofrer estas influências. Torna-se ainda mais vantajoso quando se pensa nesta produção de alginato advinda de culturas mistas, como de lodo de ETE, onde a esterilização não é necessária e utiliza-se resíduo orgânico como matéria-prima. Do ponto de vista da aplicação, apesar do alginato ser principalmente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica,

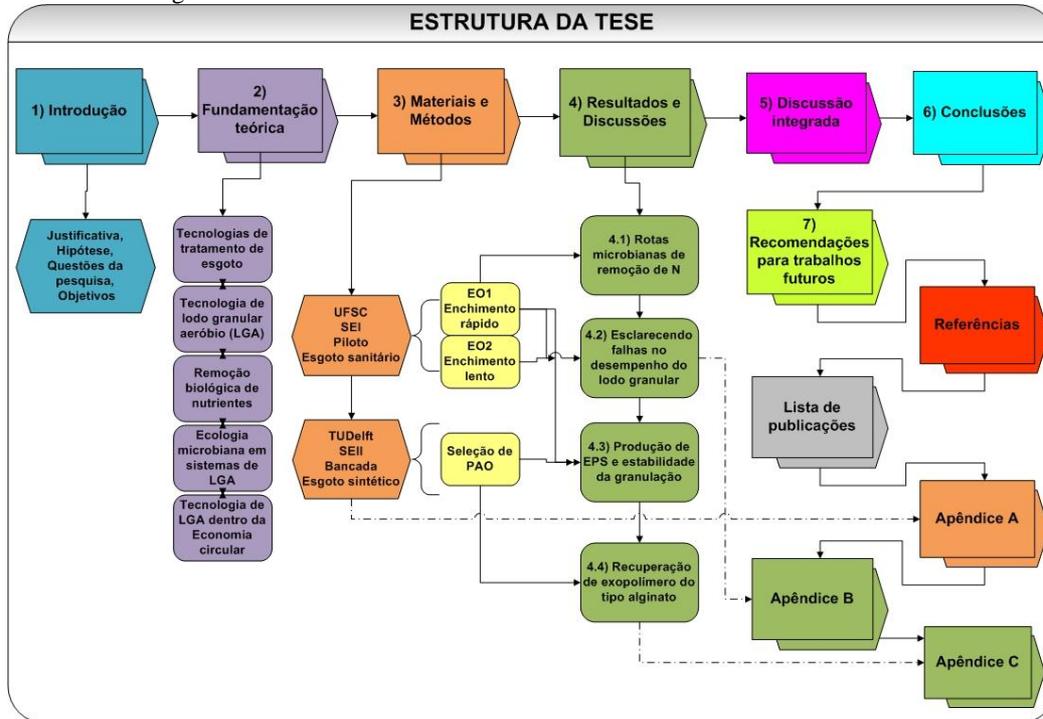
médica e odontológica, novas aplicações foram encontradas para o uso de alginato originado do esgoto. Na indústria de papel, biopolímeros do tipo alginato são capazes de aumentar a resistência à água das fibras de papéis (VAN LOOSDRECHT; LIN; LOTTI, 2013) e na indústria civil, podem evitar o ressecamento de concretos (PINCKEN; ZLOPASA; KOENDERS, 2014). Portanto, além do presente estudo oferecer perspectivas para atingir critérios de qualidade da água rigorosos utilizando a tecnologia de lodo granular, também avaliou-se o potencial para a biorrefinaria de exopolímeros, do tipo alginato.

Dentro destes contextos, esta pesquisa teve como ponto de partida a busca pela remoção de nutrientes do esgoto sanitário utilizando a tecnologia de lodo granular aeróbio, com base nos projetos PRONEX/FAPESC “*Tecnologias Inovativas Para a Sustentabilidade do Saneamento Básico em Santa Catarina*”, e RENUTRES/FINEP “*Avaliação do tratamento de esgoto sanitário em reator operado em bateladas sequenciais com grânulos (RBSG)*”, dirigidos pela professora Rejane H. R. da Costa. Estes projetos vêm sendo desenvolvidos desde 2010 na UFSC, tendo como resultados trabalhos que além de avaliar o desempenho do processo, exploraram a modelagem matemática (AKABOCI, 2013), as emissões de óxido nitroso (DAUDT, 2015), a remoção de nitrogênio por assimilação (WAGNER et al., 2015a) e o efeito do material orgânico particulado na granulação e nas condições operacionais (WAGNER, 2015). O presente trabalho explorou as comunidades microbianas atuantes, a fim de compreender as rotas metabólicas de transformação dos nutrientes e melhorar as condições operacionais na remoção destes.

Na segunda etapa desta pesquisa, também com foco na ecologia microbiana, buscou-se pelo conhecimento das substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances*, EPS) associadas à estabilidade dos grânulos e na recuperação de exopolímeros. Esta parte do trabalho esteve inserida no projeto “*Systems microbiology of alginate polysaccharides biosynthesis from granular sludge biofilms to waste-based biorefining in mixed-culture microbial processes*” desenvolvida na TU Delft e na AAU no ano de 2015, financiado pela *Fellowship of the Swiss National Science Foundation* (SNF) e dirigido pelo professor David G. Weissbrodt e apoiado pelos professores Mark van Loosdrecht e Per Nielsen.

A estrutura geral da tese está representada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura geral da tese.



1.2 HIPÓTESE

A partir de estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do LABEFLU-UFSC e com base na literatura, este estudo levantou as seguintes hipóteses:

Hipótese 1: A obtenção de grânulos estáveis e remoção completa de nutrientes em processo de lodo granular estão intimamente ligadas à comunidade microbiana resultante das condições operacionais do reator.

Hipótese 2: A granulação está relacionada com a biossíntese da matriz de EPS, sendo possível a recuperação de exopolímeros valorizados a partir do lodo granular, sob condições de seleção de micro-organismos de crescimento lento.

1.3 QUESTÕES DA PESQUISA

Para nortear a pesquisa, as seguintes questões foram estabelecidas:

- 1) Quais as rotas metabólicas do nitrogênio predominantes no lodo granular cultivado em esgoto sanitário de baixa carga, em condições de remoção de carbono e nitrogênio?
- 2) Como a variação na configuração do ciclo operacional do RBS de lodo granular interfere na comunidade microbiana, na granulação e na remoção de nutrientes?
- 3) Quais medidas operacionais devem ser tomadas para melhorar a granulação e a remoção de nutrientes?
- 4) Como a seleção dos micro-organismos e a produção de EPS influenciam na estabilidade dos grânulos?
- 5) Como as condições operacionais do reator, para a seleção de PAO, favorecem a produção de exopolímero?
- 6) O exopolímero recuperado em condições de seleção de PAO se comporta como alginato? Qual sua potencialidade para a biorrefinaria dentro do contexto de economia circular?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 **Objetivos gerais**

Investigar a comunidade microbiana presente nos processos de granulação, remoção de nutrientes e produção de EPS, e verificar o potencial de valorização de exopolímeros do tipo alginato, em sistemas de tratamento de esgoto sanitário utilizando lodo granular.

1.4.2 **Objetivos específicos**

- 1) Investigar a comunidade microbiana e identificar as rotas metabólicas de remoção de nitrogênio em lodo granular cultivado em um RBS piloto alimentado com esgoto sanitário.
- 2) Avaliar o regime de enchimento nas características físicas dos grânulos, na remoção de nutrientes e nas comunidades microbianas, em um reator piloto alimentado com esgoto sanitário. Discutir as falhas observadas e propor melhorias de operação para os sistemas com lodo granular.
- 3) Avaliar o efeito das condições operacionais e da seleção bacteriana na formação da matriz de EPS e na estabilidade dos grânulos em reator RBS.
- 4) Avaliar a recuperação de exopolímeros do tipo alginato de lodo granular enriquecido por PAO de crescimento lento.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

(Marie Curie, 1977)

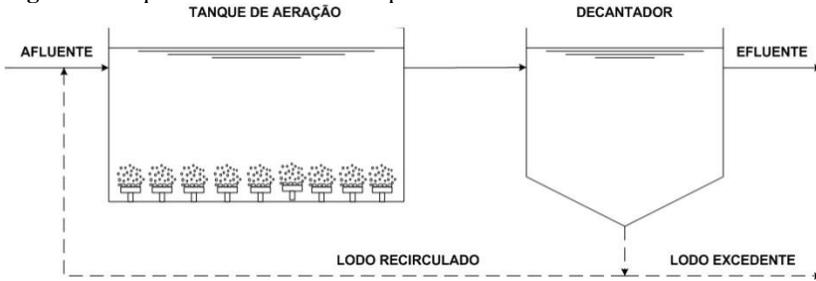
2.1 TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO

2.1.1 Sistemas Convencionais

A tecnologia de lodos ativados tem sido operada durante os últimos cem anos como o tratamento padrão para cargas orgânicas, nitrogenadas e fosfatadas presentes no esgoto. Desenvolvida na Inglaterra (ARDERN; LOCKETT, 1914), sendo a primeira planta escala real operada na cidade de Worcester (EUA) em 1916, esta tecnologia se espalhou pelo mundo e ainda é a mais utilizada atualmente. O processo baseia-se na oxidação dos compostos orgânicos e inorgânicos mediada por uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo bactéria, fungos, protozoários e micrometazoários, sendo as bactérias as principais responsáveis pela depuração dos poluentes. Estes organismos se agregam em um biofilme floculento e se encontram em suspensão no meio líquido.

O sistema de lodos ativados opera em fluxo contínuo e é composto por um tanque de aeração (onde ocorrem as conversões biológicas), um decantador, a linha de recirculação de lodo e a linha de descarte de lodo (Figura 2). No tanque biológico, os micro-organismos realizam a oxidação dos compostos orgânicos utilizando O_2 e NO_x^- como receptores de elétrons para geração de energia para a célula na forma de adenosina trifosfato (ATP), processo conhecido como catabolismo. Uma vez com energia, os micro-organismos produzem novas células, o que se caracteriza pela produção de lodo, processo conhecido como anabolismo. O lodo produzido é separado da fase líquida no decantador, sendo que parte dele é retornada ao tanque de aeração e outra é descartada. O líquido tratado segue para um corpo receptor e o lodo residual é desidratado para então seguir ao seu destino final (METCALF; EDDY, 2003).

Figura 2: Esquema ilustrativo de um processo de lodo ativado convencional



Fonte: Próprio autor

A comunidade microbiana presente no sistema afeta diretamente as eficiências de conversões do substrato e a etapa de sedimentação. O aparecimento de bactérias filamentosas, por exemplo, prejudica a sedimentabilidade do lodo comprometendo a qualidade do efluente tratado. Os micro-organismos responsáveis pelas remoções de nitrogênio e fósforo requerem condições ambientais diferentes, necessitando da separação espacial dos processos biológicos com a adição de outros tanques ou câmaras seletoras (por exemplo, o processo UCT- (*University of Cape Town*) (VAIOPOULOU; AIVASIDIS, 2007), ou temporal alternando as fases aeróbia, anóxica e anaeróbia em uma única unidade (HE; XUE; WANG, 2009). Exatamente esta necessidade por vários tanques, para se alcançar a remoção completa dos nutrientes, e o uso de decantadores para a separação da biomassa, faz com que esta tecnologia ocupe demasiado espaço. O problema de espaço se agrava ainda mais quando se considera o aumento populacional, onde as estações se sobrecarregam e requerem ampliações para manter os padrões de qualidade do efluente tratado. Neste contexto, surge o desenvolvimento das tecnologias compactas para suprir esta carência do sistema convencional.

2.1.2 Sistemas Compactos

Os sistemas compactos almejam a intensificação dos processos de remoções e minimização do espaço ocupado pelas estações de tratamento de esgoto (ETE). A maioria deles baseia-se no desenvolvimento do lodo em forma de biofilmes, promovendo vantagem tanto na maior diversidade de micro-organismos, quanto no aumento da agregação do lodo melhorando sua sedimentabilidade. A formação dos biofilmes pode acontecer em um material suporte fixo ou flutuante ou

ocorrer a autoimobilização microbiana, sem material suporte. Os sistemas compactos mais utilizados no tratamento de águas residuárias atualmente são: reator em batelada sequencial (RBS) (SBR – do inglês *Sequencing batch reactor*), reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), filtros biológicos aerados (BAF – *Biological Aerated Filters*), contactores biológicos rotativos (RBC – *Rotating Biological Contactors*), reatores airlift com biofilme em suspensão (BAS – *Biofilm Airlift Suspension reactors*), bioreatores com membranas (MBR – *Membrane Reactors*), reatores de leito móvel com biofilme (MBBR – *Moving-bed biofilm reactor*) e lodo granular aeróbio (LGA) (AGS – *Aerobic granular sludge*). Neste estudo foram utilizados os sistemas RBS com LGA, os quais serão descritos adiante.

2.1.2.1 Reator em bateladas sequenciais (RBS)

O reator em batelada sequencial segue o mesmo princípio do processo de lodos ativados, porém operando em fluxo intermitente. Desta forma, as fases de aeração e decantação acontecem em um único tanque, sendo separadas por tempo e não por unidade operacional. Como resultado, os RBS ocupam uma área muito menor de instalação do que os lodos ativados, se tornando bastante atrativa em regiões onde há limitação de espaço. No tratamento de esgoto, com a adequada automação do sistema, consegue-se promover condições para as reações biológicas de nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo, através de fases aeróbias, anóxicas e anaeróbias em apenas uma unidade operacional (GERARDI, 2010). Os RBS são operados em ciclos operacionais, onde ocorrem as seguintes fases sequenciais (Figura 3): (1) fase de enchimento; (2) fase de aeração; (3) fase de decantação dos sólidos em suspensão; (4) descarga do efluente; e (5) fase de repouso ou ajustes (JORDÃO; PESSÔA, 2009).

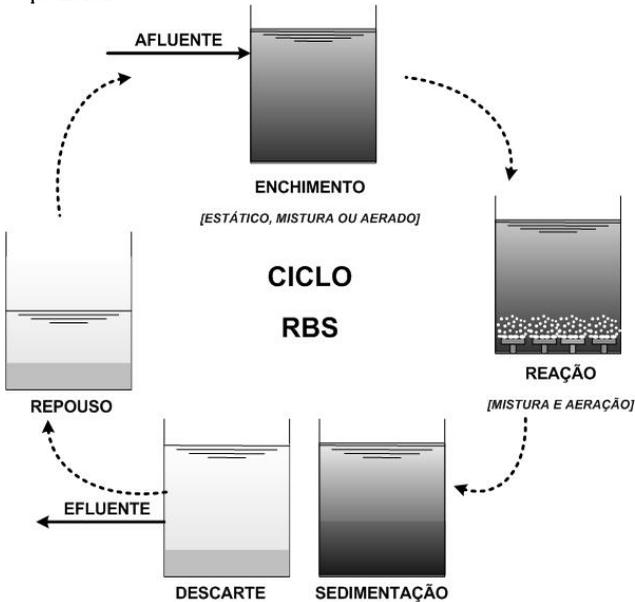
(1) *Fase de Enchimento*: O preenchimento do esgoto dentro do reator pode ser realizado através de (i) Enchimento estático promovendo condições anaeróbias para fermentação; (ii) Enchimento com mistura sem aeração fornecendo condições de anoxia; e (iii) Enchimento com reação, a qual ocorre por um pulso aerado (GERARDI, 2010). No enchimento estático (i) a absorção da matéria orgânica é realizada em condições anaeróbias, promovendo o crescimento de organismos heterotróficos de crescimento lento e evitando os organismos filamentosos. Neste caso, é importante

ressaltar que, o tempo de contato entre a biomassa (em forma de cama de lodo no fundo do reator) e o afluente é um importante fator para a apropriada conversão do substrato desejado. No enchimento agitado (ii) sem aeração, o nitrato é utilizado pelas bactérias facultativas para a degradação da matéria orgânica do afluente, promovendo a desnitrificação. Já no enchimento com reação (iii), a matéria orgânica é degradada aerobicamente promovendo a proliferação de organismos heterotróficos de crescimento rápido.

- (2) *Fase de reação:* Após a entrada do esgoto, inicia-se a aeração realizando a mistura completa no líquido com a biomassa. Nesta fase acontece a degradação do carbono remanescente do enchimento, a nitrificação e a absorção do fósforo, este último caso o enchimento estático tenha sido empregado. O oxigênio dissolvido nesta fase é normalmente maior que 2 mg L^{-1} para promover boas eficiências na remoção de amônia. A fase de aeração pode ser alternada com períodos anóxicos, dependendo da necessidade de desnitrificação (LOCHMATTER; GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2013).
- (3) *Fase de sedimentação:* Esta fase é equivalente ao decantador secundário do sistema convencional. Seguido da reação, o tempo de sedimentação da biomassa é necessário para separar a biomassa do efluente tratado. Caso os sólidos e biomassa não sedimentem ou se compactem apropriadamente, estes serão removidos do reator durante o descarte. Este fenômeno é conhecido como *wash out* da biomassa e pode ser evitado quando se define o tempo de sedimentação em função da velocidade de sedimentação do lodo. A técnica de *wash out* também pode ser utilizada quando se deseja descartar do sistema partículas com sedimentabilidade ruim, mas neste caso o efluente não estará adequado para ser lançado no corpo receptor.
- (4) *Fase de Descarte:* O descarte do efluente tratado é realizado nesta etapa, a biomassa permanece no reator. Desta forma, o esvaziamento do tanque não é completo, tendo uma troca volumétrica que varia de 25-50% do volume do reator (GERARDI, 2010).
- (5) *Fase de Repouso (opcional):* Esta fase é utilizada para o ajuste do tempo entre o final de um ciclo e o início do outro quando

necessária e para realizar a remoção de lodo excedente.

Figura 3: Esquema ilustrativo do funcionamento de um reator em bateladas sequenciais



Fonte: Próprio autor.

Adaptações podem ser feitas nos ciclos, como a inserção de fase anaeróbia/anóxica na reação, ou a realização do enchimento escalonado, por exemplo, a fim de aprimorar o processo de desnitrificação (LAMEGO NETO; COSTA, 2011; VOLTOLINI, 2015). A escolha pela configuração do ciclo e a duração das fases depende do tipo da água residuária, carga aplicada, e dos micro-organismos que se deseja selecionar em função da qualidade do efluente que é exigida. Esta flexibilidade do sistema traz vantagens para o sistema RBS, pela simples adaptação do ciclo frente à mudança de cargas e ainda podendo alcançar remoções completa dos nutrientes. Porém, acoplado a estas vantagens, o RBS apresenta desvantagens quando comparado com o sistema convencional: necessita de um nível mais elevado de sofisticação e de manutenção em função dos temporizadores e equipamentos automatizados; necessidade de descartar lodo e requerimento de tanque de equalização em alguns casos (USEPA, 2000).

A tecnologia RBS é bastante apropriada para desenvolver a

biomassa granular aeróbia (mostrada no item 2.2), a qual intensifica o processo quanto às remoções de nutriente e melhora a sedimentabilidade do lodo, quando comparado ao RBS operado com biomassa floculenta usual.

2.2 TECNOLOGIA DE LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA)

A tecnologia de LGA é baseada na rápida sedimentação de biofilmes esféricos, chamados "grânulos", obtidos pela auto agregação de micro-organismos (SEVIOUR et al., 2012; WEISSBRODT et al., 2013a). Grânulos aeróbios possuem uma estrutura física densa de biofilme, que confere à biomassa uma boa propriedade de decantação, alta retenção no sistema (elevada idade do lodo) e a habilidade de suportar altas cargas de águas residuárias e choques de carga (LIU; TAY, 2004).

O primeiro marco da tecnologia LGA foi com Mishima e Nakamura (1991) quando descobriram os grânulos aeróbios enquanto investigavam a auto-imobilização de lodo ativado em um reator piloto aplicando o processo aeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*Aerobic Upflow Sludge Blanket* – AUSB) para tratar esgoto municipal. Ainda nos anos noventa, o estudo de bancada de Morgenroth et al. (1997) deu início à extensa pesquisa de formação dos grânulos aeróbios em RBS para o tratamento de esgoto. Desde então, a tecnologia RBS tem sido amplamente aplicada para os processos de LGA.

A patente do processo para tratamento de esgoto com lodo granular foi concedida no início dos anos 2000 a Mark van Loosdrecht e Merle de Kreuk (VAN LOOSDRECHT; DE KREUK, 2004). Logo em seguida a Universidade Técnica de Delft junto com a empresa Royal Haskoning DHV batizaram a tecnologia comercialmente como Nereda[®]. Depois de utilizar a tecnologia em várias aplicações industriais a partir de 2006, a primeira planta em escala real municipal foi inaugurada em 2011 na cidade de Epe e a segunda em 2013 em Garmerwolde, ambas na Holanda (GIESEN; THOMPSON, 2013). A partir de então, a tecnologia LGA se espalhou pelo mundo com mais de 30 plantas sendo construídas ou já sendo operadas atualmente nos continentes da Europa, África, Ásia, Oceania e América do Sul. No Brasil, a primeira planta Nereda[®] foi recentemente inaugurada (Maio/2016) no Rio de Janeiro (RJ) pela parceria das empresas DHV, Foz Águas 5 e Odebrecht Ambiental para tratar o esgoto de até 480.000 pessoas.

Embora a tecnologia demonstre grande potencial no tratamento de efluentes para remoção de nutrientes em escala real, o período de

formação dos grânulos (*start-up*) ainda tem se mostrado longo (aproximadamente 6 meses) (PRONK et al., 2015). Até mesmo em estudo de laboratório com esgoto sintético e condições controladas, os grânulos levam de 50-100 dias para serem formados (EBRAHIMI et al., 2010; WEISSBRODT et al., 2012). Desta forma, a granulação precisa ser investigada e seu tempo ser otimizado, uma vez que a estratégia de inocular reatores com grânulos significa dispor de espaço, custo e ainda contar com a possibilidade da desintegração dos grânulos no armazenamento ou até mesmo no processo de *start-up* (ADAV; LEE; LAI, 2009; LIU et al., 2011). Além disso, pouca informação é disponível quando se trata da aplicação da tecnologia de LGA para o tratamento de esgoto sanitário de baixa carga (ARAÚJO et al., 2016; DE KREUK; LOOSDRECHT, 2006; ISANTA et al., 2012; JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; LI et al., 2014; NI et al., 2009; WAGNER et al., 2015a), o que foi mostrado como um fator que retarda ainda mais o processo de granulação.

A realidade de clima e a composição do esgoto de cada lugar se diferenciam e podem afetar diretamente na atividade dos micro-organismos e conseqüentemente na eficiência dos processos de remoção (BASSIN et al., 2012). Desta forma, estudos locais e em menores escalas são de extrema importância para uma melhor compreensão dos processos e amparar assim a funcionalidade do sistema em escala real. Os estudos realizados no contexto brasileiro demonstraram que junto às dificuldades com a estabilidade dos grânulos (XAVIER, 2017), problemas relacionados à eficiência do tratamento com remoção de fósforo e acúmulo de nitrito se reproduziram (AKABOCI, 2013; JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; WAGNER, 2015; WAGNER; COSTA, 2013, 2015). Outros estudos também reportaram o acúmulo de nitrito no tratamento de esgoto doméstico com LGA (COMA et al., 2012; ISANTA et al., 2012). Durante a última década, pesquisadores têm focado, principalmente, no desenvolvimento do processo de LGA de escala de bancada à escala real, em uma perspectiva de engenharia de processos. Considerando que as mais recentes investigações microbiológicas foram em sua maioria conduzidas sob condições bem definidas com esgoto sintético, nos dias de hoje e nos próximos anos os estudos do LGA se focam no impacto da alta complexidade das condições de esgoto real e na dinâmica microbiana dos processos envolvidos, no sentido de otimizar o desempenho de tratamento nas grandes escalas com suas diferentes realidades locais (BASSIN, 2012; EBRAHIMI et al., 2010; WEISSBRODT et al., 2012, 2013a; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014; WINKLER et al., 2013)

2.2.1 O LGA e sua formação

Em sistemas convencionais de lodo ativado, micro-organismos e pequenas partículas presentes no esgoto formam pequenos agregados ou flocos (50-300 µm em tamanho). Sob condições especiais, estes agregados podem se tornar bem maiores e compactos formando grânulos (0,2-5 mm). Grânulos foram primeiramente reportados em biorreator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente (UASB) (LETTINGA; VELSEN; HOBMA, 1980). A explicação para a granulação anaeróbia é a ocorrência da justaposição de microcolônias sintróficas, o que também acontece para os grânulos aeróbios. Apesar da aplicação consolidada do lodo granular anaeróbio no tratamento de águas residuárias, os estudos sobre lodo granular aeróbio são recentes, sendo sua definição divulgada durante o primeiro encontro sobre lodo granular aeróbio ocorrido em 2004 (DE KREUK; DE BRUIN; VAN LOOSDRECHT, 2005) sendo:

“Granules making up aerobic granular activated sludge are to be understood as aggregates of microbial origin, which do not coagulate under reduced hydrodynamic shear, and which settle significantly faster than activated sludge flocs.”

Grânulos aeróbios sendo agregados (*aggregates of microbial origin*) de micro-organismos ativos junto a componentes de origem microbiana (como proteínas, EPS, etc.). A característica de não coagular (*do not coagulate under reduced hydrodynamic shear*) se refere na diferença de comportamento entre lodo ativado, o qual tende a flotar em condições de baixa agitação e aeração, enquanto o lodo granular aeróbio não flota e se estabelece como unidades separadas. Quanto à sedimentação significativamente mais rápida do que os flocos (*which settle significantly faster than activated sludge flocs.*), implica nas características de índice volumétrico de lodo (IVL), onde grânulos apresentam IVL30, 10 e 5 muito próximos, indicando a rápida sedimentação dos mesmos. Além destas propriedades gerais dos grânulos aeróbios, o tamanho mínimo específico das partículas que definem grânulos foi definido em 200µm (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007).

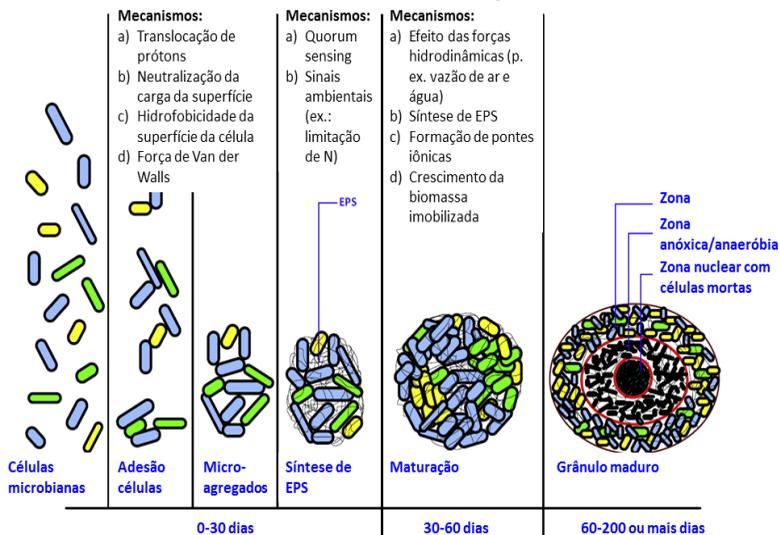
A formação dos grânulos ocorre sem o auxílio de um material suporte físico, uma vez que ocorre a autoagregação das células formando um biofilme granular. Este processo de autoimobilização envolve forças físicas, interações químicas e biológicas. Para se ter o grânulo e o processo desejado e controlado, a compreensão do desenvolvimento de grânulos é a chave da tecnologia. Porém, apesar de alguns mecanismos de granulação serem propostos, este processo ainda

não foi totalmente elucidado (SARMA; TAY; CHU, 2017).

2.2.1.1 Mecanismos propostos de granulação

Ainda no início das pesquisas com os grânulos aeróbios Beun et al. (1999) já propuseram um mecanismo de granulação. Segundo estes autores, o processo de desenvolvimento dos grânulos se inicia com os fungos, os quais formam micélios mais pesados que as bactérias ficando assim retidos no reator. Como resultado da força de cisalhamento, os fungos formam agregados de até 5-6 mm e servem como uma matriz de imobilização para que as bactérias cresçam em colônias. Por falta de oxigênio do interior destes grânulos, ocorre a lise do agregado de micélios, mas os agregados microbianos conseguem permanecer no reator por terem tamanho suficiente para sedimentar.

Recentemente, foi proposto um mecanismo de granulação mais detalhado que consiste em quatro etapas (Figura 4): sendo: (i) Inicial ligação célula-célula promovidas por mecanismos de translocação de prótons, neutralização de carga na superfície, hidrofobicidade da superfície da célula e forças de Van der Waals; (ii) Desenvolvimento de micro-agregados por estas células auto-ligadas; (iii) Extensa biossíntese de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) pelos micro-organismos agregados estimulados por *quorum sensing* e estresses ambientais como limitação de nutrientes; e (iv) Maturação de grânulos continuando a síntese de EPS em resposta aos parâmetros hidrodinâmicos externos aplicados pela configuração do reator e condições de operação (ZHANG; HU; LEE, 2016).

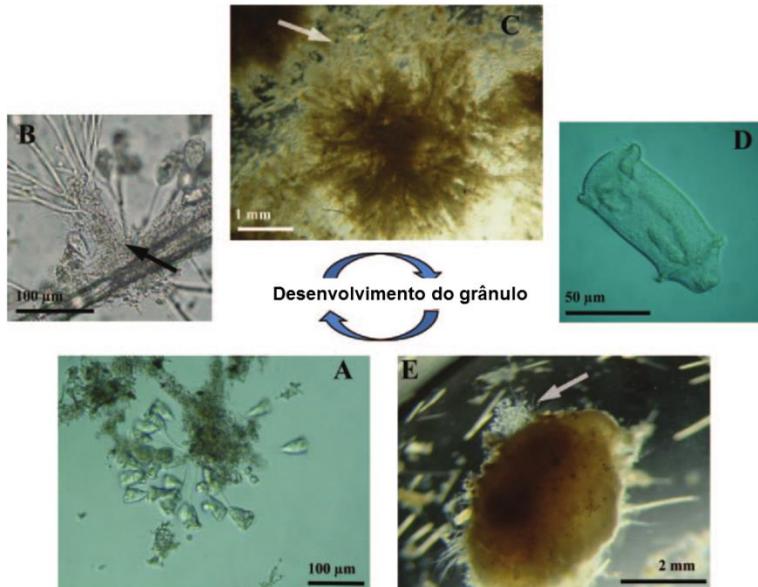
Figura 4: Representação esquemática do processo de formação de grânulos aeróbios e dos mecanismos envolvidos em cada etapa.

Fonte: adaptado de Sarma; Tay; Chu (2017).

O processo de granulação também pode sofrer influência dos protozoários, os quais são identificados em grânulos formados a partir de esgoto com presença de material particulado (JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; LEMAIRE; WEBB; YUAN, 2008; WAGNER et al., 2015a; WEBER et al., 2007). No estudo de Weber et al. (2007), realizado com esgotos ricos em material particulado, foi observada a presença de protozoários ciliados, fungos e a participação deles no processo de granulação, ilustrado na Figura 5. Em uma primeira fase (i) ocorre a formação de flocos, onde os ciliados se estabelecem em outros organismos ou em partículas (Figura 5 A). Ainda nesta primeira fase acontece o crescimento volumoso dos protozoários (exemplo *Epistylis* sp.) e o início da colonização de bactérias nas hastes dos ciliados (mostrado com a seta preta na Figura 5 B). Na fase 2 (ii), ocorre a proliferação das bactérias, cobrindo completamente os ciliados que morrem e geram o desenvolvimento do núcleo granular e o crescimento do grânulo. Portanto, é formada uma densa zona no interior do grânulo que consiste em bactérias e restos das hastes dos protozoários. Deste modo, os remanescentes celulares dos ciliados atuam como uma "espinha dorsal" (Figura 5 C). Por fim, na fase 3 (iii) grânulos maduros e compactos são formados e servem como novo substrato para outras

células de protozoários (Figura 5D) que se agregam na superfície do grânulo (Figura 5 E).

Figura 5: Representação do desenvolvimento de grânulos aeróbios formados quando cultivados em substrato contendo material particulado.



Fonte: Weber et al. (2007)

2.2.1.2 Fatores determinantes para granulação

Os grânulos formados variam quanto à morfologia, tamanho e qualidade de sedimentação frente às diferentes condições específicas de cada caso. Condições que se diferenciam quanto ao tipo de substrato, carga orgânica aplicada, força de cisalhamento hidrodinâmico aplicada, tempo de sedimentação, tempo de retenção hidráulica, fase de fome “*starvation*”, presença de íons cálcio no afluente, regime de enchimento, oxigênio dissolvido, pH e temperatura, inóculo, configuração do reator e presença de inibidores como amônia livre (LIU; TAY, 2004). Dentre estas condições, os principais fatores que determinam a formação de lodo granular, tanto anaeróbico quanto aeróbico, são: a seleção pela velocidade de sedimentação no reator, a força de cisalhamento aplicada e a velocidade de crescimento dos organismos envolvidos (DE KREUK; DE BRUIN; VAN LOOSDRECHT, 2005).

Um atributo físico importante dos grânulos aeróbios é a sua velocidade de sedimentação. Os grânulos podem sedimentar com uma velocidade variando de 25 a 70 m h⁻¹, que são significativamente mais rápidos do que flocos com 7 a 10 m h⁻¹ (QIN; LIU; TAY, 2004). Portanto, uma das técnicas mais utilizada para a formação dos grânulos em RBS é aquela que utiliza alta pressão de seleção das partículas aplicando baixos tempos de sedimentação. Sob estas condições, os flocos de lodo ativado que sedimentam mal serão lavados do reator (*wash out*), ficando apenas os núcleos que sedimentam bem (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2002). Junto ao reduzido tempo de sedimentação, altas razões de troca volumétrica (30-70%) e baixos tempos de retenção hidráulica (tipicamente 6 horas) têm sido eficientes para selecionar a biomassa com altas velocidades de sedimentação e induzir a rápida formação dos grânulos aeróbios (BEUN et al., 1999; MORGENROTH et al., 1997).

A turbulência hidrodinâmica causada pelas altas velocidades de aeração ascendente aplicadas nos reatores atua como força de cisalhamento ajudando também na formação dos grânulos. A força de cisalhamento desencadeia a produção de polissacarídeos nas células, que por sua vez resulta numa estrutura de biofilme equilibrada sob as condições hidrodinâmicas dadas. O EPS produzido aumenta a hidrofobicidade das células e conseqüentemente seu potencial de adesão (TAY; LIU; LIU, 2001a). Além de induzir produção de EPS, as altas velocidades de aeração aumentam a atividade de respiração dos micro-organismos aeróbios, erodem o grânulo propiciando uma superfície lisa, e fornecem suficiente oxigênio para a degradação de substrato (SHOW; LEE; TAY, 2012).

A velocidade de crescimento dos micro-organismos aparenta ser um dos principais fatores responsável pela densidade dos grânulos. Organismos de rápido crescimento produzem biofilmes menos densos do que os organismos de crescimento lento. Por exemplo, nitrificantes formam um biofilme mais pesado do que organismos heterotróficos sob as mesmas circunstâncias (VILLASEÑOR et al., 2016). Quanto aos grânulos aeróbios, de Kreuk (2006) afirma que para obter grânulos estáveis, densos e uniformes, a velocidade de crescimento dos organismos deve ser reduzida. Esta informação vai ao encontro do primeiro mecanismo de desintegração descrito abaixo.

2.2.1.3 Estabilidade e desintegração dos grânulos

A deterioração da estabilidade dos grânulos ao longo do tempo

é uma questão importante da granulação aeróbia, que pode ser uma barreira para a operação desta tecnologia em escala real. Alguns estudos têm mostrado que os grânulos aeróbios se desintegrariam após uma operação prolongada. Mecanismos foram propostos para explicar a perda de estabilidade dos grânulos, sendo (i) o crescimento de organismos filamentosos, (ii) hidrólise do núcleo do grânulo, e (iii) o papel dos EPS (LEE et al., 2010).

- (i) Velocidade elevada de crescimento da biomassa estimula a proliferação de micro-organismos filamentosos ocasionando em grânulos de tamanho maior, de estrutura frouxa e de baixa densidade. O crescimento excessivo de bactérias filamentosas pode levar a grânulos fofos (*fluffy*) e dispersos que podem ser facilmente lavados para fora do reator (ZHENG et al., 2006). Diferentes estudos têm reportado a deterioração das propriedades de sedimentação dos grânulos aeróbios por filamentosas (MORGENROTH et al., 1997). De acordo com (LIU; LIU, 2006), o crescimento de filamentosas em reatores de LGA pode ser desencadeado por diferentes fatores, como longo tempo de retenção hidráulica, baixa concentração de substrato na fase líquida, gradiente de substrato no biofilme granular, deficiência de OD e nutrientes dentro dos grânulos. Temperaturas mesofílicas (35°C) é outro fator que contribui para selecionar organismos filamentosos em sistemas de LGA (WEBER et al., 2007).
- (ii) Quando os grânulos crescem muito de tal forma que o seu raio é maior do que o limite de transferência de massa, podem desenvolver-se condições anaeróbias no centro do grânulo. Subseqüentes metabólitos anaeróbios como ácidos graxos e biogás podem enfraquecer a estrutura interna do grânulo resultando na desintegração (ADAV; LEE; LAI, 2009)
- (iii) Os β -polissacarídeos não solúveis formam a camada exterior dos grânulos aeróbios para resistir ao cisalhamento. Por outro lado, o núcleo granular composto de proteínas proporciona estabilidade mecânica ao grânulo. Zhang et al., (2007) reportaram que a remoção seletiva de proteínas apresentou impactos mínimos na estabilidade estrutural dos grânulos, enquanto que a hidrólise dos β -polissacarídeos causou sua desintegração. Portanto, a estrutura de grânulos é suportada por uma rede composta principalmente de β -polissacarídeos como suporte para a incorporação de proteínas, lipídios, α -polissacarídeos e células (SHOW; LEE; TAY, 2012). O papel

dos EPS será melhor discutido adiante na seção (2.2.2.2).

2.2.2 Composição do LGA

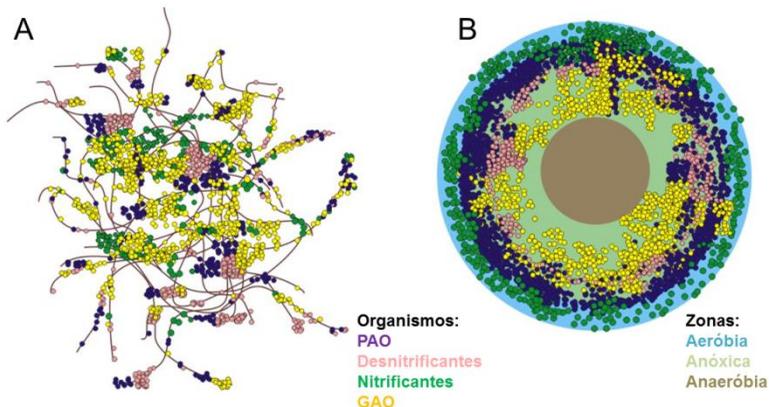
2.2.2.1 Camadas dos grânulos

A estrutura do LGA é dependente da operação do reator, assim como a seleção de espécies e crescimento morfológico. Os grânulos aeróbios possuem uma estrutura heterogênea, onde diferentes camadas podem ser identificadas: normalmente contendo alta densidade de biomassa no exterior do grânulo e baixa densidade de biomassa no interior (WANG; LIU; TAY, 2005). A camada externa é composta por grandes protuberâncias como “couve-flores”, contendo vazios e canais, os quais desempenham um papel chave no transporte de substratos e metabólitos dentro e fora do grânulo (ZHENG; YU, 2007). Estas protuberâncias consistem, principalmente, de bactérias, cílios pedunculados, fungos filamentosos e EPS (matriz de polímeros, incluindo polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, fosfolípídeos e ácidos húmicos), os quais fornecem o material coesivo que mantém a ligação entre as bactérias.

Os grânulos aeróbios são compostos por uma ampla diversidade de micro-organismos. A população microbiana do lodo granular aeróbio é semelhante àquela dos lodos ativados, porém se diferencia quanto à estruturação do biofilme. O lodo floculento (Figura 6 A) de estações de tratamento de esgoto convencionais é submetido a ambientes aeróbios e anaeróbios e as diferentes disponibilidades de substrato por meio da recirculação deste pelos diferentes compartimentos/tanques. Já a estrutura do grânulo possui diferentes camadas e nichos microbiológicos como resultado do gradiente de oxigênio e substrato que se forma entre a superfície e o interior do grânulo (de KREUK; LOOSDRECHT, 2006). Este fenômeno possibilita a remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo de águas residuárias. Portanto, todas as conversões podem ocorrer nas diferentes camadas dentro da biomassa granular, em apenas um reator com alternância dos períodos aeróbios e anaeróbios em bateladas sequenciais. A profundidade dos grânulos e as limitações do transporte de massa definem o tamanho de cada camada aeróbia/anóxica/anaeróbia, resultando na estratificação das bactérias. Esta profundidade depende da velocidade de consumo de oxigênio e também da porosidade do grânulo. Nitrificantes estão localizadas nas camadas externas, onde há penetração de oxigênio, enquanto que as

desnitrificantes e os PAO e GAO se estabilizam em camadas anóxicas e anaeróbias internas (Figura 6 B) (WINKLER et al., 2013).

Figura 6: Diferença estrutural entre A) lodo flocculento e B) lodo granular aeróbio.



Fonte: Winkler et al. (2013)

2.2.2.2 O papel das substâncias poliméricas extracelulares (EPS)

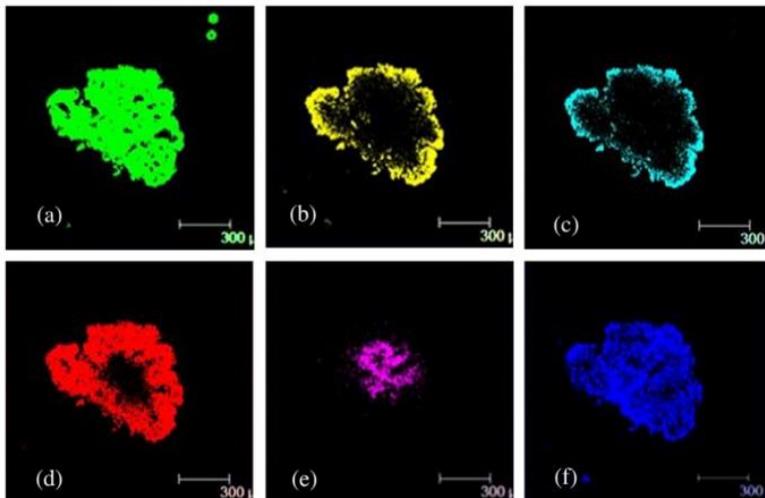
EPS são produtos metabólicos acumulados na superfície das células bacterianas, os quais alteram as características físico-químicas da superfície celular, como carga, hidrofobicidade e outras propriedades. As bactérias segregam EPS viscosos que constituem de proteínas, polissacarídeos, ácidos húmicos e lipídios que ajudam a iniciar o processo de granulação aeróbica (LIU; TAY, 2004) Na maioria dos biofilmes, os micro-organismos são responsáveis por menos que 10% da massa seca, enquanto que a matriz de EPS é responsável por mais de 90% (WINGENDER; NEU; FLEMMING, 1999).

Até o momento, pouco se sabe sobre os EPS em biofilmes de LGA. Diferentes estudos têm investigado a produção e evolução da composição dos EPS em LGA. Wang, Liu e Tay (2005) determinaram que os β -polissacarídeos não solúveis formam a camada externa de grânulos aeróbios proporcionando resistência sob o cisalhamento. Aday, Lee e Tay (2008) hidrolisaram seletivamente proteínas, α - e β -polissacarídeos e lipídios utilizando enzimas e determinaram a alteração de estabilidade dos grânulos após a hidrólise. Estes investigadores notaram que, embora as proteínas fossem abundantes nas regiões do núcleo, a remoção seletiva delas teve impacto mínimo sobre a

estabilidade estrutural dos grânulos. Inversamente, a hidrólise de β -polissacarídeos causou desintegração da biomassa granular. Portanto, os β -exopolissacarídeos insolúveis e não-biodegradáveis, como celulose e quitina, têm sido sugeridos como sustentadores da estrutura granular, onde servem como “esqueleto” para proteínas, α -polissacarídeos, lipídeos e células (WANG; LIU; TAY, 2005). Adav et al. (2008) mostraram a distribuição dos EPS (proteínas, lipídios, α - e β -polissacarídeos) e das células no LGA (Figura 7).

WANG et al. (2006) analisaram a dinâmica de produção e consumo de EPS durante o período de granulação, e durante os ciclos operacionais de RBS. Como resultado, eles obtiveram que os EPS foram principalmente produzidos durante as fases exponenciais, e que aproximadamente 50% do EPS foi consumido durante as fases de “fome”. De acordo com os autores, o EPS consumido serve como fonte de carbono e energia para sustentar o crescimento dentro dos grânulos. Estudos adicionais têm reportado que a fração de proteínas dos EPS é principalmente desenvolvida durante a formação dos grânulos aeróbios e, têm sido apontadas como um fator importante na coesão na arquitetura do biofilme granular (ZHANG et al., 2007).

Figura 7: Distribuições no LGA de proteínas, lipídios, α - e β -polissacarídeos, células e células mortas. **(a)** Proteínas em verde; **(b)** Lipídeos em amarelo; **(c)** α -polissacarídeo em azul claro; **(d)** Células totais em vermelho; **(e)** Células mortas em violeta; **(f)** β -polissacarídeos em azul escuro.



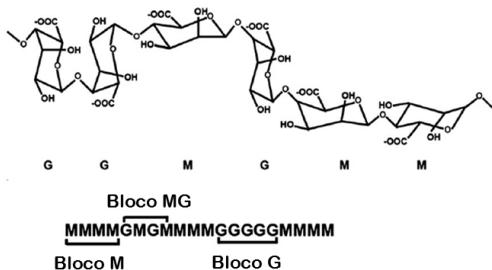
Fonte: adaptado de Adav et al. (2008)

Exopolissacarídeos bacterianos foram extraídos de grânulos aeróbios e notou-se que o extrato se comportava como o polímero alginato, sendo conhecido atualmente como ALE (*alginate-like exopolymer*) (LIN et al., 2008). O alginato é da família de polissacarídeos extracelulares produzidos por algas e bactérias. Ele é composto pelos monômeros β -D-ácido manurônico (bloco M) e α -L-gulurônico (bloco G), onde os blocos G promovem a capacidade de formar gel quando se ligam com cátions divalentes como sódio e cálcio (Figura 8A) (GRANT et al., 1973). Consideráveis quantidades de exopolímeros do tipo alginato (ALE) de ETE reais que utilizam a tecnologia de LGA foram extraídas (FELZ et al., 2016; LIN et al., 2010; LIN; SHARMA; VAN LOOSDRECHT, 2013). Dentro dos EPS granulares, os exopolissacarídeos foram identificados como o principal constituinte de formação de gel (LIN et al., 2010; SEVIOUR et al., 2009b).

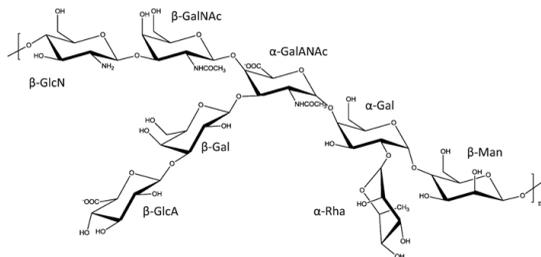
Seviour et al. (2009a, 2009b) demonstraram que os grânulos aeróbios cultivados a partir de águas residuárias de matadouro eram hidrogéis de proteína-polissacarídeo. SEVIOUR et al. (2009b) extraíram EPS de grânulos aeróbios e de lodo floculento, e notaram características reológicas distintas entre os dois. Especificamente, o EPS de grânulos aeróbios apresentou formação de gel a um pH de 9; enquanto que a partir do lodo floculento a pH 4-5. Isto significa que os EPS de grânulos aeróbios presentes em ETE convencionais (pH 6-8,5) comportam-se como um gel forte, e como uma solução para o lodo floculento. Os polissacarídeos e glicosídeos, tais como os proteoglicanos, têm sido a chave para a geleificação de EPS. Os EPS do LGA possuem três componentes: (i) polissacarídeo de elevado peso molecular, (ii) proteínas e glicosídeos de médio peso molecular e (iii) proteínas e glicosídeos de baixo peso molecular (SEVIOUR et al., 2010a). Apenas o polissacarídeo de elevado peso molecular apresentou o comportamento de formação de gel característico de grânulos aeróbios e foi considerado como um agente geleificante para granulação. A estrutura deste polissacarídeo de elevado peso molecular foi elucidada como um heteropolissacarídeo único, altamente complexo com uma sequência repetida dos monômeros: α -galactose, β -manose, β -glucosamina, N-acetil- β -galactosamina e 2-acetoamido-2-desoxi- α -galactopirano-rônico (Figura 8B) (SEVIOUR et al., 2010b). A síntese deste polissacarídeo formador do gel estrutural, também chamado de “*Granulan*”, foi apenas realizada em condições de operação seletivas para “*Ca. Competibacter*” (SEVIOUR et al., 2011).

Figura 8: Ilustrações das estruturas propostas dos exopolissacarídeos do lodo granular aeróbio. **(A)** Estrutura do alginato e seus monômeros como sendo similar aos dos exopolissacarídeos do LGA, o qual se comportou como este polímero, conhecido como *ALE* proposto por (LIN et al., 2008); **(B)** Estrutura do *Granulan* proposta por (SEVIOUR et al., 2010b).

A Composição do Alginato – “ALE”
Estrutura similar proposta para os exopolissacarídeos de LGA



B Composição do “Granulan”
Estrutura proposta para os exopolissacarídeo de LGA



Fonte: adaptado de Lin et al. (2008) e Seviour et al. (2010b)

Weissbrodt et al. (2013a) demonstraram, para grânulos predominadas com “*Ca. Accumulibacter*” e “*Ca. Competibacter*”, a presença de diferentes tipos de matrizes de glicoconjugados (moléculas de carboidratos aderidos a lipídeos e/ou proteínas). Esta observação indicou que a composição dos exopolissacarídeos de grânulos é provavelmente mais complexa do que o relato dos dois únicos polímeros -“Granulan” e “ALE” - descritos acima. Os autores demonstram a

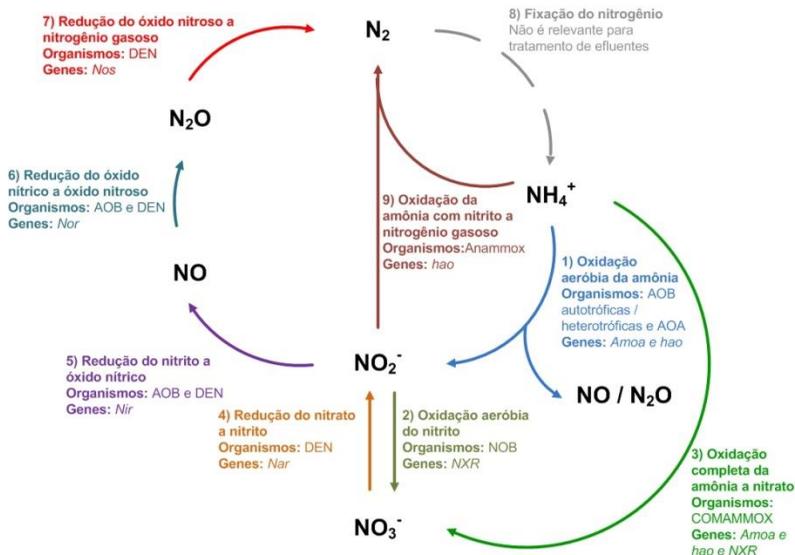
necessidade por outras investigações que abordem as relações dos EPS com as populações microbianas envolvidas.

2.3 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NUTRIENTES

2.3.1 Conversões biológicas do nitrogênio

A necessidade da remoção de nitrogênio de águas residuárias surge pela preocupação da qualidade da água quanto (1) ao efeito da amônia no corpo receptor com respeito à concentração de oxigênio dissolvido e toxicidade aos peixes, (2) à necessidade de fornecer remoção de nitrogênio para controlar a eutrofização, e (3) à necessidade de fornecer o controle de nitrogênio para aplicações e reuso da água incluindo a recarga de águas subterrâneas (METCALF; EDDY, 2003). Em ETE, a amônia pode ser biologicamente convertida ao gás nitrogênio, inerte e não agressivo ao meio ambiente. Porém, até hoje não se sabe de nenhum micro-organismo capaz de converter sozinho e completamente a amônia ao nitrogênio gasoso. Portanto, a remoção de nitrogênio no tratamento de efluentes se dá pela combinação dos processos de nitrificação e desnitrificação. A Figura 9 ilustra as conversões do nitrogênio descrevendo os organismos capazes de realizar cada etapa com os genes que codificam as enzimas que participam de cada processo.

Figura 9: Conversões biológicas do nitrogênio. Etapas de 1 a 3 compreendem na nitrificação e etapas de 4 a 7 na desnitrificação.



Fonte: Adaptado de Kampschreur et al. (2009), com inclusão da rota metabólica 3, recentemente reportada por Daims et al. (2015) e Van Kessel et al. (2016).

2.3.1.1 Nitrificação

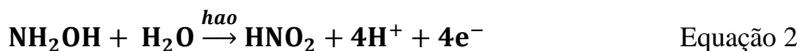
O nitrogênio nas águas residuárias geralmente se apresenta na forma de amônia (NH_4^+), o qual é geralmente removido via nitrificação (Etapas 1 a 3 na Figura 9). A nitrificação é realizada por quatro grupos diferentes de micro-organismos: bactérias oxidadoras de amônia (AOB – *ammonium-oxidizing bacteria*) e arqueas oxidadoras de amônia (AOA – *ammonium-oxidizing archaea*) que convertem a amônia em nitrito (Etapa 1 da Figura 9); bactérias oxidadoras de nitrito (NOB – *nitrite-oxidizing bacteria*) que convertem nitrito em nitrato (Etapa 2 da Figura 9); e recentemente foi descoberta a bactéria COMAMMOX (*COMplete AMMonia OXidiser*), capaz de oxidar amônia a nitrato (Etapa 3 da Figura 9).

A primeira reação de oxidação da amônia realizada pelas AOB é catalisada pelas enzimas amônia monooxigenase (*amoA*) (Equação 1) e hidroxilamina oxidoreductase ou hidroxilamina desidrogenase (*hao*) (Equação 2). A segunda reação da nitrificação realizada pelas NOB é mediada pela enzima nitrito oxidoreductase (*nxr*) (Equação 4) (KANEHISA et al., 2017). Já as Comammox possuem em seu genoma os genes *amoA*, *hao* e *nxr* e assim são capazes de realizar a nitrificação

completa de amônia a nitrato (DAIMS et al., 2015; VAN KESSEL et al., 2016).

Nas ETE, a nitrificação é predominantemente realizada por AOB e NOB autotróficos, que utilizam nitrogênio amoniacal ou nitrito como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono. As arqueas também são capazes de realizar a oxidação da amônia (AOA) (KÖNNEKE et al., 2005). A nitrificação também pode ser realizada por bactérias heterotróficas que, no entanto, não ganham energia a partir desta conversão. Embora não hajam indicações de que as bactérias heterotróficas e as arqueas oxidadoras de amônia desempenhem um papel significativo em plantas convencionais de lodos ativados, estes organismos podem ser significativos na produção de óxido nitroso (N₂O) (ANDERSON et al., 1993).

A amônia é oxidada de acordo com as seguintes reações químicas:



A amônia é usada como doadora de elétrons, e o oxigênio como receptor final de elétrons. A energia livre de Gibbs (ΔG°) liberada é de -175 kJ.mol⁻¹. Os micro-organismos mais comuns na oxidação da amônia em sistemas de tratamento de esgoto são do gênero *Nitrosomonas*, (incluindo *Nitrosococcus mabilis*) e *Nitrosospira* pertencentes à classe β -*Proteobacteria*. *Nitrosospira* spp. são mais abundantes em baixas concentrações de amônia, enquanto que *Nitrosomonas* spp. se proliferam sob altas concentrações deste substrato (SCHRAMM et al., 1998).

A oxidação da amônia também pode ser realizada anaerobicamente pelas bactérias anammox (*anaerobic ammonium-oxidizing bacteria*), onde a bactéria cresce pela oxidação da amônia e redução de nitrito, utilizando CO₂ como única fonte de carbono. Embora tenham sido negligenciadas por um longo tempo, as bactérias anammox são encontradas em uma enorme diversidade de espécies em ambientes anóxicos que contém nitrogênio fixo (KARTAL et al., 2013).

O nitrito é oxidado a nitrato pelas bactérias NOB em uma simples etapa, representada pela Equação 4.



O nitrito atua como doador de elétrons durante a respiração das NOB, enquanto o oxigênio é o receptor final de elétrons. A energia livre de Gibbs liberada da oxidação do nitrito é de apenas -74 kJ.mol^{-1} . A consequência é uma baixa velocidade de crescimento, mesmo quando comparada com as AOB. Na maioria das ETE, as NOB dominantes são membros do gênero *Nitrospira*. Este gênero é parte do filo bacteriano *Nitrospirae*, e desta forma não está filogeneticamente próximo aos outros NOB conhecidos, os quais são todos *Proteobacteria*. As *Nitrospira* são bactérias de crescimento lento e de difícil cultivo em laboratório. Já as *Nitrobacter* são de fácil cultivo e por isso, no passado, o organismo considerado mais abundante nas ETE (WARD; ARP; KLOTZ, 2011). Em estudo recente, Saunders et al., (2016) caracterizaram a comunidade microbiana de 13 ETE dinamarquesas, negando a informação de que *Nitrospira* é a NOB predominante, demonstrando a maior abundância do gênero *Nitrotoga* (classe β -*Proteobacteria*). Mesmo que *Nitrospira* não seja a NOB mais abundante nas ETE, estes organismos foram descobertos ser bactérias completamente nitrificante (Comammox). O genoma deste organismo quimiolitotrófico codifica as rotas de oxidação de amônia e de nitrito, as quais são concomitantemente expressas durante o crescimento pela oxidação de amônia a nitrato. Esta recente descoberta muda fundamentalmente a imagem do processo de nitrificação e aponta para a *Nitrospira* (nitrificante completa) como um agente chave das comunidades microbianas no ciclo do nitrogênio (DAIMS et al., 2015).

2.3.1.2 Desnitrificação

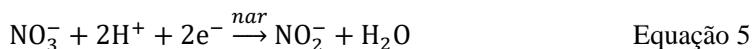
Os produtos da nitrificação, nitrito e nitrato, quando liberados nos corpos d'água provocam a desestabilidade dos ecossistemas. Desta forma, estes compostos precisam ser reduzidos por organismos desnitrificantes. A desnitrificação é realizada por grupos de bactérias e arqueas metabolicamente diversos, que realizam a oxidação de substratos orgânicos ou inorgânicos e a redução de nitrato (etapa 4, Figura 9), nitrito (etapa 5, Figura 9), NO (etapa 6, Figura 9) e N_2O (etapa 7, Figura 9). Muitos micro-organismos desnitrificantes são facultativos, os quais utilizam preferencialmente o oxigênio como receptor de elétrons, devido ao maior rendimento energético. Estas desnitrificantes facultativas demonstraram constituir a maior fração do

total de bactérias das comunidades de lodos ativados (MORGAN-SAGASTUME; NIELSEN; NIELSEN, 2008; NIELSEN; NIELSEN, 2002). As desnitrificantes são encontradas em mais de 50 gêneros dentre os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, e *Bacteroidetes* (DWORKIN et al., 2006). Alguns micro-organismos conseguem desnitrificar sob condições aeróbia e anóxicas, processo conhecido como desnitrificação aeróbia. Muitas vezes, estes micro-organismos podem também catalisar nitrificação heterotrófica. As AOB também são capazes de desnitrificar do nitrito a N_2O , utilizando amônia ou hidrogênio como doador de elétrons. Este processo é conhecido como desnitrificação autotrófica (*nitrifier denitrification*).

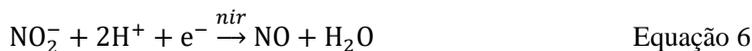
O processo de desnitrificação deve ser descrito de forma modular, onde todas as reações são catalisadas por uma enzima específica. As enzimas associadas a este processo são redutases, as quais são sintetizadas quando as condições ambientais se tornam anóxicas. Em geral, a desnitrificação acontece da seguinte maneira: (a) nitrato é reduzido a nitrito pela nitrato redutase (*nar*) (Equação 5); (b) uma subsequente redução do nitrito a óxido nítrico é feita pela nitrito redutase (*nir*) (Equação 6); (c) depois, o óxido nítrico é reduzido a óxido nitroso pela enzima óxido nítrico redutase (*nor*) (Equação 7); e finalmente (d) o óxido nitroso é reduzido a nitrogênio gasoso pela enzima óxido nitroso redutase (*nos*) (Equação 8) (KANEHISA et al., 2017).

O nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso de acordo com as seguintes reações químicas:

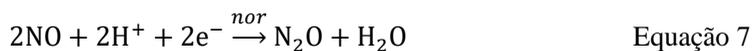
Redução do nitrato a nitrito



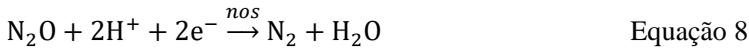
Redução do nitrito a óxido nítrico



Redução do óxido nítrico a óxido nitroso



Redução do óxido nitroso a nitrogênio gasoso



A partir das reações de desnitrificação mostradas, nota-se que o N_2O é um produto intermediário deste processo. Atualmente, 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 mudança climática de 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 N_2O emitido é atribuído aos processos microbiológicos que ocorrem principalmente na agricultura e no tratamento biológico de esgoto (USEPA, 2010). Como N_2O é um intermediário no processo da desnitrificação convencional, a desnitrificação incompleta realizada pela desnitrificantes facultativas heterotróficas pode levar à emissão de N_2O . O processo de desnitrificação autotrófica realizado pelas AOB também pode ser via de emissão de N_2O , uma vez que estes organismos não realizam a última etapa de redução a N_2 .

Os micro-organismos desnitrificantes mais comuns no tratamento de águas residuárias são pertencentes às famílias *Comamonadaceae* (gêneros *Curvibacter* e *Acidovorax*) e *Rhodocyclaceae* (gêneros *Azoarcus*, *Thauera* e *Zooglaeae*). Outros gêneros de bactéria também comuns em ETE são *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*, *Rhodopseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* (NIELSEN et al., 2009). Todos estes micro-organismos se classificam como heterotróficos ordinários (OHO – *ordinary heterotrophic organisms*) de rápido crescimento e sem a capacidade de acumular poli-fosfatos. Quando a ETE é configurada para a remoção de fósforo, além de nitrogênio, os organismos pertencentes também à família *Rhodocyclaceae*, gêneros *Accumulibacter* e *Competibacter*, se mostram presente com potencial de realizar a desnitrificação. Estes organismos também são heterotróficos, porém não são classificados como OHO, pois possuem crescimento lento e no caso da *Accumulibacter* tem a capacidade de acumular poli-fosfato (HENZE et al., 2008; NIELSEN et al., 2010).

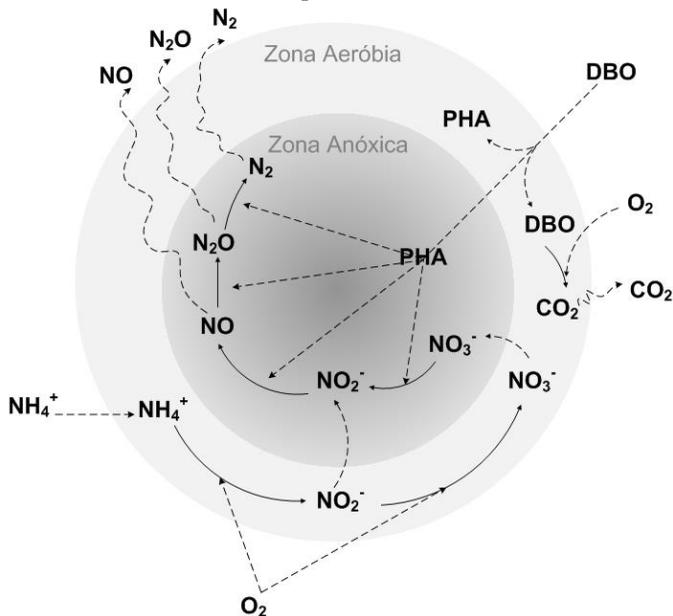
2.3.1.3 Nitrificação e desnitrificação no LGA

Os mecanismos de remoção de nitrogênio em LGA são os mesmos que aqueles utilizados nos lodos ativados, porém não é

necessária a compartimentação em tanques em função das diferentes camadas formadas nos grânulos. Grânulos aeróbios apresentam em sua estrutura diferentes zonas onde diferentes condições ambientais coexistem, as quais possibilitam simultânea remoção de matéria orgânica e nitrogênio. As populações bacterianas nitrificantes e desnitrificantes são distribuídas nas diferentes camadas do grânulo proporcionando a nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) (Figura 10). A distribuição das comunidades microbianas em grânulos aeróbios varia de acordo com a operação do sistema em termos de carga de nitrogênio removida, tempo de retenção de sólidos e composição do esgoto (WEBER et al., 2007). Entretanto, uma aproximação geral pode ser realizada. De acordo com o metabolismo aeróbio estrito das AOB e NOB, elas deverão estar localizadas na parte externa do grânulo onde o oxigênio é disponível (zona aeróbia na Figura 10). A profundidade da camada aeróbia está entre 100-200 μm (LEMAIRE; WEBB; YUAN, 2008). As NOB se encontram próximas aos aglomerados de AOB como um resultado direto do metabolismo sequencial da amônia via nitrito a nitrato, mas com menos colônias, e com algumas células isoladas e colônias localizadas nas camadas anóxicas próximas (WINKLER et al., 2012a). A comunidade microbiana desnitrificante ativa está distribuída principalmente a 200-250 μm abaixo da superfície externa (zona anóxica representada na Figura 10) incorporada em substâncias poliméricas extracelulares (ADAV; LEE; LAI, 2010).

Figura 10: Modelo conceitual dos principais processos biológicos na remoção de carbono e nitrogênio em lodo granular aeróbio. Estruturas de biofilme podem ser mais complexas acompanhadas de muitas outras rotas metabólicas.

DBO (demanda bioquímica de oxigênio) representa aqui o carbono disponível e utilizado pelos micro-organismos. PHA (poli-hidroxialcanoatos) representa o carbono armazenado em forma de polímero intracelular.



Fonte: Próprio autor

Os diferentes processos ocorrentes no grânulo variam ao longo do ciclo operacional, uma vez que o reator é sequencialmente alimentado e ocorrem períodos de “saciedade” (*feast*) e “fome” (*famine*). No período *feast*, a concentração do carbono orgânico no líquido é alta e, portanto este substrato se difunde no grânulo completamente. Parte do carbono difundido nas camadas internas é convertido e armazenado anaerobicamente/anoxicamente como poli-hidroxialcanoatos (PHA) pelos organismos heterotróficos. O oxigênio dissolvido terá uma menor penetração no interior do grânulo neste período, em função de seu rápido consumo pelos organismos autotróficos e heterotróficos nas camadas externas do grânulo. Portanto,

neste período *feast*, o OD é usado pela nitrificação, pela conversão aeróbia do carbono e para o crescimento aeróbio da biomassa. Os organismos autotróficos convertem amônia em óxidos de nitrogênio (nitrito e nitrato) nas camadas externas que por sua vez se difundem em direção ao centro dos grânulos e também para a fase líquida. Quando a concentração de matéria orgânica no líquido diminui (período de *famine*), o carbono armazenado como PHA pode ser utilizado como fonte de carbono no processo de desnitrificação. Ainda no período *famine*, a penetração do OD no interior é maior do que no período *feast*, visto que o consumo de oxigênio no grânulo é menor. Desta forma, os organismos utilizam o PHA estocado e o oxigênio para a produção de novas células. Portanto, quando se tem a operação do reator para remoção de carbono e nitrogênio em LGA, a remoção de nitrogênio acontece através de NDS acoplada ao consumo aeróbio e anaeróbio do carbono orgânico (FIGUEROA et al., 2009).

A eficiência da remoção completa de nitrogênio nos grânulos está diretamente relacionada com o gradiente de oxigênio e disponibilidade de carbono dentro do grânulo. A presença de colônias AOB na superfície do grânulo é mais favorável na competição pelo oxigênio, por exemplo, o que pode reprimir as NOB e ocasionar em um acúmulo de nitrito (POOT et al., 2016). O acúmulo de nitrito já foi reportado em estudos com LGA (COMA et al., 2012; ISANTA et al., 2012; JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; WAGNER et al., 2015a). A penetração de oxigênio depende da concentração de OD no líquido e do tamanho do grânulo. Como o tamanho do grânulo é algo ainda difícil de ser controlado em situações reais, a diminuição do OD no líquido é uma estratégia viável para garantir as camadas anóxicas no grânulo (MATSUMOTO et al., 2010).

2.3.2 Conversões biológicas do fósforo (*enhanced biological phosphorus removal* - EBPR)

Uma vez que águas residuárias contém fosfato proveniente dos detergentes, urina e fezes, é necessário remover este fosfato antes do descarte do efluente nos corpos d'água para evitar a eutrofização. A remoção química do fósforo requer a adição de coagulantes, como sais de alumínio e ferro, que resultam em uma disposição final de um lodo químico, onerosa e prejudicial ao meio ambiente (VAN LOOSDRECHT et al., 1997). A remoção biológica de fósforo de águas residuárias pode ser realizada pelo processo conhecido como EBPR (*enhanced biological phosphorus removal*). O processo EBPR é realizado por organismos

acumuladores de poli-fosfatos, também conhecidos como PAO (*polyphosphate-accumulating organisms*). Os PAO são organismos heterotróficos de crescimento lento e seu metabolismo envolve ciclos de formação e consumo de polímeros intracelulares (poli-fosfatos, glicogênio e poli-hidroxialcanoatos) sob condições de oxidação-redução alternadas (MINO; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1998; WENTZEL et al., 1985). A seleção dos PAO, ao contrário dos organismos aeróbios e organismos heterotróficos ordinários (OHO), requer a alternância de condições anaeróbias e aeróbias ou anóxicas.

A Figura 11 representa o metabolismo dos PAO sob estas diferentes condições. Na fase anaeróbia, diferentemente dos outros micro-organismos, os PAO são capazes de assimilar as fontes de carbono na forma de ácidos graxos voláteis (AGV), como acetato e propionato, polimerizá-los e armazená-los como poli- β -hidroxialcanoatos (PHA) intracelulares. Dependendo da fonte de carbono que alimenta a biomassa, diferentes tipos de PHA podem ser formados, tais como o poli- β -hidroxibutirato (PHB), poli- β -hidroxivalerato (PHV), poli- β -hidroxi-2-metilvalerato (PH2MV), poli- β -hidroxi-2-metilbutirato (PH2MB). Este metabolismo específico fornece aos PAO uma vantagem competitiva diante dos outros organismos que não possuem esta habilidade de estocar matéria orgânica sob condições anaeróbias. Para a captação dos AGV e sua transformação em PHA é necessária energia na forma de adenosina tri-fosfato (ATP), a qual é principalmente gerada pela quebra do polifosfato intracelular e subsequente liberação do fosfato para o meio líquido. Parte da energia também vem da hidrólise do glicogênio intracelular (MINO; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1998; WENTZEL et al., 1985).

Durante a fase aeróbia ou anóxica subsequente, quando os receptores de elétrons, como oxigênio ou nitrito e nitrato, estão presentes na ausência de substrato orgânico na fase líquida, os PAO usam o PHA intracelular estocado como fonte de carbono e de energia para manutenção, crescimento, formação de glicogênio e de poli-fosfato. Para a formação de poli-fosfato, o ortofosfato é absorvido do meio líquido e sintetizado como poli-fosfato. Devido ao crescimento da biomassa PAO nesta fase, a assimilação de fósforo aeróbia é maior do que a liberação de fósforo na fase anaeróbia, resultando em uma efetiva remoção de fósforo do meio líquido (MINO; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1998). Portanto, o fósforo é removido do sistema de tratamento com o descarte do lodo. O lodo residual removido pode ser então usado para a produção de biogás em digestores anaeróbios ou incinerado e disposto em aterros. Contudo, antes da digestão anaeróbia

ou incineração, o fósforo pode ser recuperado da biomassa (MORSE et al., 1998). Foi demonstrado que os PAO têm um potencial de estoque de $0,38 \text{ mg P mg}^{-1} \text{ SST}$ (SCHULER; JENKINS, 2003a), versus $0,023 \text{ mg P mg}^{-1} \text{ SSV}$ pelos OHO (METCALF; EDDY, 2003).

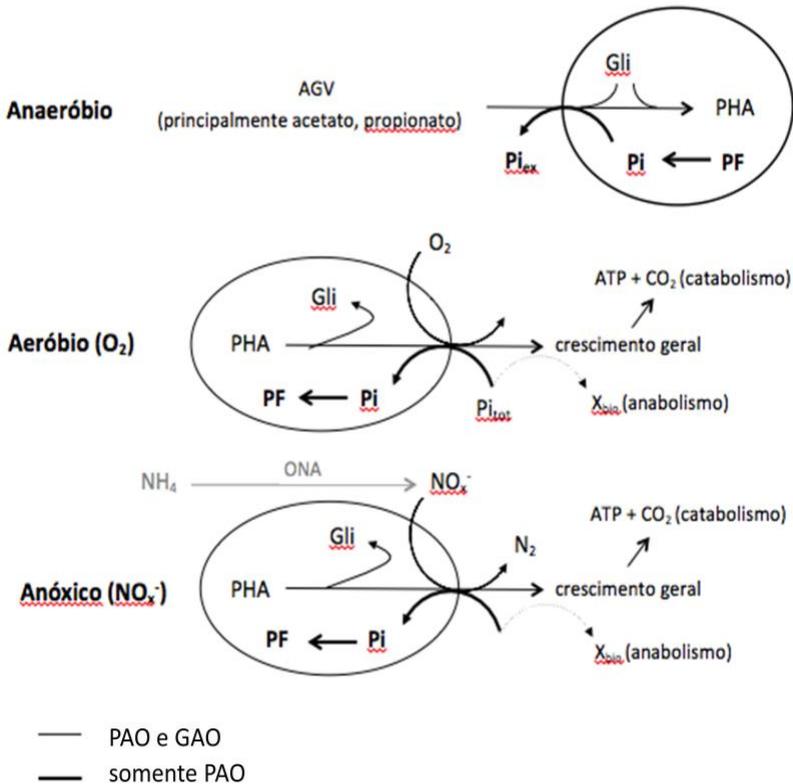
A operação do reator influencia diretamente na seleção apropriada dos PAO frente aos outros organismos heterotróficos, sendo necessário o consumo completo da DBO sob condições anaeróbias. Portanto, dependendo da composição do esgoto afluente, a fase anaeróbia deve ser longa o suficiente para permitir a lise e a fermentação dos substratos particulados aos AGV, e permitir o consumo completo dos AGV pelos PAO. Mesmo que o escape de matéria orgânica para a fase aeróbia seja impedido, outros organismos, tais como organismos acumuladores de glicogênio (conhecidos como GAO, *glycogen-accumulating organisms*) podem competir com PAO pela absorção de AGV em condições anaeróbias. GAO possuem um metabolismo similar aos PAO, mas não envolve o ciclo de polifosfatos/ortofosfatos (Figura 11). Uma vez que os GAO não removem fósforo de águas residuárias, eles não são interessantes nos sistemas EBPR.

A remoção biológica do fósforo pode ser combinada com a remoção de nitrogênio quando se aplica ao sistema alternâncias de condições anaeróbias e anóxicas, como descrito acima. Esses sistemas promovem o crescimento de organismos desnitrificantes acumuladores de polifosfato (DPAO, *denitrifying polyphosphate-accumulating organisms*), capazes de utilizar óxidos de nitrogênio (nitrito ou nitrato), no lugar do oxigênio para o crescimento anóxico e assimilação de fosfato. Este processo é conhecido como desfosfatação desnitrificante, onde a remoção de fósforo está acoplada à desnitrificação. Neste caso, os custos de operação diminuem em função tanto da aeração despendida para a remoção aeróbia de fosfato, quanto de carbono orgânico necessário à desnitrificação. Além disso, menos lodo é produzido sob condições anóxicas, uma vez que a produção de ATP com nitrato é aproximadamente 40% menor do que aquela obtida com oxigênio como aceptor de elétrons (KERRN-JESPERSEN; HENZE, 1993; KUBA; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1996).

Figura 11: Metabolismo anaeróbio e aeróbio de PAO e PAO.

ONA: organismos nitrificantes autotróficos, Gli: glicogênio, NO_x : produtos da nitrificação (nitrito e nitrato), PHA: poli- β -hidroxialcanoatos, Pi: resíduos de ortofosfato, Pi_{ex} : Pi excretado, Pi_{tot} : soma do Pi presente na água residuária

afluente e excretada das células PAO, PF: polifosfato, AGV: ácidos graxos voláteis, X_{bio} : biomassa.



Fonte: adaptado de Weissbrodt (2012)

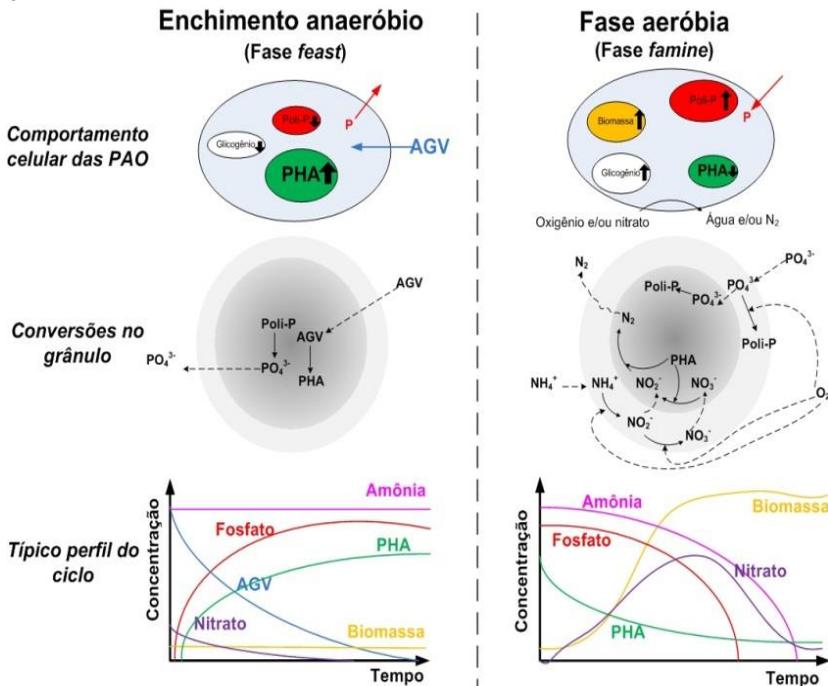
2.3.2.1 Remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo no LGA

Como já mostrado anteriormente (Figura 6), o lodo granular aeróbio se distingue do floco de lodo ativado pela sua compacta estrutura estratificada em condições aeróbia, anóxica e anaeróbia ao mesmo tempo, dentro de um sistema também compacto. Esta estrutura combinada com a estratégia operacional permite a seleção dos organismos de crescimento lento, como os PAO. O ciclo do RBS-LGA consiste em enchimento pela parte inferior do reator, período aerado, sedimentação e descarte. Em instalações de escala real (PRONK et al., 2015), o enchimento é realizado junto com o descarte, sendo que o afluente é alimentado em regime ascensional, impelindo o efluente para

fora do reator. Na tecnologia Nereda[®], este regime de enchimento lento, ascendente e anaeróbio, é utilizado para garantir tempo de contato suficiente entre biomassa e afluente, e promover o crescimento dos organismos acumuladores de fosfato. Nestas ETE, os esforços estão focados na absorção anaeróbia do carbono orgânico degradável pela biomassa, superando a oxidação aeróbia da DBO pelos organismos heterotróficos de crescimento rápido (OHO) no período seguinte aeróbio. Desta forma, os PAO conseguem ser selecionados no sistema, do contrário, os OHO por terem rápido metabolismo se sobressaem e a remoção de fósforo não é alcançada no sistema.

Uma forma de alcançar a completa remoção de nutrientes com a tecnologia LGA é aplicando o regime *feast-famine* (saciedade e fome). Na Figura 12 pode ser visualizado um esquema do comportamento das células de PAO, as conversões dos nutrientes nos grânulos e o perfil do ciclo operacional quando aplicado este regime *feast-famine*. O enchimento atua como o período *feast*, onde altas concentrações de carbono biodegradável estão disponíveis no líquido e são estocadas como PHA pelos micro-organismos. Quando o enchimento (fase *feast*) é anaeróbio, ocorre a seleção de PAO e/ou GAO, enquanto que, o crescimento de outros organismos heterotróficos irá ocorrer se o enchimento for aeróbio. Na Figura 12 a fase *feast* está representada pelo enchimento anaeróbio, onde além de estocar carbono como PHA, os PAO liberam fosfato e não há crescimento de biomassa. A fase aeróbia seguinte atua como o período *famine*, pois não há substrato disponível no líquido, mas os PAO/GAO conseguem utilizar o carbono estocado como PHA para manutenção e crescimento. Além disso, durante o período aeróbio, os PAO absorvem o fosfato, enquanto as nitrificantes oxidam a amônia até nitrato nas camadas externas do grânulo pelas AOB e NOB. O nitrito e nitrato formado se difundem nas camadas mais internas e são reduzidos a nitrogênio gasoso pelas DPAO, as quais utilizam o PHA estocado como doador de elétrons. Portanto, ótimas remoções de nitrogênio podem ocorrer via NDS no LGA durante o período *famine* quando os volumes aeróbios e anóxicos no grânulo estão em equilíbrio, através do período de aeração do ciclo (DE KREUK, 2006). No geral, além deste sistema e da configuração do processo trazer benefícios quanto à remoção completa dos nutrientes, já foi mostrado que os PAO conferem ao grânulo maior estabilidade por formar um agregado mais compacto e uniforme, quando comparado com grânulos formados por OHO de rápido crescimento (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005; DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004).

Figura 12: Perfis de AGV, amônia, nitrato e fosfato no meio líquido; e perfis de PHA e biomassa no lodo



Fonte: adaptado de De Kreuk (2006) e Pronk et al. (2015)

2.4 ECOLOGIA MICROBIANA EM SISTEMAS DE LGA

As comunidades bacterianas em sistemas LGA são compostas por populações muito semelhantes àquelas predominantes e subjacentes encontradas no microbioma dos lodos ativados. A diferença está em como elas se estruturam no biofilme. Um modelo conceitual das interações bacterianas dentro do microbioma do LGA foi proposto por Weissbrodt (2012) (Figura 13) baseando-se naquele realizado por Nielsen et al. (2010) para os lodos ativados. Sob as condições anaeróbias, ocorre principalmente os processos de hidrólise dos EPS, fermentação dos açúcares, assimilação dos AGV com a liberação de fosfato. Organismos do filo *Chloroflexi* são bactérias filamentosas e se mostraram importante na hidrólise de proteínas e polissacarídeos (NIELSEN et al., 2010; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). O gênero *Tetrasphaera* (família *Intrasporangiaceae*) se mostra versátil

sendo capaz de realizar tanto a hidrólise de polissacarídeos e fermentação dos açúcares quanto a assimilação dos AGV e liberação do fosfato. *Tetrasphaera* apresenta atividade de liberação e assimilação do fósforo - PAO (KONG; NIELSEN; NIELSEN, 2005), essas bactérias são mais abundantes em estações de tratamento reais do que as “*Ca. Accumulibacter*” (MASZENAN et al., 2000; NGUYEN et al., 2011b; NIELSEN et al., 2010). Porém, sob condições bem definidas em RBS-LGA alimentado com acetato, “*Ca. Accumulibacter*” (família *Rhodocyclaceae*) tem se mostrado como o PAO mais representativo (MCMAHON; HE; OEHMEN, 2010; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). *Dechloromonas* tem sido descrita como populações acompanhantes das “*Ca. Accumulibacter*”, e também tem sido proposto como suposto PAO (KONG et al., 2007; MCILROY et al., 2015a).

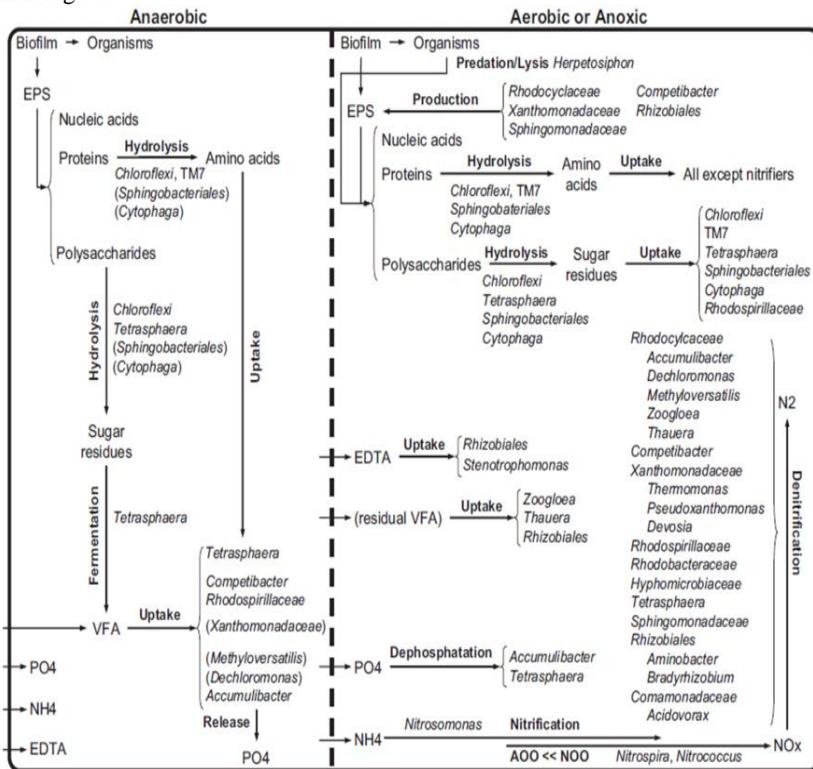
Com metabolismo similar, mas sem a capacidade de estocar poli-fosfato, “*Ca. Competibacter*” (GAO) aparecem também no microbioma do lodo granular, competindo pelo substrato (AGV) com os PAO. Assim como os PAO, os GAO são de crescimento lento e conferem estabilidade e uniformidade ao grânulo (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004).

Sob as condições aeróbias, uma diversidade maior de micro-organismos se estabelece no ecossistema granular. Na parte inferior da Figura 13 nota-se que as nitrificantes predominantes em LGA são *Nitrossomonas* (AOB), *Nitrospira* (NOB) e *Nitrococcus* (NOB). Porém, além da *Nitrospira* identificada como predominante (DAIMS et al., 2000), *Nitrobacter* também já foi detectada como predominante em sistema LGA alimentado com acetato (WINKLER et al., 2012a). Dentre os estudos com LGA, também já foi reportado diferenças quanto a abundância entre AOB e NOB, onde a razão NOB/AOB é maior em grânulos do que nos lodos ativados convencionais (WEISSBRODT et al., 2013a; WINKLER et al., 2012a).

Quanto às desnitrificantes, nota-se no modelo conceitual (Figura 13) a maior diversidade de micro-organismos capazes de realizar este processo dentre todos os outros que ocorrem no LGA. As famílias *Comamonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Rhodobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Rhodocyclaceae* são aquelas predominantes nos sistema LGA capazes de realizar a desnitrificação. Além de pertencer à comunidade das desnitrificantes, as famílias *Rhodocyclaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Sphingomonadaceae* foram também relacionadas com a produção de EPS em sistemas LGA. Uma vez que a formação e a estrutura dos grânulos estão diretamente vinculadas com o EPS e com as interações hidrofóbicas

(DULEKGURGEN et al., 2008; LIU; TAY, 2002; SEVIOUR et al., 2012), o conhecimento sobre as comunidades produtoras destes polímeros se faz importante para a segurança do processo evitando a desintegração do biofilme granular.

Figura 13: Modelo conceitual do ecossistema bacteriano de sistema RBS-LGA operado sob regime anaeróbio-aeróbio para completa remoção de nutrientes. Processos de conversão bacteriana estão representados por setas espessas. A função dos organismos em parênteses devem ser confirmadas por investigações fisiológicas.



Fonte: Weissbrodt (2012)

Dentro da família *Rhodocyclaceae* encontram-se os gêneros mais abundantes reportados nos sistemas LGA, dentre eles *Zoogloea* tem sido apresentado por vários estudos como uma comunidade abundante em grânulos durante o estágio inicial dos sistemas (*start up*) (EBRAHIMI et al., 2010; LI et al., 2008; WEISSBRODT et al., 2013a).

Em sistema de lodos ativados, os aglomerados de *Zoogloea*, também conhecido como *zoogloeaal bulking*, são indesejáveis, pois deterioram o desempenho da sedimentação do lodo. Isto acontece pois estes organismos, assim como *Thauera* e *Acinetobacter*, são grandes produtores de polissacarídeos, os quais produzidos em excesso aprisionam água, dificultando a separação do lodo (LAJOIE et al., 2000). Além disso, *Zoogloea* spp. causa distúrbios nas estações EBPR quando se sobressaem diante dos PAO (MONTROYA et al., 2008). Em sistemas LGA, a proliferação de *Zoogloea* já resultou em grânulos fofos (*fluffy*) e de lenta sedimentação (LIU; LIU, 2006), mas também já esteve relacionada à formação de grânulos densos sem deteriorar a sedimentação (WEISSBRODT et al., 2012). No entanto, Weissbrodt et al. (2013a) demonstraram que *Zoogloea* não é essencial para granulação e a sua superabundância não é desejada em RBS-LGA, uma vez que leva à deterioração da remoção de nutrientes. Portanto, a proliferação de *Zoogloea* e de outros organismos filamentosos deve ser controlada, evitando o carbono residual na fase aeróbia (Figura 13), sendo os AGV totalmente consumidos anaerobicamente na fase anterior do ciclo. Os organismos de crescimento lento *Accumulibacter* e *Competibacter* também foram capazes de formar grânulos (WEISSBRODT et al., 2013a) e estão relacionados com a produção de EPS, sendo a seleção destes, portanto, mais interessantes para a eficiência do processo tanto com a remoção de nutrientes (WEISSBRODT, 2012) quanto para a estabilidade da biomassa (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004).

2.5 TECNOLOGIA DE LGA DENTRO DA ECONOMIA CIRCULAR

A água é reconhecida como um direito humano e um elemento essencial para a dignidade das pessoas (WWC, 2013). Garantir água própria à proteção dos ecossistemas aquáticos e à saúde pública significa acessibilidade ao saneamento e aos sistemas de tratamento de esgoto. A preocupação pela qualidade das águas se dá em função do aumento populacional e da produção industrial, o que leva ao maior consumo e descarte da água. Portanto, o grande desafio está em alcançar o desenvolvimento econômico da sociedade, sem negar o direito fundamental da humanidade e das futuras gerações a um meio ambiente ecologicamente equilibrado. Para isso, atualmente a gestão dos recursos hídricos urbanos e de tratamento de esgoto têm utilizado uma abordagem sustentável, a qual tende a alcançar além da proteção ambiental, a recuperação de recursos, a eficiência energética e espacial, juntamente com investimentos e custos operacionais reduzidos.

Dentro deste contexto da sustentabilidade, recentemente, as estações de tratamento de esgoto entram no conceito da economia circular. A economia circular vem ganhando impulso desde o final da década de 1970 (EMF, 2013) e se define como um sistema regenerativo no qual a entrada e o desperdício de recursos, a emissão e perda de energia, são minimizados pela desaceleração, fechamento e restrição dos ciclos de material e de energia. Isso pode ser alcançado através das projeções duradouras, manutenção, reparo, reutilização, remanufatura, remodelação e reciclagem (GEISSDOERFER et al., 2016). Esta mudança de paradigma no setor do saneamento refletiu inclusive no termo a qual é referida as ETE (*wastewater treatment plants* – WWTP), que passa a ser Instalações de Recuperação de Recursos Hídricos - ‘*Water Resource Recovery Facilities*’ (WRRF) (WEF, 2014), focando no reaproveitamento dos recursos.

A Figura 14 ilustra o princípio da economia circular nas estações de tratamento de esgoto e recuperação de recursos. As águas residuárias são ricas em nutrientes, nitrogênio e fósforo, sendo o fósforo um recurso não renovável, mas que pode ser recuperado a partir do esgoto, fechando assim o ciclo humano do fósforo (BEARDSLEY, 2011). Como resultado do tratamento da água contendo fósforo, este mineral é encontrado no lodo residual, de onde pode ser extraído como fertilizante ou como estruvita. Além do benefício ambiental, esta abordagem se torna financeiramente atraente uma vez que o gerenciamento de lodo representa em até 50% dos custos totais de uma estação (EMF, 2013). Além da recuperação do fósforo, o lodo residual pode ser destinado à digestão anaeróbia para a produção de biogás e posterior geração de energia elétrica (LEITE, 2015). Os avanços tecnológicos já chegaram na produção de materiais, como bioplásticos, advindos do lodo residual contendo PHA. A produção de bioplásticos se faz possível com a combinação de uma biomassa enriquecida e da fermentação do lodo (TAMIS, 2015).

Figura 14: Ilustração representando o sistema de tratamento de esgoto inserido na economia circular

A ECONOMIA CIRCULAR

Agregando valor às águas residuárias

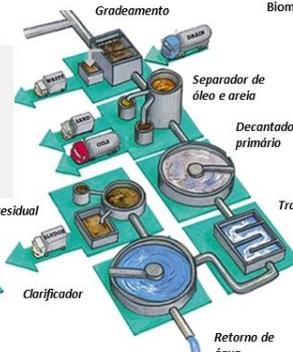
AGREGANDO VALOR AOS MATERIAIS FABRICAÇÃO DE BIOPLÁSTICO

O lodo contém substâncias que podem ser reutilizadas como materiais

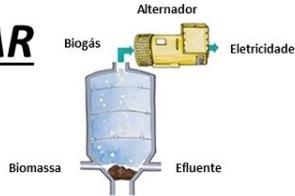


FERTILIZANTES
A digestão anaeróbia pode gerar fertilizante

ESTRUVITA
O fósforo pode ser extraído como estruvita



AGREGANDO VALOR AO RESÍDUO
Celulose e areia podem ser recuperados, reciclados e reusados.



AGREGANDO VALOR À ENERGIA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Consiste em usar o lodo para produzir biogás através de digestão anaeróbia do material orgânico sólido. O biogás produzido pode ser queimado para produzir eletricidade.



AGREGANDO VALOR À ÁGUA REUSO

A água pode ser reutilizada para irrigação ou alguns propósitos industriais. Em alguns casos, a água pode retornar a uma rede de distribuição e ser potável novamente.

Fonte: adaptado de Depont (2015)

A tecnologia de lodo granular aeróbio é atrativa para alta remoção de nutrientes e recuperação de produtos. Recentemente, tem se observado uma mudança no paradigma: águas residuárias não são apenas uma fonte de poluição, mas também um recurso barato e sustentável de nutrientes, como o fósforo, e valiosos biopolímeros como o ALE (VAN LOOSDRECHT; BRDJANOVIC, 2014). O alginato é um biopolímero predominantemente produzido por algas, mas sabe-se que bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii* também são capazes de produzi-lo. Atualmente, a única fonte comercial de alginato é através do cultivo de algas marinhas. Uma vez que o cultivo das algas depende de condições sazonais e geográficas, a produção do alginato varia, ocasionando em produções limitadas em alguns períodos do ano e preços elevados no mercado. A produção de alginato por bactérias apresenta vantagens por ocorrer em condições controladas sem sofrer estas influências. Torna-se ainda mais vantajoso quando se pensa nesta produção de alginato advinda de culturas mistas,

como de lodo de ETE, onde a esterilização não é necessária e utiliza-se resíduo orgânico como matéria-prima. Do ponto de vista da aplicação, apesar do alginato ser principalmente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica, médica e odontológica, novas aplicações foram e ainda serão encontradas para o uso de alginato originado do esgoto. Na indústria de papel, ALE são capazes de aumentar a resistência à água das fibras de papéis (VAN LOOSDRECHT; LIN; LOTTI, 2013) e na indústria civil, ALE podem evitar o ressecamento de concretos (ZLOPASA; KOENDERS; PICKEN, 2014). Portanto, além do lodo granular oferecer perspectivas para atingir critérios de qualidade da água rigorosos, também apresenta alto potencial para a biorrefinaria de exopolímeros, do tipo alginato.

O potencial de aproveitamento de ALE em lodo granular ainda está sendo avaliado e a questão que se levanta é: o excesso de lodo residual dos sistemas Nereda pode ser utilizado de forma rentável para extração de ALE, permitindo a reutilização sustentável de um produto de resíduos? O lodo granular contém entre 15-25% de ALE que, em princípio, pode ser recuperado com as tecnologias existentes utilizadas para a extração de alginato de algas (LIN et al., 2015). A combinação da extração de alginato com os processos de tratamento de lodo existentes nas ETE não só proporcionaria uma matéria-prima valiosa, mas também poderia melhorar a eficiência do tratamento de lodo, uma vez que a extração de alginato reduz o volume de lodo e o restante (não extraído) tem uma maior digestibilidade e melhor desidratação. Um estudo de mercado mostrou um promissor interesse de empresas de vários setores industriais (VAN DER ROEST et al., 2015). Além disso, várias instituições governamentais também demonstraram interesse na sustentabilidade ligada ao conceito de uma economia circular que a produção de ALE traz a partir das águas residuárias e posterior reutilização para processos industriais. Um programa nacional de pesquisa com alginato (*National Alginate Research Programme - NAOP*) foi criado na Holanda para investigar e desenvolver este promissor conceito de reutilização sustentável. O NAOP é uma iniciativa de pesquisa colaborativa do setor público-privado com o objetivo de desenvolver extração de ALE a partir de lodo Nereda® excedente de forma sustentável e comercialmente viável. O NAOP é semelhante à parceria de colaboração público-privada que desenvolveu com sucesso o Nereda®. Atualmente, está sendo realizado um estudo piloto e os projetos serão colocados em operação em 2017 (OLIVER; THOMPSON, 2017).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

“Não é suficiente ter uma boa mente: o principal é usá-la bem”

(René Descartes, 1637)

O presente trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Brasil) em cooperação com a Universidade Tecnológica de Delft (*Delft University of Technology*, TU Delft, Países Baixos) e com a Universidade de Aalborg (*Aalborg University*, AAU, Dinamarca). Esta pesquisa teve como ponto de partida a busca pela remoção de nutrientes do esgoto sanitário utilizando a tecnologia de lodo granular aeróbio.

O presente trabalho teve como foco a exploração das comunidades microbianas atuantes e a fim de compreender as rotas metabólicas de conversões dos nutrientes e melhorar as condições operacionais na remoção destes. No desenvolvimento desta primeira etapa foi utilizado o sistema experimental I (SEI). O SEI, localizado na UFSC, Brasil, foi composto por um reator RBS piloto, o qual foi alimentado com esgoto sanitário em todos os experimentos. Este sistema se aproxima das complexas condições reais de uma ETE, sendo exposto a flutuações sazonais, de carga e de substrato.

Na segunda etapa desta pesquisa também com foco na ecologia microbiana buscou-se pelo conhecimento das substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances*, EPS) associadas à estabilidade dos grânulos e na recuperação de exopolímeros. O sistema experimental II (SEII), localizado na TU Delft, Países Baixos, foi utilizado para o progresso desta etapa. O SEII foi composto por um reator RBS de bancada, o qual foi alimentado com esgoto sintético. Este sistema foi operado sob condições de temperatura, pH, OD, carga, substrato bem definidas, a fim de obter um sistema enriquecido com PAO.

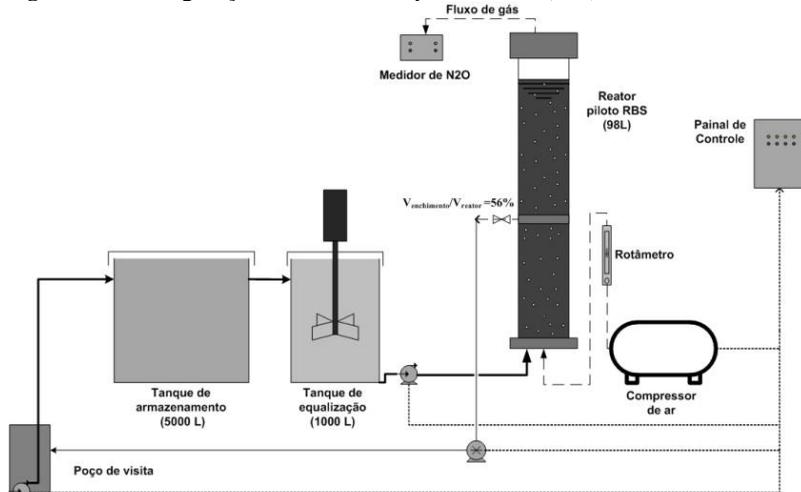
3.1 SISTEMA EXPERIMENTAL I (SEI)

3.1.1 Características gerais

O sistema experimental utilizado, e instalado nas dependências do Laboratório de efluentes líquidos e gasosos (LABEFLU) na UFSC,

era composto por unidade de captação de esgoto municipal, tanques de armazenamento, bombas, reator piloto, rotâmetro, compressor de ar, medidor de gás (N_2O) e sistema de automação. A configuração geral do sistema experimental pode ser visualizada na Figura 15.

Figura 15: Configuração do Sistema Experimental I (SEI).



Fonte: adaptado de Akaboci (2013)

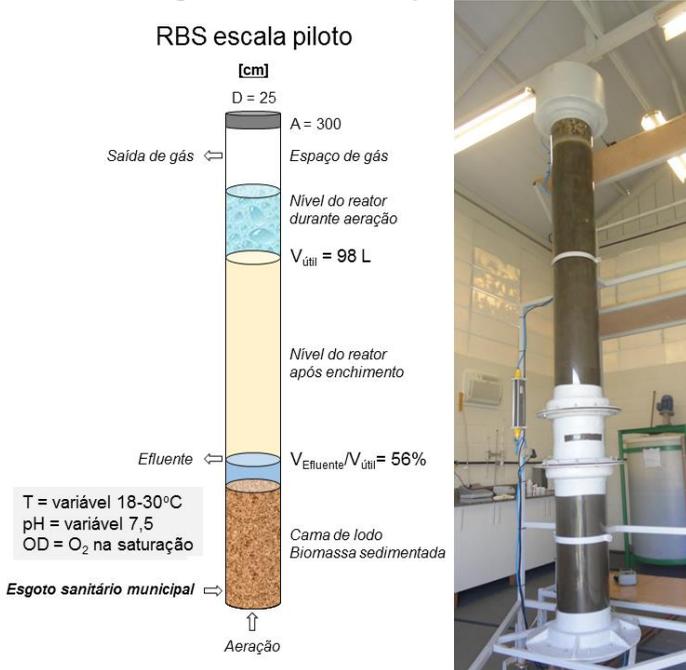
Nesta pesquisa optou-se por utilizar esgoto sanitário, a fim de simular condições reais de um sistema de tratamento de efluentes, o qual deve estar apto a resistir às oscilações nas concentrações de substrato orgânico, de nutrientes e de sólidos totais afluentes. O esgoto sanitário que alimentou o sistema estudado era bombeado, por meio de uma bomba submersa (Schneider, BSC-94, $\frac{3}{4}$ CV, monofásica, 60Hz), da rede coletora de esgotos do bairro Pantanal, na cidade de Florianópolis, SC. Em seguida, o esgoto era direcionado para o tanque de armazenamento (5000 L) e por gravidade seguia para um tanque intermediário (1000 L). A fim de evitar o acúmulo de sólidos no fundo deste tanque e obter continuamente um esgoto fresco, foi instalado um misturador mecânico (motor elétrico do tipo vertical 1750 rpm, 60 Hz), o qual era acionado a cada 30 min pelo período de 30 s, e um sistema de recirculação do esgoto com o tanque de 5000 L.

Do tanque intermediário, o esgoto era bombeado (bomba Jacuzzi, 3A-T, $\frac{1}{3}$ CV, trifásica, 60 Hz) para dentro do reator. Um inversor de frequência (Danfoss, FC51 PK37, $\frac{1}{2}$ CV) foi conectado à

bomba de enchimento para um maior controle da vazão da bomba durante o enchimento do reator. Após o tratamento, o efluente tratado era bombeado (Schneider, BC 98SC, 1/2 CV, monofásica, 60 Hz) para um ponto à jusante da captação na rede coletora municipal de esgoto (Figura 15).

O reator piloto estudado foi dimensionado e desenvolvido por AKABOCI (2013) e WAGNER (2015). O reator tinha uma geometria de reator de bolhas (*bubble column reactor*) sendo uma coluna cilíndrica de acrílico transparente e apresentando as seguintes dimensões: 3,0 m de altura e 0,25 m de diâmetro interno (Figura 16).

Figura 16: Dimensões esquemáticas (*esquerda*) e fotografia (*direita*) do reator piloto RBS de lodo granular do Sistema Experimental I (SEI).



Fonte: Weissbrodt & Guimarães (autor)

A altura útil do reator neste estudo foi de 2,18 m, o que corresponde a um volume útil de 98 L. A disposição dos tubos de entrada e de saída do reator proporcionou a troca de 56 % ($V_{\text{enchimento}}/V_{\text{reator}}$) do volume líquido a cada ciclo, ou seja, a cada batelada foram tratados 54,9 L de esgoto. O reator possuía duas

possibilidades de enchimento: uma na parte superior e outra na parte inferior, sendo da parte inferior utilizada no presente trabalho. Seguindo as recomendações de Beun et al. (1999), o reator apresentou uma alta razão entre a altura útil e o diâmetro (A/D) de 8,7, a fim de favorecer a seleção dos grânulos pela diferença na velocidade de sedimentação.

Para a aeração do reator, utilizou-se um compressor de ar (Wayne wetzel profissional – WV 15, 230 L, 3 hp) que enviava ar comprimido para o interior do reator. Para obtenção de pequenas bolhas, o ar atravessava um difusor circular de membrana (EPDM, 340mm HD, B&FDias) localizado no fundo do reator. Além destas componentes, o sistema de aeração era composto por filtros, válvulas reguladoras e um rotâmetro, sendo que este permitia a medição e o controle da vazão de ar aplicada ao reator.

O funcionamento do sistema de tratamento era automatizado através de um controlador lógico programável (CLP) (SIEMENS) localizado em um painel de comandos elétricos. Por meio do CLP, foram controladas a duração de cada fase do ciclo operacional do reator, o acionamento e desligamento das bombas de entrada/saída de esgoto e do compressor de ar. O controle do nível de enchimento e esvaziamento do reator era realizado através de sensores de níveis e de referência instalados dentro do reator conectados ao CLP.

3.1.2 Operação do reator

O reator piloto RBSG foi operado por 200 dias a fim de atingir granulação e remoção de nutrientes do esgoto sanitário por nitrificação-desnitrificação simultâneas (NDS). O reator foi inoculado com 40 L de lodo ativado a $3,2 \text{ g SSV L}^{-1}$ e IVL_{30} de 220 mL g^{-1} de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) da cidade de Florianópolis, SC e operado sem controle de temperatura ($18\text{-}30^\circ\text{C}$ no reator) e de pH ($6,7\text{-}7,6$ no esgoto). Neste estudo, os ciclos sequenciais foram de 4 horas, configurados de acordo com estudos prévios realizados neste sistema piloto para remoção de nutrientes (AKABOCI, 2013; WAGNER, 2015). Cada ciclo operacional se dividiu em: 3 min de enchimento em pulso ascendente, 10 min de período em repouso, 211 min de aeração ascendente, 13 min de sedimentação e 3 min de descarte do efluente tratado.

Características do enchimento: A composição do esgoto sanitário é dada na Tabela 1. O regime de enchimento em pulso ascendente foi alcançado bombeando esgoto 18 L min^{-1} , correspondendo a uma

velocidade de 22 m h^{-1} . A carga orgânica volumétrica total foi de $1,2 \pm 0,4 \text{ g DQO}_{\text{Total}} \text{ d}^{-1} \text{ L}_R^{-1}$ e solúvel de $0,7 \pm 0,3 \text{ g DQO}_{\text{Solúvel}} \text{ d}^{-1} \text{ L}_R^{-1}$.

Tabela 1: Características do afluente (esgoto municipal de Florianópolis, SC, Brasil) do reator piloto do SEI.

Variáveis	Afluente do reator piloto (n=38) (mg L^{-1})*
Sólidos suspensos totais (SST)	$116,3 \pm 52,9$
Demanda química de oxigênio total ($\text{DQO}_{\text{total}}$)	$349,8 \pm 106,3$
Demanda química de oxigênio solúvel ($\text{DQO}_{\text{solúvel}}$)	$196,9 \pm 82,8$
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO_5)	$223,7 \pm 70,9$
Nitrogênio Total (NT)	$62,4 \pm 9,2$
Nitrogênio amoniacal (N-NH ₄)	$55,9 \pm 16,6$
Nitrogênio-nitrito e nitrato	n/d**
Fósforo Total (P_{total})	$5,8 \pm 1,8$
pH	$7,1 \pm 0,2$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$24,3 \pm 3,0$
Oxigênio dissolvido (OD)	$0,23 \pm 0,05$

*exceto pH e temperatura; **n/d: valor abaixo do limite de detecção

Características do repouso: Após o enchimento, o período de repouso era realizado sem aeração e sem agitação. O objetivo foi estimular a desnitrificação, uma vez que houve acúmulo de nitrito nos estudos prévios conduzidos neste mesmo reator (AKABOCI, 2013; WAGNER, 2015; WAGNER et al., 2015a). De fato, esta fase foi principalmente anóxica, pois também se observou NO_x^- acumulado ao longo dos ciclos.

Características da fase aeróbia: A aeração em fluxo ascendente foi alcançada aplicando-se uma vazão de ar de 32 L min^{-1} , correspondendo a uma velocidade superficial do gás de $0,011 \text{ m s}^{-1}$. A alta vazão de ar foi aplicada com o intuito de provocar o cisalhamento hidrodinâmico, o qual é um importante fator na formação dos grânulos (LIU et al., 2005). O reator foi operado sem o controle de oxigênio dissolvido (OD). Os níveis de OD evoluíram em função dos metabolismos aeróbios ativos, e

atingiam a saturação assim que as conversões microbianas eram finalizadas.

Características da sedimentação: Durante o período de *start-up* foi aplicada a diminuição gradual no tempo de sedimentação (de 25 a 13 min) para promover a seleção das partículas mais densas e a eliminação das partículas com pior sedimentabilidade, que foram removidas do reator por *wash-out*. Após as condições de *start-up* o tempo de sedimentação foi mantido em 13 min.

A biomassa é considerada predominantemente granular quando o diâmetro de pelo menos 50 % das partículas é superior a 200 μm (de KREUK; KISHIDA; van LOOSDRECHT, 2007; LIU et al., 2010). O período de granulação no presente estudo durou 56 dias, quando 52 % das partículas apresentaram diâmetro médio de 268 μm .

3.1.3 Monitoramento do reator

Durante a etapa de *start-up* para a formação dos grânulos, o monitoramento do reator foi realizado uma vez por semana. Nesta etapa foram realizadas coletas da entrada (esgoto bruto), saída (efluente tratado no fim das 4 h), do licor misto após 1 min de aeração (correspondente a 13 min do ciclo) e no final desta mesma fase. Com esta amostragem, pode-se acompanhar as condições gerais de funcionamento do reator e determinar as eficiências de remoção obtidas. Após o *start-up*, a coleta destas amostras foi realizada duas vezes por semana. O monitoramento de um ciclo padrão foi realizado uma vez por mês, onde foram efetuadas coleta de diversos pontos ao longo da fase aeróbia, com o objetivo de verificar a conversão dos substratos. Essas amostras foram coletadas a cada 5-30 min.

As amostras coletadas foram conservadas e armazenadas a 4 °C para logo serem analisadas. As amostras contendo os compostos de interesse solúveis foram logo filtradas em membrana de acetato celulose (poro 0,45 μm). De forma a tornar os resultados físico-químicos mais precisos, realizou-se análises em duplicata (amostras filtradas) e em triplicata (amostras não filtradas).

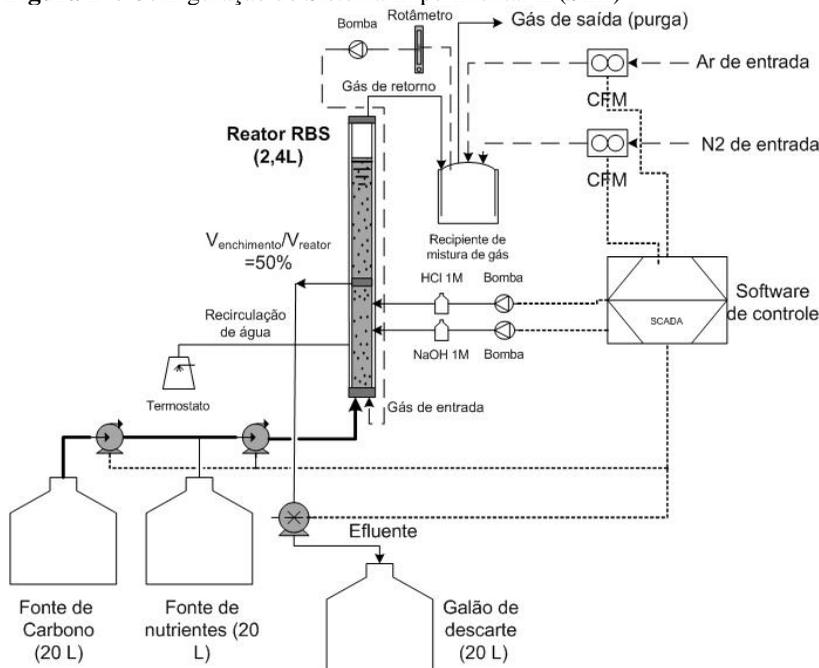
3.2 SISTEMA EXPERIMENTAL II (SEII)

3.2.1 Características Gerais

O sistema experimental utilizado, e instalado nas dependências do grupo de Biotecnologia Ambiental no Departamento de

Biotecnologia na Universidade Técnica de Delft, era composto por bombas peristálticas para o bombeamento de esgoto sintético, galões de 20 L para armazenamento do esgoto sintético, termostato, bomba para recirculação de gás (N811 KN.18, KNF Verder, Alemanha), reator de bancada, rotâmetro, controlador de fluxo de massa (CFM) e Sistemas de Supervisão e Aquisição de Dados, ou abreviadamente SCADA (*Supervisory Control and Data Acquisition*) foi realizado via Sartorius DCU4 (Sartorius stedim biotech, Alemanha). A configuração geral do sistema experimental pode ser visualizada na Figura 17.

Figura 17: Configuração do Sistema Experimental II (SEII)



Fonte: Próprio autor

Nesta pesquisa optou-se por utilizar esgoto sintético, a fim de controlar condições ideais para o enriquecimento dos organismos acumuladores de poli-fosfato (PAO). O esgoto sintético foi bombeado com o auxílio de bombas peristálticas a partir de dois galões de 20 L, sendo um contendo a fonte de carbono e o outro contendo as fontes de nutrientes (descrição da composição do esgoto descrito abaixo, no item 3.2.2) para dentro do reator. Antes e após o enchimento do reator havia

a injeção de gás N_2 a uma vazão de $3 \text{ NL } N_2 \text{ min}^{-1}$, para garantir a remoção de oxigênio dissolvido residual. A fase anaeróbia com mistura no reator foi realizada pela recirculação do volume de gás presente no “headspace” do reator sob condições de injeção de nitrogênio a $1 \text{ L } N_2 \text{ min}^{-1}$ por meio de um CFM (5850TR, Brooks, USA). Na fase aeróbia, a concentração e oxigênio dissolvido foi mantida a 50% da saturação pela injeção de ar e de nitrogênio no sistema de recirculação de gás. A mistura de gás atravessou um difusor na base do reator para fornecer pequenas bolhas ao sistema. A velocidade superficial ascensional da mistura de gases foi de 2 cm s^{-1} .

O reator em batelada sequencial utilizado tinha uma geometria de reator de bolhas sendo uma coluna de vidro com parede dupla e apresentando as seguintes dimensões: diâmetro interno de 6,3 cm e altura total de 150 cm. A altura do líquido dentro do reator foi de 90 cm, resultando em um volume útil de 2,4 L. Desta forma, o reator apresentou uma alta razão entre a altura útil e o diâmetro ($A/D = 14,3$). Uma representação esquemática do sistema está ilustrada na Figura 18.

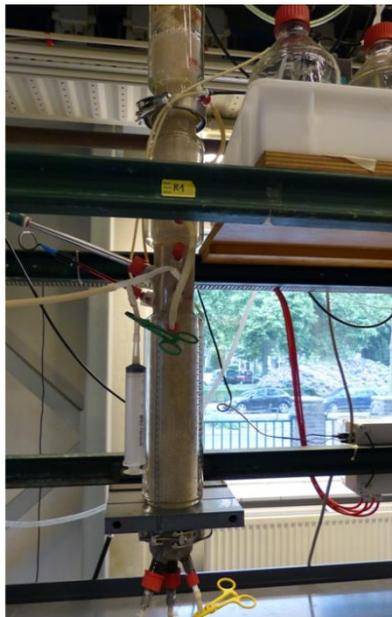
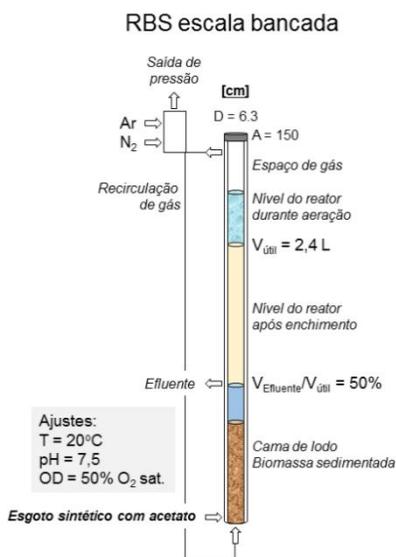
Além do OD, a temperatura e pH também foram controlados neste reator. A temperatura foi mantida em 20°C com o auxílio de um termostato e o pH a 7,5, o qual era regulado com HCl e NaOH a 1 mol L^{-1} . O pH, OD, condutividade e temperatura foram registrados *online* (sonda de pH, Methrom, Suíça; sonda de DO, AppliSens, EUA; e sonda de condutividade SK24T, Consort, Bélgica).

3.2.2 Operação do reator

A composição do esgoto sintético consistiu em ácido graxo volátil (AGV) como fonte de carbono, uma vez se sabe que as PAO dependem deste tipo de substrato para o bom funcionamento de seu metabolismo (WEISSBRODT et al., 2013b). Mais especificamente o acetato foi escolhido neste trabalho, pois dentre as espécies de AGVs, o acetato é a forma mais encontrada em afluentes de ETE (CUEVAS-RODRÍGUEZ; TEJERO-MONZÓN, 2003). O afluente foi complementado com Alil-N-tioureia (ATU) para inibir a nitrificação e consequentemente o ciclo de nitrogênio, como base preferencial para as “*Ca. Accumulibacter*”. Ainda para fornecer ótimas condições para as PAO, alto teor de fósforo foi proporcionado (WEISSBRODT et al., 2013a, 2014), sendo aplicada inicialmente a relação C/P de $8 \text{ g}_C \text{ g}_P^{-1}$ contendo $125 \text{ mg}_P \text{ L}^{-1}$. Porém, no dia 30 esta razão foi modificada para $16 \text{ g}_C \text{ g}_P^{-1}$, pois de acordo com Lin; Liu; Tay, (2003) altas razões C/P levaram ao aumento do tamanho dos grânulos, o que pode

consequentemente estar ligada a uma maior produção de hidrogéis nestas condições. Mesmo aumentando a razão C/P, o teor de fósforo continuou alto e propício para o crescimento das PAO, com $62 \text{ mg}_P \text{ L}^{-1}$. A composição detalhada do esgoto sintética está detalhada no Apêndice A.

Figura 18: Dimensões esquemáticas (*esquerda*) e fotografia (*direita*) do reator de bancada do SEII operado para granulação e produção de exopolímero por “*Ca. Accumulibacter*”.



Fonte: Weissbrodt & Guimarães (autor)

Fase anaeróbia: A etapa anaeróbia foi projetada como um "seletor anaeróbio" para assegurar o consumo completo do material orgânico antes de mudar para a aeração, como pré-requisito para a seleção de PAO sobre os organismos heterotróficos ordinários (OHO). Sob tais condições anaeróbias, a mistura foi conseguida por recirculação do gás contido no *headspace* do reator a $3,0 \text{ NL min}^{-1}$ (correspondendo a uma velocidade de gás superficial de $0,016 \text{ m s}^{-1}$) e injetando gás nitrogênio a $1,0 \text{ NL min}^{-1}$. A condutividade eléctrica em linha foi utilizada para monitorar e controlar o comprimento da fase anaeróbia em função da liberação de ortofosfato a partir da atividade metabólica anaeróbia das PAO (AGUADO et al., 2006; MAURER; GUJER, 1995;

WEISSBRODT et al., 2013b, 2014). A concentração residual de AGVs no final da fase de carga anaeróbia foi monitorada.

Fase aeróbia: Durante a aeração, a concentração de OD na fase líquida foi mantida a 50% de saturação de O₂ por injeção de ar e de nitrogênio gasoso no circuito de recirculação de gás. O comprimento da fase de aeração também foi ajustado com base nas medidas de condutividade elétrica on-line, as quais se correlacionaram linearmente com a captação de ortofosfato por PAO.

Fase de sedimentação: A granulação foi realizada pela agregação espontânea das PAO. As condições tradicionais de *wash-out* utilizadas para o processo de granulação (BEUN et al., 1999) não foram aplicadas. O tempo de sedimentação foi ajustado apenas em resposta ao lodo com sedimentação rápida que se formou e acumulou progressivamente.

3.2.3 Monitoramento do reator

Para o monitoramento da evolução da biomassa no reator foram coletadas amostras de 10 mL do licor misto três vezes por semana. O volume total do efluente (1,2 L) era coletado e concentrado por centrifugação (3850 × g, 20 min) uma vez por semana. O processo de granulação foi acompanhado a partir da observação das amostras do licor misto coletadas regularmente. O enriquecimento das PAO foi acompanhado regularmente com a coleta de amostras do licor misto, imediatamente filtradas em filtros com poro 0,45 μm (Millipore, Ireland), logo após o enchimento e no final do período anaeróbio, para verificar o consumo de acetato e a liberação de fosfato. Uma vez por semana foi realizado um acompanhamento mais detalhado do perfil de fosfato e acetato coletando mais pontos durante o ciclo, a cada 15-30 min. Além disso, o perfil de liberação e consumo de fosfato pode ser acompanhado pelas medições online de condutividade.

As amostras coletadas para análises de biologia molecular foram realizadas três vezes por semana. Para as análises baseadas no DNA genômico, um volume de 50 mL do licor misto foi coletado no fim do período de aeração, rapidamente centrifugado e armazenadas em triplicata. Amostras para análise de FISH foram logo fixadas em 4 % paraformaldeído (AMANN et al., 1990). Amostras de 50-400 mL do licor misto foram coletadas no final da aeração, centrifugadas e congeladas para extração do exopolímero do tipo alginato. A quantidade de licor misto amostrada para a extração aumentou com o tempo em função do acúmulo de biomassa no reator e para manter a idade do lodo em torno de 30 dias.

3.3 ANÁLISES DOS GRÂNULOS

O acompanhamento da formação e da morfologia dos grânulos nas amostras do SEI foi realizado 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 também foi realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JEOL JSM-6390LV) pelo Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Foram encaminhadas amostras do licor misto ao Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC para a realização das análises granulométricas por difração a laser (Mastersizer 2000, Malvern Instrument SA).

O processo de granulação no SEII também foi acompanhado por microscopia ótica, enquanto as distribuições de tamanho dos grânulos foram quantificadas com um analisador de imagem (Quantiment 500 Image Analyzer, Leica Cambridge Instruments, UK).

Em relação ao IVL, este foi obtido conforme a metodologia recomendada por APHA (2005) (*Standard Methods* - SM 2710 D), no entanto este foi determinado para diferentes tempos de sedimentação. Em reatores de lodo granular, devido a boa sedimentabilidade do lodo, é recomendável o cálculo dos IVL referentes aos tempos de 5, 10 e 30 min (SCHWARZENBECK; ERLEY; WILDERER, 2004). Os IVL referentes a 5 e a 10 min de sedimentação (IVL₅ e IVL₁₀, respectivamente) foram calculados de maneira análoga ao IVL₃₀. A razão IVL_{5/10} ou IVL_{10/30} contribuiu como um indicador do processo de granulação, a qual tende a apresentar valores próximo de 1 quando tem-se grânulos no reator. Para a determinação do IVL, coletou-se 1000 mL do licor misto e o volume de lodo foi determinado após 5, 10 e 30 min de sedimentação da biomassa. O IVL foi obtido conforme a Equação 9:

$$IVL_T = \frac{VLS \times 1000}{SST} \quad \text{Equação 9}$$

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

3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras coletadas no SEI foram analisadas no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA, UFSC) e nas salas de procedimentos do LABEFLU, enquanto as amostras do SEII foram analisadas nos laboratórios do grupo EBT na TU Delft. As análises físico-químicas foram realizadas seguindo as metodologias que são recomendadas pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). As variáveis analisadas e a metodologia empregada em cada sistema operacional estão apresentadas na Tabela 2.

A concentrações de sólidos suspensos totais (SST), voláteis (VSS) e cinzas no licor misto foram analisadas de acordo com os métodos padrão (APHA, 2005). As concentrações de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) e ortofosfato foram analisadas espectrofotometricamente utilizando kits colorimétricos (Hach-Lange, Alemanha). As concentrações de acetato foram medidas por HPLC (BioRad, EUA).

3.5 MEDIÇÃO DO GÁS ÓXIDO NITROSO (N_2O)

Para realizar a medição de N_2O , a parte superior do reator no SEI foi fechada com uma tampa hermética que só permite a saída de ar por meio de uma mangueira a ela conectada. Essa mangueira conduziu o fluxo de ar advindo do reator ao fundo de um recipiente contendo 4 L de uma solução de NaOH 3 mol L^{-1} com adição de 20 mL de timolftaleína 0,4% (indicador de pH). Essa solução teve a função de capturar o CO_2 , de forma a eliminar uma possível interferência deste gás nas medições de N_2O . Ao passar pela solução de NaOH, o ar borbulhou através do líquido, sendo em seguida capturado por uma mangueira conectada ao analisador de gases, que indicou a concentração de N_2O do fluxo gasoso. O analisador de gases utilizado (Guardian SP, UK) baseia-se na detecção de raios infravermelhos com comprimento de onda duplo não-dispersivo, sendo este tipo de equipamento frequentemente utilizado em pesquisas similares. O equipamento efetuou a leitura da concentração de N_2O (em ppm) durante os ciclos monitorados, e os dados foram coletados a cada 15 s, manualmente. Os cálculos de conversão de unidades e concentração de N_2O em relação ao nitrogênio afluente no reator foram apresentados por Daudt (2015).

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos analisados no SEI e SEII

Parâmetros físico-químicos	Metodologia empregada no SEI	Metodologia empregada no SEII
Oxigênio Dissolvido (OD) Temperatura pH Condutividade ^a	Sonda multiparâmetros (YSI 6600)	Medição pelas sondas separadas de OD (AppliSens), pH (Methrom) e temperatura/condutividade (Consort) e registrados on-line via SCADA (Sartorius).
Sólidos Suspensos Totais (SST)	Método gravimétrico em membrana de fibra de vidro (0,47 µm).	Método gravimétrico com e sem membrana de fibra de vidro (0,47 µm).
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) Sólidos Suspensos Fixos (SSF)	Calcinação da biomassa em mufla a 550 °C	Calcinação da biomassa em mufla a 550 °C
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Digestão em refluxo fechado. Leitura em espectrofotômetro HACH®, modelo DR-3900	n.a.
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ₅)	Manométrica com digestão de 5 dias em base agitadora HACH®, modelo BOD-Track.	n.a.
Acetato	Cromatografia Líquida, Dionex ICS-5000	Cromatografia líquida, Biorad, com detector UV.
Nitrogênio Total (Nt)	Método colorimétrico, Kit HACH (822)	n.a.
Nitrogênio amoniacal (N-NH ₄)	Método colorimétrico, Kit HACH (731)	Método colorimétrico, Kit HACH (303)
Nitrito (N-NO ₂ ⁻), nitrato (N-NO ₃ ⁻), acetato	Cromatografia Líquida, Dionex ICS-5000	n.a.
Fosfato (P-PO ₄ ³⁻)	Cromatografia Líquida, Dionex ICS-5000	Método colorimétrico, Kit HACH (348, 349 e 350)
Fósforo Total (P _{Total})	Método colorimétrico do Vanadomolibdato.	n.a.

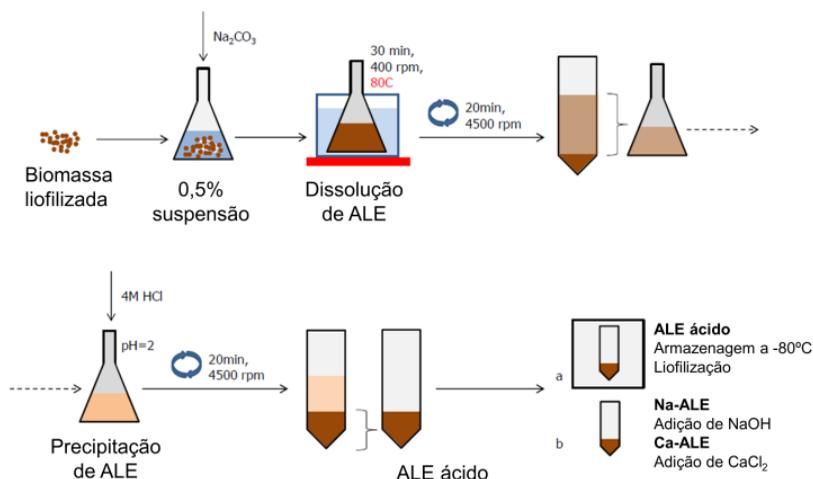
^aCondutividade monitorada apenas no SEII

3.6 EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS)

EPS foram extraídos de um volume de 5 mL de amostras do licor misto do reator piloto do SEI, sob condições alcalinas ($\text{pH} > 10$) pela adição de 5 mL de NaOH a 1 mol L^{-1} e alta temperatura (30 min a 80°C), seguido de sonicação (5 min a 55 kHz) (TAY; LIU; LIU, 2001b). As frações de polissacarídeos e proteínas no EPS foram analisadas utilizando os métodos fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e folin-fenol (LOWRY et al., 1951), respectivamente.

O procedimento de extração de exopolímeros do tipo alginato (ALE) foi realizado nas amostras do SEII e está demonstrado na Figura 19.

Figura 19: Esquema do procedimento da extração de exopolímeros do tipo alginato (ALE)



Fonte: adaptado de Gubser (2015)

As frações em massa de extratos ácidos de ALE produzidos na biomassa granular foram extraídas a partir de 1 g de licor misto centrifugado ($3850 \times g$ por 10 min), congelado (-80°C) e liofilizado a -44°C e 10^{-1} atm (FreeZone 45, Labonco, EUA). Foi adicionado a esta biomassa seca 1,35g de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ e acrescentados em 100 mL de água da miliQ, a fim de obter 1% (massa/volume) de lodo em suspensão

e 0,5% (massa/volume) de Na_2CO_3 . Esta suspensão, contendo um pH maior que 10, foi aquecida em banho-maria a 80°C e agitada (400rpm) por 30 min para a liberação de ALE no meio. O ALE dissolvido passou por uma centrifugação ($3850 \times g$, 20 min), e foi então coletado o sobrenadante. Em seguida, o ALE foi precipitado pela adição de HCl 4M ajustando o pH final entre 2,0 e 2,5. Esta solução foi centrifugada e o pellet obtido é o ALE em sua forma ácida. O ALE ácido foi congelado, liofilizado e pesado, para então se ter o valor de massa de ALE (FELZ et al., 2016; LIN et al., 2010). A propriedade de gelificação e o comportamento semelhante ao alginato dos exopolímeros extraídos foram verificados pela formação de sais exopoliméricos à base de cálcio e sódio (LIN; SHARMA; VAN LOOSDRECHT, 2013).

3.6.1 Análises físico-químicas nos extratos de EPS

A partir dos EPS extraído das amostras do SEI, as frações de exopolissacarídeos (PS) e proteínas (PN) foram analisadas utilizando os métodos fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e folin-fenol (LOWRY et al., 1951), respectivamente.

A caracterização dos exopolímeros extraídos das amostras do SEII foi mais detalhada, uma vez que neste segundo estudo o objetivo foi avaliar o potencial de produção de EPS e seu potencial de recuperação como um material valorizado. Portanto, assim como no SEI, as frações de PS e PN foram avaliadas, porém por vários métodos.

Polissacarídeos

A presença de polissacarídeos na composição química dos extratos de exopolímeros do SEII foi verificada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) utilizando glicose como solução padrão. Além desta técnica, a composição de açúcares foi analisada por cromatografia de troca iônica de alto desempenho (*High Performance Anion Exchange* – HPAE) equipado com coluna CarboPac Pa20 e detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD, Dionex, EUA). Antes das amostras serem analisada por HPAE-PAD, a forma ácida de ALE passou por diálise e hidrólise (ZHANG et al., 2012). Para o procedimento da diálise, 15 mg de ALE ácido seco foi diluído em 2 mL de água MiliQ e colocados em uma bolsa de diálise (3.5K MWCO, Thermo Scientific Snakeskin). A bolsa foi então imersa em um béquer com água MiliQ à temperatura ambiente e 80 rpm durante uma noite (*overnight*). O produto da diálise foi direcionado para o procedimento de hidrólise sob condições ácidas, 300 rpm e 150°C por um tempo de 12-

24 horas. Após a hidrólise foi acrescentado isopropanol nas amostras para sua secagem e posterior amostragem para a cromatografia.

Proteínas

As proteínas presentes no ALE extraído do SEII foram verificadas pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976) e BCA (bicinchoninic acid assay) seguindo as instruções do kit (Interchim, França) utilizando albumina (BSA) como solução padrão. Além disso, a detecção de proteínas foi testada por eletroforese em gel de poliacrilamida ou PAGE (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), onde as amostras separam-se com a adição do detergente SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), sendo a técnica habitualmente conhecida por SDS-PAGE.

Material inorgânico e decomposição térmica

A decomposição térmica e as frações inorgânicas e voláteis de sólidos nos exopolímeros foram medidas por análise de termogravimetria (*Thermogravimetric analysis* – TGA). Uma quantidade de cerca de 5 mg das amostras de ALE ácido liofilizado foi colocada em cadinho de cerâmica, o qual foi disposto no analisador térmico (STA 449 F3 Jupiter, Netzsch, Alemanha). A temperatura de aquecimento máxima foi de 700 °C, com uma velocidade de aquecimento de 5 K min⁻¹ e sob atmosfera de ar como gás protetor.

Propriedade de formação de gel

A propriedade de formação de gel foi testada pela adição de solução de CaCl₂ a 2% (m/v) no ALE (LIN; SHARMA; VAN LOOSDRECHT, 2013). O ALE ácido fresco (sem ser congelado e liofilizado) foi dissolvido por adição de NaOH a 0,5 mol L⁻¹ até atingir um pH final de 8, em seguida vertido em uma placa de Petri de 2,5 cm e seca em temperatura ambiente (20 °C) para formar uma película fina e conferir a propriedade de formação de filme (ZLOPASA et al., 2015).

Espectroscopia de Raman

As variações nas composições químicas globais dos exopolímeros foram medidas por espectroscopia Raman, a qual atinge a amostra com uma fonte de laser, espalhado luz em diferentes frequências dependendo do material. Os espectros Raman do EPS-ALE ácido liofilizado foram obtidos em uma faixa espectral de 100 a 3000

cm⁻¹ medidos com um espectrômetro de tipo dispersivo Renishaw (InVia Reflex), equipado com um detector CCD (*Charge Coupled Device*). Utilizou-se um microscópio (Leica) com uma ampliação de 50x para focar o feixe de laser na amostra. A fonte de excitação foi proporcionada por diodo laser de 785 nm. O espectro foi registado com 50% (~ 30 mW / μm^2) de intensidade de laser na amostra, com 5 acumulações utilizando 10 s de tempo de exposição. Esta análise foi realizada pelos técnicos responsáveis pelo microscópio de Raman localizado no laboratório FAM, Faculdade Aeroespacial, TU Delft, Delft, Países Baixos.

Fluorescência de ligação por lectinas acoplada à microscopia confocal

Amostras de grânulos enriquecidos com “*Ca. Accumulibacter*” foram enviadas ao Centro Helmholtz em pesquisa ambiental, Departamento de Ecologia de Rios, Magdeburg, Alemanha, para avaliar a presença de glicoconjugados através da análise de fluorescência de ligação por lectina (*fluorescence lectin-binding analysis – FLBA*) (STAUDT et al., 2003; ZIPPEL; NEU, 2011). Cortes transversais foram realizados nos grânulos e nas fatias foram avaliadas a presença de lectinas com o auxílio de um microscópio confocal de varredura à laser (*confocal laser scanning microscopy - CLSM*).

3.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.7.1. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A técnica de biologia molecular FISH baseia-se na detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos através da hibridização de oligonucleotídeos marcados com fluóforos (chamados de sondas) com o rRNA do organismo alvo. As sondas utilizadas são oligonucleotídeos complementares às sequências que se pretende identificar. A aplicação da técnica permite determinar a morfologia celular, a abundância dos indivíduos e a identificação filogenética dos mesmos. Esta técnica tem demonstrado ser uma importante ferramenta para a identificação de micro-organismos em lodos e biofilmes (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; NIELSEN et al., 2009). As amostras foram coletadas quinzenalmente no SEI e semanalmente no SEII para a realização da técnica de FISH. A metodologia empregada pode ser dividida nas seguintes etapas (detalhadas no Apêndice A): fixação, corte

transversal dos grânulos, hibridização com a sonda específica e observação das lâminas em microscópio com fluorescência.

A técnica de FISH foi utilizada no SEI para a determinação da população microbiana relacionada à nitrificação, desnitrificação e remoção de fósforo. Nas amostras do SEI, as sondas específicas foram marcadas com CY3 e todas as células microbianas foram coradas com 1% 4,6-diamidino-2-phenilindol (DAPI), o qual foi utilizado como referência. Nas amostras do SEII o FISH foi utilizado, principalmente, para estimar o grau de enriquecimento de “*Ca. Accumulibacter*”, porém neste caso não foi utilizado o DAPI. Como referência, as bactérias totais foram hibridizadas com a sonda de bactérias totais (EUB338_{mix}) marcada com o fluóforo fluos. Os oligonucleótidos específicos para PAO e GAO foram utilizados como alvo no SEII, marcados com os fluorocromos CY3 e CY5, respectivamente. As sondas específicas utilizadas para a avaliação microbiana no SEI e SEII com suas respectivas sequências, especificidade e referências estão detalhadas na Tabela 3. Os detalhes das sondas estão disponíveis no site do Probase (LOY et al., 2007).

Todas as amostras do SEI foram analisadas em contraste com o DAPI, examinadas com microscópio óptico (BX41, Olympus, Japão) e as imagens processadas com o auxílio do software ImageJ (versão 1.50i, EUA). As lâminas com as amostras do SEII foram observadas utilizando um microscópio de epifluorescência Axioplan 2 (Zeiss, Alemanha) equipado com conjuntos de filtros 26, 20 e 17 para Cy5, Cy3 e fluos, respectivamente. As imagens foram trabalhadas no software AxioVision's que acompanha este sistema epifluorescente.

Tabela 3: Descrição das sondas de oligonucleotídeos utilizadas na análise de FISH (rRNA).

Sonda	Organismo alvo	Sequência (5'-3')	Referência
EUB _{mix} (I+II+III)	Eubactérias	I - CTG CCT CCC GTA GCA II - CAG CCA CCC TAG GT GT CTG III - CCA CCC GTA GGT GT	(AMANN et al., 1990; DAIMS et al., 1999)
Nitrificantes			
NEU	<i>Nitrosomonas</i> sp.	CCC CTC TGC TGC ACT CTA	(WAGNER et al., 1995)
NSO190	Oxidadoras de amônia <i>β-Proteobacteria</i>	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	(MOBARRY et al., 1996)
NIT3	<i>Nitrobacter</i> sp.	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	(WAGNER et al., 1996)
Ntspa662	<i>Nitrospira</i>	GGA ATT CCG CGC TCC TCT	(DAIMS et al., 2001b)
Amx820	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ” “ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	AAA ACC CCT CTA CTT AGT GCC C	(SCHMID et al., 2001)
Desnitrificantes			
THIO51	Algumas <i>Thiobacillus</i>	GTC ATG AAA CCC CGC GTG GT	(FIGUEROLA; ERIJMAN, 2007)
PAE997	<i>Pseudomonas</i> spp.	TCT GGA AAG TTC TCA GCA	(AMANN et al., 1996)
PDV1031	<i>Paracoccus desnitrificans</i>	CCT GTC TCC AGG TCA CCG	(NEEF et al., 1996)

Continuação da Tabela 3: Descrição das sondas de oligonucleotídeos utilizadas na análise de FISH (rRNA).

Sonda	Organismo alvo	Sequência (5'-3')	Referência
Acumuladoras de fósforo			
PAO 651	Maioria dos membros “ <i>Ca. Accumulibacter</i> ”	CCC TCT GCC AAA CTC CAG	(CROCETTI et al., 2000a)
PAO462	“ <i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> ”	CCG TCA TCT ACW CAG GGT ATT AAC	(CROCETTI et al., 2000a)
PAO846		GTT AGC TAC GGC ACT AAA AGG	(CROCETTI et al., 2000a)
Acc1-444	Clade I - “ <i>Ca. Accumulibacter</i> ”	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	(FLOWERS et al., 2009a)
Acc2-444	Clade II - “ <i>Ca. Accumulibacter</i> ”	CCCGTGCAATTTCTTCCCC	
DECHLO2	<i>Dechloromonas</i>	GCTCAATCAGCGCAAGGTCT	(SANGUIN et al., 2006)
DECHLO2_C1			
TET1-266	Clade1 - <i>Tetrasphaera</i>	CCCGTCGTCGCTGTAGC	(NGUYEN et al., 2011a)
Acumuladoras de glicogênio			
GAO431	“ <i>Ca. Competibacter phosphatis</i> ”	TCC CCG CCT AAA GGG CTT	(CROCETTI et al., 2002)
GAO989	“ <i>Ca. Competibacter phosphatis</i> ”	TTC CCC GGA TGT CAA GGC	(CROCETTI et al., 2002)
CPB_654	<i>Competibacteraceae</i>	TCC TCT AGC CCA CTC	(MCILROY et al., 2015b)

3.7.2 Extração de DNA

Para a caracterização da comunidade microbiana no SEI, aproximadamente, 50 mL do licor misto foi coletado quinzenalmente no final da fase de aeração do RBS piloto. Uma alíquota de 1,8 mL foi retirada da amostra homogeneizada e armazenada na solução do Power Bead Tube do kit de extração de DNA MoBio Power Soil™ kit (Carlsbad, CA) para então ser extraído o DNA seguindo as recomendações do kit. Após o processo de extração, 100 µL de solução com DNA é obtido e verificado utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) para ser estocado a -20 °C para uso posterior. A quantidade de DNA extraído foi medida espectrofotometricamente usando um Biospectrofotômetro (Eppendorf).

A amostragem das amostras do SEII para a caracterização da comunidade microbiana foi realizada de 2 a 3 vezes por semana. Amostras de 50 mL do licor misto foram coletadas no fim da aeração, removido parte do sobrenadante e o material sedimentado foi distribuído em três microtubos (amostras guardadas em triplicatas). As amostras nos microtubos foram centrifugadas, e o sobrenadante descartado, sendo armazenado apenas o pellet a -80 °C, na TU Delft. As amostras foram transportadas até o centro de Comunidades Microbianas, na Universidade de Aalborg, Dinamarca, para então serem processadas seguindo Midas field guide, sendo que todos os protocolos estão disponíveis no respectivo website (MCILROY et al., 2015a). O DNA genômico foi extraído das amostras trituradas de biomassa utilizando o kit de isolamento FAST DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e concentração dos DNA extraídos foram verificados pelo Nanodrop, sendo as razões A260/A280 verificada entre 1,8 e 2,0, e a razão A260/A230 entre 2,0 e 2,2. Após obter as concentrações dos DNA extraídoa, estea foram diuídos para 20ng µL⁻¹ em volumes de pelo menos 15µL.

3.7.3 Amplificação quantitativa por reação em cadeia da polimerase (qPCR)

A técnica de qPCR foi utilizada para quantificar fragmentos de DNA específicos que carregam informações responsáveis por manifestar características ligadas à remoção de nutrientes no tratamento de esgoto sanitário. As comunidades microbianas avaliadas neste trabalho foram voltadas para a elucidação da dinâmica do nitrogênio no reator piloto do

SEI. Genes funcionais associados a nitrificação e desnitrificação foram quantificados ao longo do período de monitoramento do reator. A nitrificação foi correlacionada com a presença de bactérias que apresentam o gene que codificam a enzima amônia monooxigenase (*amoA*). A desnitrificação foi relacionada com os genes que codificam as enzimas redutases, tais como, nitrato (*narG*), nitrito (*nirS*), óxido nítrico (*cnorB* e *qnorB*), e óxido nitroso redutase (*nosZ*). Os iniciadores utilizados para cada gene funcional, com suas respectivas sequencias e referências estão descritos na Tabela 4. Para cada conjunto de iniciadores, foi construída uma curva padrão por diluições em série (10^{10} a 10^3 cópias do gene $\mu\text{g}_{\text{DNA}}^{-1}$) do DNA plasmídico recombinante contendo as sequências alvo clonadas (MEZZARI et al., 2013). Todas as misturas de reações foram preparadas com concentração final de iniciadores a $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ com o kit qPCR-SYBR-Green mix / ROX (Ludwig Biotec, Brasil). Todos os cDNA foram preparados em triplicata e analisados utilizando o sistema de PCR em tempo real 7500 (Applied Biosystems, Países Baixos). As análises foram realizadas de acordo com Angnes et al. (2013), pela Embrapa Suínos – Concórdia, SC, Brasil.

3.7.4 Sequenciamento de nova geração

As composições de comunidades bacterianas e a dinâmica de populações do SEI e SEII foram analisadas por sequenciamento de *amplicons* de nova geração com base no gene 16S rRNA região v1-v3, utilizando o guia MiDAS dos micro-organismos de lodos ativados (MCILROY et al., 2015a). O par de iniciadores bacterianos universais 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 534R 5'-ATTACCGCGG CTGCTGG-3' foi utilizado para amplificação por PCR (ALBERTSEN et al., 2015). Os produtos de PCR (*amplicons*) foram sequenciados em média de $23'600 \pm 5'400$ leituras por amostra (min: 12'100, máx: 34'400) utilizando um sequenciador de desktop MiSeq (Illumina, EUA). O tratamento bioinformático dos dados foi realizado por Prof. David G. Weissbrodt. O conjunto de dados de sequenciamento de *amplicons* foram processados de acordo com KARST et al. (2016). O mapeamento foi conduzido utilizando a base de dados MiDAS tendo como referência as sequências de gene de 16S rRNA para atribuir as leituras das unidades taxonômicas operacionais (OTU) ao parentesco bacteriano mais próximo. Cada conjunto de dados da amostra foi rarefeito para 10.000 leituras como base de comparação e processado com o auxílio do software R usando o pacote ampvis (ALBERTSEN et al., 2015).

Tabela 4: Descrição da sequência, perfil do ciclo e tamanho em pares de base (PB) dos iniciadores utilizados neste estudo

Iniciadores	Grupo alvo	Sequencia (5'-3')	Tamanho (pb)	Configuração da PCR (40 ciclos)	Referência
16Sf	Bactéria	ATGGCTGTCGTCAGCT	357	94 °C/5 min, 94 °C/15 s, 53°C/15s, 72 °C/40 s	(FERRIS; MUYZER; WARD, 1996)
16Sr		ACGGGCGGTGTGTAC			
amoA1f	<i>β-Proteobacteria</i> (<i>Nitrossomonas</i> , <i>Nitrospira</i>)	GGGGTTTCTACTGGTGGT	490	94 °C/5 min, 94 °C/15 s, 55 °C/30s, 72 °C/30 s	(ROTTHAUWE; WITZEL; LIESACK, 1997)
amoA2r		CCCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC			
narG2f	Nitrato redutase, Subunidade α. ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> .	TA(CT) GT(GC) GGG CAG GA(AG) AAA CTG	110	94 °C/5 min, 94 °C/15 s, 58 °C/30s, 72 °C/31 s	(LÓPEZ-GUTIÉRREZ et al., 2004)
narG2r		CGT AGA AGA AGC TGG TGC TGT T			
nirS2f	Nitrito redutase, citocromo <i>cd</i> ₁ ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i> , <i>Roseobacter denitrificans</i> .	TACCACCC(C/G)GA(A/G)CCGCGCGT	164	94 °C/5 min; 94 °C/15 s, 53 °C/15s, 72 °C/60 s	(BRAKER; FESEFELDT; WITZEL, 1998)
nirS3r		GCCGCCGTC(A/G)TG(A/C/G)AGGAA			
qnorB2f	Óxido nítrico redutase, quinol-oxidante ^a <i>Paracoccus halodenitrificans</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> .	GGN CAY CAR GGN TAY GA	262	94 °C/5 min; 94 °C/15 s, 54 °C/45s, 72 °C/45 s	(BRAKER; TIEDJE, 2003)
qnorB5r		ACC CAN AGR TGN ACN ACC CAC CA			

Continuação da Tabela 4: Descrição da sequência, perfil do ciclo e tamanho em pares de base (PB) dos iniciadores utilizados neste estudo

Iniciadores	Grupo alvo	Sequencia (5'-3')	Tamanho (pb)	Configuração da PCR (40 ciclos)	Referência
nosZf	Óxido nitroso redutase <i>Proteobacteria</i> .	AGAACGACCAGCTGATCGACA	380	94 °C/5 min; 94 °C/15 s, 62 °C/15s, 72 °C/60 s	(CHON et al., 2011)
nosZr		TCCATGCTCACGCCGTGGTTG			
nosZF1	Óxido nitroso redutase <i>Firmicutes e Bacteroidetes</i> .	AGAACGACCAGCTGATCGACA	162	94 °C/5 min; 94 °C/24 s, 60 °C/24s, 72 °C/24 s	(JUNG et al., 2013)
nosZF2		TCCATGCTCACGCCGTGGTTG	158		
nosZF3		AGAACGACCAGCTGATCGACA	246		
nosZGeoR ^b		TCCATGCTCACGCCGTGGTTG			

^a Encontrados em ampla faixa de grupos fisiológicos. Aqui foram citados alguns gêneros mais comuns encontrados em amostras ambientais.

^b O iniciador reverse (nosZGeoR) foi usado na construção da biblioteca de clones para detectar os três grupos: nosZF1, nosZF2 e nosZF3.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Correlações significativas ($p < 0,05$) entre espécies de nitrogênio com genes de nitrificação e desnitrificação foram avaliados utilizando o coeficiente de Pearson. Todos os dados de abundância de gene foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator utilizando os softwares OriginPro 8© OriginLab Corporation e Statistica (StatSoft, EUA). O teste de comparação de pares de Tukey foi ainda utilizado para determinar a diferença significativa entre dois conjuntos de dados com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3.9 CÁLCULOS

Muitos tipos de notações das unidades são disponíveis na área de tratamento de águas residuárias. Para seguir um padrão, todas as unidades neste estudo foram adaptadas de acordo com Corominas et al. (2010).

3.9.1 Vazão diária de esgoto (Q_d)

$$Q_d = n_c \times V_e \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

Q_d é a vazão diária de esgoto ($L d^{-1}$),

N_c é o número de ciclos realizados por dia (d^{-1}),

V_e é o volume de enchimento por ciclo (L).

3.9.2 Carga volumétrica (CV)

$$CV = \frac{C_{\text{afluente}} \times Q_d}{V_r} \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

CV é a carga volumétrica aplicada por dia ($mg \text{ DQO ou } NH_4\text{-N ou } P_{\text{Total}} L^{-1} d^{-1}$),

C_{afluente} é a concentração de DQO, N-NH4 ou P_{Total} no afluente ($mg L^{-1}$),

Q_d é a vazão diária de esgoto ($L d^{-1}$),

V_r é o volume útil do reator (L).

3.9.3 Carga específica (CE) ou relação Alimento/Micro-organismo

$$CE = \frac{C_{\text{afluente}} \times Q_d}{V_r \times X_{\text{SSV}}} \quad \text{Equação 12}$$

Onde:

CE, também conhecido como relação alimento/micro-organismo (A/M) é a carga volumétrica aplicada por dia e por biomassa do reator (mg DQO ou NH₄-N ou P_{Total} gSSV⁻¹ d⁻¹),

C_{afluente} é a concentração de DQO, N-NH₄ ou P_{Total} no afluente (mg L⁻¹),

Q_d é a vazão diária de esgoto (L d⁻¹),

V_r é o volume útil do reator (L),

X_{VSS} é a concentração de sólidos suspensos voláteis no reator (g SSV L⁻¹).

3.9.4 Velocidade superficial ascensional de ar (V_{ar})

$$V_{ar} = \frac{Q_a}{A_b} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

Onde:

V_{ar} é a velocidade superficial ascensional de ar (cm s⁻¹),

Q_a é a vazão de ar aplicada (m³ s⁻¹),

A_b é a área da base do reator (m²).

3.9.5 Velocidade ascensional de esgoto (V_{afluente})

$$V_{\text{afluente}} = \frac{Q_e}{A_b} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

Onde:

V_{afluente} é a velocidade ascensional de esgoto afluente (m h⁻¹),

Q_e é a vazão da bomba de enchimento (m³ h⁻¹),

A_b é a área da base do reator (m²).

3.9.6 Velocidade de remoção volumétrica de substrato (r_{DQO}, r_{NH₄}, r_{P_{tot}})

$$r_{DQO, NH_4, P_{tot}} = \frac{(C_i - C_e) V_e / t_c}{V_r} \quad \text{Equação 15}$$

Onde:

r_{DQO}, r_{NH₄}, r_{P_{tot}} é a velocidade de remoção volumétrica de substrato (mg DQO ou NH₄ ou P_{total} d⁻¹ L_R⁻¹),

C_i é a concentração afluente de substrato (mg DQO ou N ou P L⁻¹),

C_e é a concentração efluente de DQO (mg DQO ou N ou P L⁻¹),

Ve é o volume efluente de um ciclo operacional do RBS (L),
 tc é o tempo de um ciclo operacional do RBS (d),
 Vr é o volume útil do reator RBS (L_R).

3.9.7 Velocidade de remoção específica de substrato (q_{DQO} , q_{NH_4} , q_{Ptot})

$$q_{DQO, NH_4, Ptot} = \frac{(C_i - C_e)V_e/t_c}{V_r X_{VSS}} \quad \text{Equação 16}$$

Onde:

$q_{DQO, NH_4, Ptot}$ é a velocidade de remoção específica de substrato (mg DQO ou NH₄ ou P_{total} d⁻¹ g SSV⁻¹),

C_i é a concentração afluente de substrato (mg DQO ou N ou P L⁻¹),

C_e é a concentração efluente de DQO (mg DQO ou N ou P L⁻¹),

Ve é o volume efluente de um ciclo operacional do RBS (L),

tc é o tempo de um ciclo operacional do RBS (d),

Vr é o volume útil do reator RBS (L_R),

X_{VSS} é a concentração de sólidos suspensos voláteis no reator (g SSV L⁻¹).

3.9.8 Idade do lodo (θ)

$$\theta = \frac{X_{SSV} V_r}{(X_d V_d + X_e V_e) / t_c} \quad \text{Equação 17}$$

Onde:

θ é a idade do lodo também conhecido como tempo de retenção de sólidos (TRS) (d),

X_{VSS} é a concentração de sólidos suspensos voláteis no reator (g SSV L⁻¹),

Vr é o volume útil do reator RBS (L_R),

X_d é a concentração de biomassa manualmente descartada (g SSV L⁻¹),

V_d é o volume manualmente (L),

X_e é a concentração de sólidos suspensos voláteis efluente (g SSV L⁻¹),

Ve é o volume efluente de um ciclo operacional do RBS (L),

tc é o tempo de um ciclo operacional do RBS (d).

Caso não tenha descarte manual de lodo durante a operação do reator, a equação pode ser simplificada (LIU; TAY, 2007):

$$\theta = \frac{X_{VSS} V_r}{X_e V_e / t_c} \quad \text{Equação 18}$$

3.9.9 Velocidade específica observada de crescimento de biomassa (μ_{obs})

De acordo com a correlação entre μ_{obs} e a idade do lodo como mostrado na Eq. (19), μ_{obs} (d^{-1}) é inversamente proporcional com θ (d) no estado estacionário.

$$\frac{1}{\mu_{obs}} = \theta \quad \text{Equação 19}$$

3.9.10 Coeficiente observado de produção de biomassa (Y_{obs})

O coeficiente observado de produção de biomassa (Y_{obs}) é a razão entre a quantidade de biomassa formada e a quantidade de substrato removido, que pode ser calculada seguindo a equação 20 (LIU; TAY, 2007):

$$Y_{obs} = \frac{[(X_{vss2} - X_{vss1})V_r + X_e V_e]}{t_c(C_i - C_e)V_e/t_c} \quad \text{Equação 20}$$

Onde:

Y_{obs} é o coeficiente observado de produção de biomassa (g SSV g^{-1} DQO),

X_{SSV2} é a concentração de sólidos suspensos voláteis do fim do ciclo operacional de um RBS (g SSV L^{-1}),

X_{SSV1} é a concentração de sólidos suspensos voláteis no início do ciclo operacional de um RBS (g SSV L^{-1}),

V_r é o volume útil do reator (L_R),

t_c é o tempo de um ciclo de um RBS (d),

X_e é a concentração de sólidos suspensos voláteis efluente (g SSV L^{-1}),

V_e é o volume efluente de um ciclo operacional de um RBS (L),

C_i é a concentração afluyente de DQO (g DQO L^{-1}),

C_e é a concentração efluente de DQO (g DQO L^{-1}).

Quando o reator atinge o estado estacionário e a concentração de biomassa no reator é mantida a um valor constante, o Y_{obs} corresponde à produção de lodo e então a equação 20 pode ser simplificada à equação 21:

$$Y_{obs} = \frac{X_e}{C_i - C_e} \quad \text{Equação 21}$$

O coeficiente de produção teórico (Y) (g SSV g DQO $^{-1}$) distingue-se do Y_{obs} . A diferença é causada por diferentes mecanismos, incluindo metabolismo endógeno, morte celular e predação. Estes mecanismos podem ser expressados por meio da **velocidade específica de decaimento da biomassa** (k_d) (d) (LIU; TAY, 2007). Os valores de ambos os parâmetros (Y e k_d) foram calculados a partir da equação 22:

$$\frac{1}{\theta} = Y \times q_{obs} - k_d \quad \text{Equação 22}$$

Assumindo-se que Y e k_d são constantes para o sistema em estado estacionário, Y e k_d podem ser obtidos plotando $1/\theta$ versus q_{obs} , resultando em uma reta, onde o coeficiente angular é o Y e a intercepção do eixo y é o valor de k_d .

3.9.11 Amônia livre (AL)

A concentração de AL é uma função da concentração total de nitrogênio amoniacal, pH e temperatura da solução, como se segue (ANTHONISEN et al., 1976):

$$AL = \frac{17}{14} \times \frac{C_{NH_4-N} \times 10^{pH}}{\frac{K_b}{K_w} + 10^{pH}} \quad \text{Equação 23}$$

Onde:

AL é concentração de amônia livre como NH₃ (mg NH₃ L⁻¹),
 C_{NH_4-N} é concentração total de nitrogênio amoniacal como N (mg N L⁻¹),
 K_b é a constante de ionização de equilíbrio da amônia,
 K_w é a constant de ionização da água.

Ambas as constantes variam com a temperatura, e a relação entre entre elas se dá pela equação 24:

$$K_b: K_w = e^{\frac{6.344}{273+T(^{\circ}C)}} \quad \text{Equação 24}$$

3.9.12 Ácido nitroso livre (ANL)

A concentração de ANL está relacionada com a concentração total de nitrito, pH e temperatura, como se segue (ANTHONISEN et al., 1976):

$$ANL = \frac{46}{14} \times \frac{C_{NO_2-N}}{K_a \times 10^{pH}} \quad \text{Equação 25}$$

Onde:

ANL é concentração de ácido nitroso livre HNO₂ (mg HNO₂ L⁻¹),
 C_{NO_2-N} é concentração de nitrito como N (mgN-NO₂ L⁻¹).

K_a é a constante de ionização da equação de equilíbrio do ácido nitroso e também varia com a temperatura. K_a pode estar relacionado à temperatura de acordo com a equação 26:

$$K_a = e^{(-2.300/273+^{\circ}C)} \quad \text{Equação 26}$$

3.9.13 Fração de massa de ALE

O peso seco total de ALE ácido deve ser medido depois de sua secagem e a fração de ALE na biomassa (w_{ALE}) pode ser calculada de acordo com a equação 27:

$$w_{ALE} = \frac{X_{ALE}}{X_{biomassa}} \quad \text{Equação 27}$$

Onde:

w_{ALE} é a fração de ALE contida no lodo (mgALE_{ST ou SV} g biomassa_{ST ou SV}⁻¹),

X_{ALE} é o peso seco de ALE ácido extraído (mg ALE_{ST ou SV}),

X_{SV} é o peso seco total de lodo usado na extração de ALE (gbiomassa_{ST ou SV}),

Tanto X_{ALE} quanto X_{SSV} podem ser expressos em termos de sólidos totais (ST) ou sólidos voláteis (SV).

3.9.14 Velocidade de sedimentação ($v_{sedimentação}$)

A velocidade de sedimentação do lodo foi medida adicionando 1L do licor misto em uma proveta (1 L).

$$v_{sedimentação} = \frac{(V_{Biomassa,i} - V_{Biomassa,f}) / t_{sedimentação}}{A_p} \quad \text{Equação 28}$$

Onde:

$v_{sedimentação}$ é a velocidade de sedimentação do lodo (cm min⁻¹),

$V_{biomassa,i}$ é o volume inicial ocupado pelo licor misto (mL),

$V_{biomassa,f}$ é o volume ocupado pelo licor misto depois de sedimentado (mL),

$T_{sedimentação}$ é o tempo que a biomassa sedimentou (min),

A_p é a área da proveta utilizada para a realização da análise (cm²).

3.9.15 Velocidade específica de hidrólise de material particulado (q_H)

O processo da hidrólise torna disponível o substrato de difícil biodegradabilidade, ou seja o particulado (X_s), contido no afluente (GUJER

et al., 1999). A velocidade específica de hidrólise de material particulado pode ser calculada usando a equação 29:

$$q_H = k_H \times \frac{X_S/X_H}{K_x + X_S/X_H} \times X_H \quad \text{Equação 29}$$

Onde:

q_H é a velocidade específica da hidrólise do material particulado ($\text{g } X_s \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$),

k_H é a constante da velocidade de hidrólise ($\text{g } X_s \text{ g}^{-1} X_H \text{ d}^{-1}$),

X_s é a massa de material particulado encontrado no afluente. Pode ser medido pela diferença entre a DQO total e a solúvel, ou por SST afluente ($\text{g } X_s \text{ L}^{-1}$),

X_H é a biomassa heterotrófica responsável pela hidrólise de X_s ($\text{g } X_H \text{ L}^{-1}$),

K_x é a constante de saturação da hidrólise. Nas temperaturas do presente estudo (10-30°C), esta constante foi considerada igual a 1 ($\text{g } X_s \text{ g}^{-1} X_H$).

A constante da velocidade da hidrólise (k_H) é variável com a temperatura e pode ser calculada de acordo com a equação 30:

$$k_H(T) = k(20^\circ\text{C}) \times e^{(\theta_T \times (T - 20^\circ\text{C}))} \quad \text{Equação 30}$$

Onde:

$k(20^\circ\text{C})$ é igual a $3 \text{ g } X_s \text{ g}^{-1} X_H \text{ d}^{-1}$, e θ_T pode ser obtido por:

$$\theta_T = \frac{\ln\left(\frac{k(T_1)}{k(T_2)}\right)}{T_1 - T_2} \quad \text{Equação 31}$$

Sabendo-se que o $k(10^\circ\text{C})$ é igual a $2 \text{ g } X_s \text{ g}^{-1} X_H \text{ d}^{-1}$, o θ_T obtido foi de 0,04.

3.9.16 Tempo de contato de hidrólise (t_H):

$$t_H = \frac{X_S/V_R}{q_H} \quad \text{Equação 32}$$

Onde:

t_H é o tempo de contato entre biomassa e substrato particulado afluente necessário para ocorrer a hidrólise (d),

X_s é a massa de material particulado encontrado no afluente ($\text{g } X_s \text{ L}^{-1}$),

V_R é o volume do reator (L_R),

q_H é a velocidade específica da hidrólise do material particulado ($\text{g } X_s \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

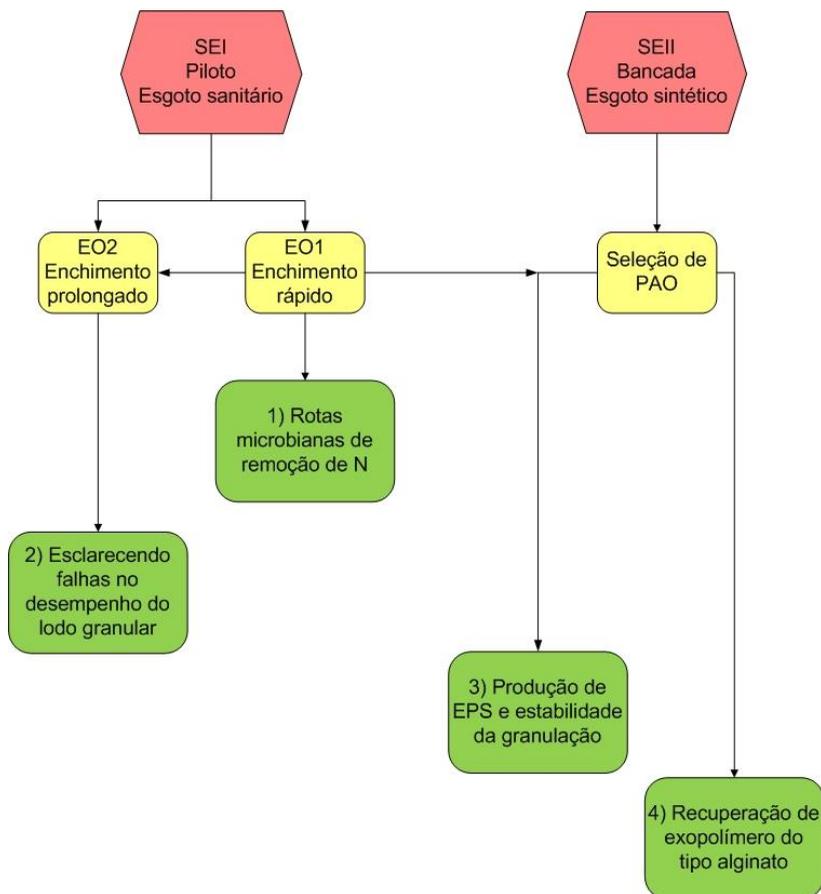
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existência. Não se pode deixar de ficar admirado quando contempla os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que se busque compreender um pouco desse mistério a cada dia. Nunca perca a curiosidade... Não pare de se maravilhar.”

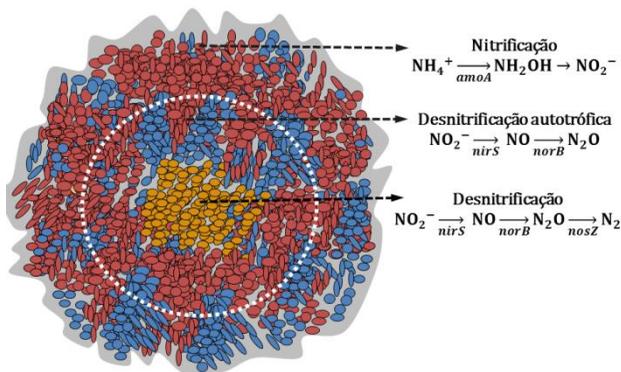
(Albert Einstein, 1955)

Os resultados desta pesquisa que serão apresentados adiante foram subdivididos em quatro itens, os quais se encontram em forma de artigos científicos. Todos estes estudos foram necessários para responder as perguntas e confirmar as hipóteses desta tese. Os estudos possuem a abordagem microbiológica, com o intuito de elucidar as atividades biológicas objetivadas pela engenharia de processo. Desta forma, o primeiro estudo inicia-se com o esclarecimento das principais rotas metabólicas de conversões do nitrogênio em um sistema piloto de tratamento de esgoto sanitário. No segundo estudo, a comparação entre dois regimes de enchimento no mesmo sistema piloto tratando esgoto sanitário trouxe uma densa discussão sobre falhas ocorridas e esclareceu otimizações necessárias para atingir remoção completa de nutrientes atingindo padrões de lançamento mais restritivos. No terceiro item, o processo de granulação foi investigado junto à matriz de EPS e a comunidade microbiana, esclarecendo a importância dos PAO na estabilidade do lodo granular. Por fim, no último e quarto estudo, a produção de exopolímeros por PAO e seu potencial de biorrefinaria foram avaliados. No geral, esta tese traz desde a compreensão dos processos de tratamento biológico de esgoto por lodo granular, até a inserção desta tecnologia na economia circular com a recuperação de biopolímeros. O fluxograma apresentado na Figura 20, esquematiza a forma em que os sistemas experimentais (SE) e as estratégias operacionais (EO) foram comparadas para gerar os estudos apresentados neste item.

Figura 20: Fluxograma que detalha os sistemas experimentais e as estratégias operacionais utilizadas em cada estudo apresentado neste item.



4.1 ROTAS MICROBIANAS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO EM LODO GRANULAR AERÓBIO NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO¹



A tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) tem sido amplamente investigada para o tratamento de esgoto. Porém, as características morfológicas e estruturais dos grânulos e as rotas de

conversões do nitrogênio ainda não foram total-mente esclarecidas utilizando esgoto sanitário real. Para responder esta questão, a distribuição e a diversidade da comunidade microbiana foi investigada em um RBS, assim como as rotas funcionais das conversões do nitrogênio. Grânulos com média de 300 μm foram formados com esgoto sanitário (DQO afluente $< 200 \text{ mg DQO}_{\text{solúvel}} \text{ L}^{-1}$) e as concentrações efluente de DQO e amônia (55 mg DQO L^{-1} , $14 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$) alcançaram os padrões de lançamento nacional. O acúmulo de nitrito foi observado ($16,5 \text{ mg NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$) e emissões de N_2O (2,8 % da carga total de nitrogênio afluente) foram detectadas. Os grânulos eram compostos por protozoários e bactérias, sendo a camada externa dominada por AOB e as internas por NOB e desnitrificantes. As rotas de nitrificação parcial, desnitrificação via nitrito, desnitrificação autotrófica, desnitrificação completa e incompleta foram verificadas pela qPCR. O processo de LGA mostrou o estabelecimento da nitrificação parcial em condição de esgoto de baixa carga, além de reduzidas emissões de N_2O quando comparado com outros processos de nitrificação parcial. No geral, a tecnologia LGA se mostrou atrativa e considerável em casos onde se tem o objetivo de remoção de nitrogênio acompanhado de economia em termos de energia e espaço.

¹ Esse item gerou a seguinte publicação:

GUIMARÃES L. B., MEZZARI, M. P., DAUDT, G. C., COSTA, R. H. R. Microbial pathways of nitrogen removal in aerobic granular sludge treating domestic wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2017. DOI 10.1002/jctb.5176.

MICROBIAL PATHWAYS OF NITROGEN REMOVAL IN AEROBIC GRANULAR SLUDGE TREATING DOMESTIC WASTEWATER

The aerobic granular sludge (AGS) technology has been widely investigated for wastewater treatment. The morphological and structural characteristics of granules and nitrogen pathways have not been fully clarified using real domestic wastewater. To address this issue, microbial community distribution, diversity, and functional pathways toward nitrogen conversions in a sequencing batch reactor were investigated. Granules ($d \sim 300 \mu\text{m}$) were formed with low-strength domestic wastewater ($\text{COD}_{\text{influent}} < 200 \text{ mg COD}_{\text{soluble}} \text{ L}^{-1}$). COD and ammonium effluent concentrations (55 mg COD L^{-1} , $14 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$) achieved national treatment standards. Nitrite accumulation was observed ($16.5 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$) and N_2O emissions (2.8% of nitrogen load) were detected. Granules were composed of protozoa and bacteria, with an outer layer dominated by ammonium-oxidizing bacteria (AOB) and deeper layers with nitrite oxidizing bacteria (NOB) and denitrifiers. Partial nitrification, denitrification via nitrite, nitrifier denitrification, as well as complete and incomplete denitrification pathways were assessed by quantitative PCR (qPCR). The AGS process displayed establishment of partial nitrification under low-strength real wastewater condition. The granular system showed N_2O emission in a lower range than others known partial nitrification processes. In order to achieve cost savings on nitrogen removal in terms of energy and space, wastewater engineering designers can consider AGS as an attractive technology.

4.1.1 Introdução

A tecnologia LGA é considerada como uma promissora alternativa às aplicações convencionais de tratamento de esgoto, uma vez que esta dispensa decantadores secundários em função da propriedade de rápida sedimentação da biomassa e requer uma área 80% menor do que os sistemas de lodos ativados (PRONK et al., 2015). Esta compacta configuração dos sistemas baseados em LGA oferece uma atrativa solução tecnológica para o tratamento de efluentes em cidades com disponibilidade limitada de espaço. Além disso, as características do biofilme fornecem a vantagem da geração de nichos microbiológicos específicos ao longo do gradiente de oxigênio e substrato formado nas diferentes profundidades dos agregados granulares, o que resulta em eficientes processos biológicos para a remoção de carbono e nutrientes dentro de uma única unidade operacional (COMA et al., 2012; DE KREUK; LOOSDRECHT, 2006; ISANTA et al., 2012).

Os sistemas LGA são operados em RBS com configurações de ciclos que estabelecem as condições apropriadas para a seleção de micro-organismos e o desenvolvimento de densos grânulos. A biomassa granular aeróbia é, principalmente, composta de EPS e bactérias (LEMAIRE; WEBB; YUAN, 2008), as quais estão distribuídas baseadas na estratificação dos processos microbianos e a na mudança do potencial de oxidação-redução dentre as camadas aeróbia e anaeróbia dos grânulos (WINKLER et al., 2013). Por exemplo, *Nitrosomonas* sp. e *Nitrospira* sp. são as AOB mais comuns distribuídas nas camadas aeradas da superfície dos grânulos, enquanto os organismos desnitrificantes têm sido encontrados nas camadas anóxicas internas dos grânulos (WINKLER et al., 2013). As NOB mais frequentes encontradas nos sistemas LGA são *Nitrospira* sp. e *Nitrobacter* sp. (WINKLER et al., 2012b), as quais crescem em camadas um pouco profundas do biofilme, onde o nitrito se torna disponível advindo do processo de nitrificação pelas AOB. O nitrito é substrato das NOB, mas é também dos organismos desnitrificantes. Desta forma, o estabelecimento das principais rotas de degradação depende das condições operacionais que favorecem o potencial termodinâmico das reações. Sob condições de oxigênio limitante, as nitrificantes (AOB) também são capazes de produzir óxido nitroso através da via metabólica desnitrificação autotrófica, contribuindo assim para a emissão deste gás do efeito estufa em processos de tratamento de efluentes (KAMPSCHREUR et al., 2009).

Embora informações de conversões de nitrogênio em grânulos aeróbios sejam abundantes, a maioria dos estudos utiliza esgoto sintético (JUNGLES et al., 2011) e/ou foram conduzidos em reatores de escala de laboratório (CHEN et al., 2013; DE KREUK; LOOSDRECHT, 2006; ISANTA et al., 2012). Além disso, investigações utilizando esgoto sanitário têm focado, principalmente, nos processos de granulação e nas condições operacionais aplicadas (COMA et al., 2012; LIU et al., 2010; PRONK et al., 2015), resultando em limitada informação sobre a comunidade microbiana e o seu papel no sistema. Para suprir esta questão, as técnicas de FISH e MEV têm sido amplamente utilizadas para caracterizar a estrutura e a distribuição microbiana em sistemas LGA (LEMAIRE; WEBB; YUAN, 2008; LI et al., 2006). Porém, suas rotas metabólicas na conversão do nitrogênio (processos de nitrificação/desnitrificação e suas variações) devem ser elucidadas utilizando técnicas alternativas como a PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Este método é muito adequado para avaliar a composição da comunidade microbiana e suas funções ecológicas pela quantificação dos genes dominantes dos sistemas de tratamento biológico de esgoto (CYDZIK-KWIATKOWSKA; WOJNOWSKA-BARYLA, 2015; MEZZARI et al., 2013). Porém, a maioria dos estudos com qPCR em sistemas LGA está relacionada apenas com a quantificação de AOB e NOB, sendo limitados os estudos que consideram os micro-organismos dos processos desnitrificantes (WINKLER et al., 2012b). O uso destas três técnicas juntas fornece novos esclarecimentos sobre a estrutura da comunidade microbiana e suas rotas metabólicas na remoção de nitrogênio de sistemas LGA usando esgoto sanitário.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a distribuição da comunidade microbiana em grânulos aeróbios cultivados em um RBS piloto alimentado com esgoto sanitário real, utilizando técnicas de FISH e MEV. Destaque foi dado em fornecer conhecimento dos genes catabólicos nitrificantes e desnitrificantes dominantes, utilizando a técnica de qPCR. Portanto, este estudo contribui para um melhor conhecimento das rotas metabólicas de remoção de nitrogênio em sistemas LGA, fornecendo assim informações importantes que cobrem as lacunas associadas com esta tecnologia de tratamento de águas residuárias.

4.1.2 Materiais e métodos

Características do esgoto sanitário e do inóculo

O esgoto sanitário foi coletado da rede coletora municipal da cidade de Florianópolis, SC, Brasil (-27° 35' 48", -48° 32' 57"). As características do esgoto foram: 150–450 mg DQO_{Total} L⁻¹, 90–380 mg DBO L⁻¹, 36–68 mg NH₄⁺-N L⁻¹, 3–8 mg P_{Total} L⁻¹. Lodo ativado floculento (40 L) foi coletado de uma ETE municipal e utilizado como inóculo. As características do lodo foram: 3,2 g SSV L⁻¹ com IVL₃₀ de 220,2 mL g⁻¹ e IVL₁₀ de 313,4 mL g⁻¹.

Configurações do reator e operação

O sistema LGA foi cultivado em um RBS com diâmetro interno de 25 cm e altura útil de 2,18 m, resultando em um volume útil de 98 L e uma razão altura útil e diâmetro (A/D) de 8,7. A aeração foi fornecida com uma velocidade de vazão de ar de 32 L min⁻¹ e a troca volumétrica no reator foi definida em 56% (Figura 16, item 3). O reator foi operado a temperatura ambiente sem controle de pH. O processo de granulação foi obtido utilizando a técnica de lavagem de biomassa (*wash-out*), onde o tempo de sedimentação foi progressivamente reduzido de 35 para 13 min a fim de selecionar as partículas de melhor sedimentabilidade (LIU et al., 2010). O reator-LGA foi operado em modo de bateladas sequenciais com tempo de ciclo de 4 h dividido em: 3 min de enchimento; 10 min de período anóxico (sem aeração ou agitação); 211 min de aeração; 13 min de sedimentação; e 3 min de descarte do efluente tratado. Um CLP foi usado para controlar a operação das bombas, válvulas, sensores e a extensão de cada batelada do ciclo operacional.

Procedimentos analíticos

Nitrogênio amoniacal (NH₄⁺-N) e total (NT) foram determinados espectrofotometricamente (DR3900, HACH, EUA) utilizando kits Hach® pelos métodos salicilato com cianeto e digestão com persulfato, respectivamente (APHA, 2012). A precisão dos resultados foi testada com a adição de uma concentração de nitrogênio conhecida na amostra. Análises em duplicata confirmaram um erro insignificante devido à interferência da matriz. Concentrações de nitrogênio-nitrato (NO₃⁻-N) e nitrogênio-nitrito (NO₂⁻-N) foram analisadas com cromatografia iônica utilizando o sistema ICS-5000 (DIONEX Corporation, EUA). O N₂O foi monitorado na saída de gás do reator com um analisador de gás baseado em tecnologia de infravermelhos com comprimentos de onda duplos não dispersivos

(Guardian SP, UK). Temperatura, pH e OD foram medidos com uma sonda multiparâmetros (YSI 6600 V2).

Série de sólidos e DQO foram analisados de acordo com *Standard Methods* (APHA, 2012). O IVL convencional (IVL ou IVL₃₀) foi determinado com amostras do licor misto, coletadas no fim da fase aeróbia (APHA, 2012). IVL₅ e 10 foram obtidos medindo o volume de biomassa sedimentada depois de um período de 5 e 10 min, respectivamente (SCHWARZENBECK; ERLEY; WILDERER, 2004).

A microscopia óptica (Olympus BX40, Japão) foi usada para monitorar a formação dos grânulos e sua estrutura ao longo do período de operação. Análises detalhadas da estrutura dos grânulos maduros foram executadas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM- 6390LV, Japão). A distribuição do tamanho das partículas das amostras de licor misto homogeneizadas foi determinada por difração a laser (Malvern MasterSizer Série 2000, Malvern Instruments, UK).

Identificação das populações e dinâmicas bacterianas por métodos moleculares

Amostras do licor misto (do fim da fase de aeração) foram coletadas e o DNA extraído utilizando o kit de isolamento de DNA PowerSoil[®] DNA (MoBio Laboratories Inc., EUA) seguindo as instruções do fabricante. A concentração de bactérias totais, nitrificantes e desnitrificantes foram estimadas pela análise de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) com os iniciadores e condições dos ciclos descritos na Tabela 4, item 3. Para cada conjunto de iniciadores, uma curva de calibração foi construída pela diluição em série (10^{10} a 10^3 cópias de gene μg^{-1}) do DNA plasmídico recombinante contendo as sequências alvo clonadas como já descrito anteriormente (MEZZARI et al., 2013). Todas as misturas das reações forma preparadas com concentração final dos iniciadores a 250 nM usando o kit qPCR-SYBR-Green (Ludwig Biotec, Brazil). Todas as amostras de cDNA foram preparadas em triplicatas e analisados usando o sistema de PCR em tempo real 7500 (Applied Biosystems, Países Baixos).

Análises de FISH foram realizadas para monitorar o perfil microbiológico nos grânulos direcionando para as AOB, NOB e desnitrificantes (AMANN et al., 1990). Depois da fixação das amostras em 4% paraformaldeído (AMANN et al., 1990), preparou-se secções dos grânulos de 40 μm de espessura a partir de uma amostra de grânulos congelados e incorporados em composto O.C.T.Tissue-Tek[®] utilizando

um criostato (CM 1850, Leica, Alemanha) a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada fatia foi colocada em lâminas microscópicas revestidas com poli-L-lisina (Sigma Aldrich), as quais foram desidratadas em uma série gradual de etanol a 50%, 80% e 98%. As sondas utilizadas neste estudo foram, EUBmix, NSO190, Ntspa662 e PDV1031. Os detalhes destas sondas estão disponíveis na Tabela 3, item 3. As células microbianas foram coradas com 1% 4,6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) e examinadas com microscópio óptico (BX41, Olympus, Japão). As imagens foram combinadas e processadas com o auxílio do software ImageJ (versão 1.50i, EUA).

Análises estatísticas

Correlações significativas entre espécies de nitrogênio com genes da nitrificação e desnitrificação foram avaliadas utilizando o coeficiente de Pearson. Todos os dados de abundância de genes foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) usando OriginPro 8 © OriginLab Corporation. O teste de comparação de pares de Tukey foi ainda utilizado para determinar a diferença significativa entre dois conjuntos de dados com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4.1.3 Resultados e discussões

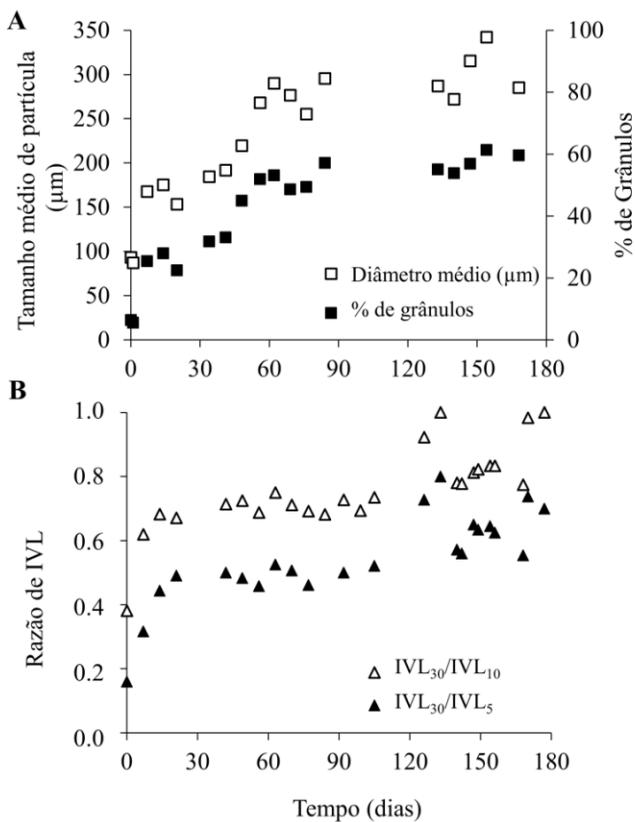
Formação dos grânulos aeróbios

Após a inoculação do RBS com lodo ativado floculento, a agregação das partículas apresentou um aumento gradual no tamanho dos agregados de 80 a 270 μm no diâmetro médio, dentro de um período de 56 dias (Figura 21 A). Posteriormente, mais de 50% do lodo consistia em grânulos aeróbios com diâmetro superior a 200 μm (diâmetro médio estabilizado a 290 μm), tamanho proposto para a definição de grânulos (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007) caracterizando assim um reator predominantemente granular.

A característica física do lodo em termos de IVL foi determinada e os valores melhoraram gradualmente ao longo do tempo. Com base nas análises de IVL_{30} , as concentrações dos flocos de sedimentação lenta diminuíram de 220 mL g^{-1} no dia 1 para 100 mL g^{-1} no dia 56 e para 67 mL g^{-1} no dia 126. Isto significou que a sedimentabilidade do lodo melhorou com o fenômeno de formação de grânulos. Foram obtidas melhores propriedades de sedimentação com baixos valores de IVL_{10} e 5, o que contribuiu para a obtenção de

granulação com valores de razão de 1 e 0,7 para IVL_{30}/IVL_{10} e IVL_{30}/IVL_5 , respectivamente (Figura 21 B).

Figura 21: Desenvolvimento do inóculo flocculento de lodo ativado para grânulos em termos de (A) tamanho médio das partículas e % de grânulos que consistem na quantidade de partículas com diâmetro superior a 200 μm ; (B) razões IVL_{30}/IVL_{10} e IVL_{30}/IVL_5 .



As pesquisas têm se empenhado para o desenvolvimento de um processo de granulação previsível através da alteração de parâmetros de engenharia, tais como força de cisalhamento, pressão de seleção, concentração do substrato, configuração do reator, entre outros (SARMA; TAY; CHU, 2017). No entanto, os estudos mostraram variações no tempo de formação, tamanho e características de sedimentabilidade dos grânulos (Tabela 5). Estudos anteriores

mostraram que os grânulos cultivados com esgoto sanitário em sistemas piloto e em escala real atingiram tamanhos de diâmetro semelhantes de aproximadamente 0,3 mm (LI et al., 2014; NI et al., 2009; PRONK et al., 2015; WAGNER et al., 2015a), enquanto que os grânulos cultivados em escala de bancada são mais rapidamente formados e atingem um maior tamanho com uma melhor capacidade de sedimentação (DE KREUK; LOOSDRECHT, 2006; ISANTA et al., 2012; WAGNER; COSTA, 2013). O EPS produzido pelos micro-organismos é um fator chave responsável pela granulação, uma vez que sua composição está diretamente relacionada com a estrutura do biofilme (ADAV; LEE; TAY, 2008). Portanto, a grande diversidade de micro-organismos que compõem os grânulos e suas variações diante das diferentes condições e sistemas são uma forte razão para que os resultados não sejam reprodutíveis.

Tabela 5: Resumo do tempo de granulação e características dos grânulos, para diferentes tipos de afluentes, em reatores RBS nas escalas de bancada, piloto e real, relatados por diversos autores.

Escala do reator	Tipo de afluente	DQO _{afluente} (mg DQO L ⁻¹)	Granulação (dias)	Tamanho de grânulo (mm)	IVL ₃₀ (mL g ⁻¹)	Referências
Piloto	Sanitário	~ 200	56	0,29	67	Presente estudo
Piloto	Sanitário	< 200	80	0,30	35	(NI et al., 2009)
Piloto	Sintético	400	51	2,4	13	(ISANTA et al., 2012)
Piloto	30% Sanitário 70% industrial	200-600	50	0,28	43	(LI et al., 2014)
Piloto	Sanitário	~ 300	160	0,47	75	(WAGNER et al., 2015a)
Bancada	Sanitário	~ 430	140	0,3-1,3	53	(WAGNER ; COSTA, 2013)
Bancada	Sanitário	280	20	1,1	38	(DE KREUK; LOOSDRECHT, 2006)
Bancada	30% Sanitário 70% industrial	200-600	43	0,3	38	(LI et al., 2014)
Real	30% Sanitário 70% industrial	200-600	337	0,5	48	(LI et al., 2014)
Real	Sanitário	~ 500	150	> 0.2	35	(PRONK et al., 2015)

Desempenho do reator na remoção de carbono e nitrogênio

Os grânulos aeróbios foram formados com baixas concentrações de DQO solúvel na entrada, que variaram entre 88 e 428 mg DQO_{solúvel} L⁻¹ (média de 202 ± 97 mg DQO_{solúvel} L⁻¹). Para estas análises, os resultados mostraram uma carga orgânica aplicada de 0,66 ± 0,32 Kg DQO_{solúvel} m⁻³ d⁻¹ e de 1,10 ± 0,4 Kg DQO_{Total} m⁻³ d⁻¹, respectivamente. As concentrações de DQO_{Total} no esgoto sanitário do Brasil são, tipicamente, baixas (400 - 800 mg L⁻¹), embora apresentem quantidades consideráveis de sólidos suspensos (200-450 mg L⁻¹). No entanto, águas residuárias com concentração média de substrato inferior a 170 mg DQO_{solúvel} L⁻¹ são também adequadas para a formação de grânulos aeróbios (NI et al., 2009).

Com relação ao desempenho de remoção de DQO_{solúvel} e DBO no reator piloto RBS-LGA, os resultados atenderam aos padrões brasileiros da Resolução 430 (CONAMA, 2011). As concentrações médias de DQO_{solúvel} e DBO obtidas a partir da análise do efluente tratado foram de 54,9 ± 18 mg L⁻¹ e 47,0 ± 24 mg L⁻¹, respectivamente. A concentração de DQO_{solúvel} foi medida ao longo de um ciclo (4 h) durante o período estável do reator granular. Na Figura 22A, pode-se verificar que a DQO_{solúvel} foi principalmente reduzida durante a fase anóxica, onde as concentrações diminuíram de 176 mg L⁻¹ para 87 mg L⁻¹ dentro de 13 min do ciclo. Uma vez que o oxigênio começou a ser adicionado no sistema, a concentração de DQO_{solúvel} diminuiu para 67 mg L⁻¹ dentro de 17 min de aeração (30 min de ciclo) e então oscilou entre 60 e 78 mg L⁻¹ (Figura 22A). Na fase de aeração, a concentração de OD aumentou (de 13 a 20 min do ciclo), estabilizando-se no nível de saturação de oxigênio (8,4 mg L⁻¹). Em relação ao desempenho de DQO_{solúvel}, o consumo aeróbio rápido seguido da saturação de OD foi também relatado em estudos anteriores utilizando esgoto sanitário em escala piloto com configuração de ciclo semelhante (NI et al., 2009; WAGNER et al., 2015a). A flutuação da concentração de DQO_{solúvel} durante a fase de aeração pode estar relacionada com a hidrólise da matéria orgânica particulada por protozoários (detectados no presente estudo, ver abaixo) e subsequente consumo de matéria orgânica biodisponível por bactérias. Esta observação está de acordo com um estudo prévio que demonstrou a remoção do substrato particulado dominado por processos de adsorção na superfície do grânulo, seguido por hidrólise e consumo dos produtos hidrolisados (DE KREUK et al., 2010).

O desempenho do reator LGA na remoção de nitrogênio foi

monitorado durante um período de 180 dias, que estão resumidos na Figura 22B. A carga nitrogenada aplicada variou de 0,10 a 0,23 g de $\text{NH}_4^+\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A nitrificação foi primeiramente observada durante o período de granulação no dia 21 com 51% de eficiência de remoção. A oxidação quase completa do nitrogênio amoniacal em nitrato (90%) foi conseguida no dia 42 com 2,2 mg $\text{NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$ e 1,4 mg $\text{NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$. De forma semelhante, um estudo mostrou 98% de remoção de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ após 50 dias de operação (LIU et al., 2010). Em seguida, predominou a nitrificação parcial via nitrito, que manteve concentrações efluentes em média de $14,3 \pm 4,0$ mg $\text{NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ e produção de 16,5 mg $\text{NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$ e 7,5 mg $\text{NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$. Os resultados alcançaram o critério de lançamento de amônia brasileiro, que requer uma concentração máxima de 20 mg $\text{NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ no efluente (CONAMA, 2011). Além disso, durante o período de aeração, a concentração de nitrogênio amoniacal e a alcalinidade diminuíram (Figura 22B), o que corrobora com a ocorrência do processo de nitrificação nessa fase do ciclo.

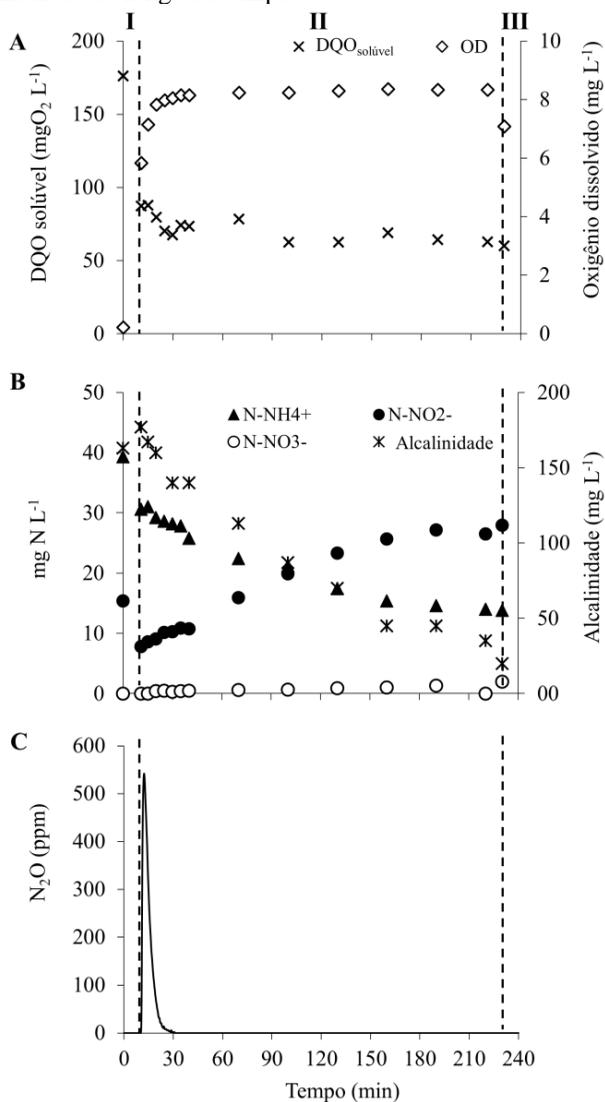
A nitrificação parcial foi predominante no reator e comumente ocorre em reatores com grânulos aeróbios (COMA et al., 2012; ISANTA et al., 2012; YANG et al., 2013), sendo o nitrogênio amoniacal predominantemente oxidado em nitrito (Figura 22B). De fato, o nitrito acumulou no sistema em quantidades consideráveis no final do ciclo operacional e no início do próximo ciclo (Figura 22B). Além disso, observou-se uma diminuição de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (de 34,0 a 30,6 mg L^{-1}) no sistema durante a fase anóxica (OD abaixo de 0,5 mg L^{-1}), confirmando a oxidação de amônio nessas condições, conforme já relatado anteriormente (CHEN et al., 2016). Além disso, a Figura 22B mostra o consumo de $\text{NO}_2^-\text{-N}$ como receptor de elétrons com o aumento da alcalinidade durante a fase anóxica em condições de OD limitado.

A remoção de nitrogênio pode ser afetada pelo diâmetro dos grânulos, uma vez que o volume anóxico diminui com a redução do tamanho dos grânulos (MATSUMOTO et al., 2010). Nos pequenos grânulos (~ 0,3 mm) encontrados no presente estudo, o volume anóxico pode ter sido um fator limitante para remover o nitrogênio. Estudos têm mostrado para processos de nitrificação parcial-anammox que os grânulos menores tendem a acumular nitrito ou mesmo nitrato (MOZUMDER et al., 2014). Além disso, um estudo que comparou o diâmetro dos grânulos mostrou que grânulos maiores ($d > 0,9$ mm) poderiam proporcionar ambiente anóxico para o crescimento de desnitrificantes, aumentando assim a eficiência de remoção de nitrogênio total (BIN et al., 2011). A nitrificação parcial nas condições atuais de configuração do ciclo (ciclo de 4 h com alimentação rápida)

tratando esgoto sanitário de baixa carga demonstrou ser tecnicamente viável e reprodutível em um local de clima tropical, já que um estudo prévio conduzido no mesmo reator também atingiu o acúmulo de nitrito (WAGNER et al., 2015a). Isto poderia ser benéfico na redução dos custos em termos de energia com menor consumo de oxigênio na fase aeróbia e diminuição da produção de lodo nos processos de nitrificação e desnitrificação (PENG; ZHU, 2006).

Elucidar a dinâmica de nitrogênio no presente sistema LGA com esgoto real pode contribuir para o conhecimento atual sobre o potencial biológico de emissão de N_2O e as suas implicações ambientais associadas. O N_2O foi detectado durante os primeiros 30 min do ciclo (Figura 22C), com um pico estreito de concentração acima de 530 ppm logo após o início da aeração (dentro de 1 min de aeração) e, em seguida, diminuiu rapidamente abaixo dos limites de detecção. Há alguns fatores relevantes em ETE que contribuem para as emissões de N_2O , como oxigênio dissolvido, nitrito, repentinas mudanças nas condições do processo, relação C/N, consumo de compostos armazenados intracelulares e pH (KAMPSCHEUR et al., 2009). Neste estudo, a limitada disponibilidade de compostos orgânicos biodegradáveis ($DQO_{\text{solúvel}} < 200 \text{ mg L}^{-1}$) e o elevado acúmulo de nitrito ($15 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$) no sistema durante a fase anóxica desencadeou processos de desnitrificação heterotrófica e assim produção de N_2O . Além disso, a condição de baixo oxigênio ($OD < 0,5 \text{ mg L}^{-1}$) acompanhada com a presença de nitrito e nitrogênio amoniacal proporcionam condições adequadas para aumentar a produção de N_2O através da rota de desnitrificação autotrófica (TALLEC et al., 2006). Portanto, a emissão de N_2O foi induzida principalmente pelo acúmulo de nitrito no sistema LGA, o que é amplamente apoiado por vários estudos que correlacionaram a produção de N_2O com o acúmulo de nitrito (KAMPSCHEUR et al., 2009). Esta hipótese é suportada pela forte correlação (coeficiente de Pearson igual a 0,8) encontrada entre a emissão de N_2O e a concentração de nitrito no efluente. A fração da concentração de nitrogênio afluente convertida em N_2O varia de 0 a 14,6% entre os estudos em escala real (KAMPSCHEUR et al., 2009) e de 0 a 3,7% em sistemas de nitrificação parcial em escala real (SHARON) (TALLEC et al., 2006). No presente estudo, uma média de $2,8 \pm 1,2\%$ do nitrogênio total foi convertido em N_2O . Embora o N_2O tenha sido produzido no sistema, a concentração detectada foi substancialmente reduzida quando comparada a outros sistemas de tratamento de águas residuárias (LAW et al., 2012).

Figura 22: Ciclo operacional do dia 156 do sistema LGA no tratamento de esgoto sanitário. O ciclo de 240 min consistiu de três fases: (I) 3 min de alimentação, seguido de 10 min de anoxia sem mistura; (II) 211 min de aeração; (III) 13 min de sedimentação seguido de 3 min de retirada de efluente. Perfil de concentração de $\text{DQO}_{\text{solúvel}}$ e OD (A); Nitrogênio como amônio, nitrito e nitrato, e alcalinidade (B); e emissão de N_2O (C) foram medidos ao longo do tempo.



A remoção de fósforo não foi monitorada devido às baixas concentrações de fósforo total ($5,5 \pm 1,8 \text{ mg P}_{\text{Total}} \text{ L}^{-1}$) no esgoto sanitário afluente. A concentração média final de fósforo efluente atingiu os critérios de lançamento de efluentes da lei estadual de Santa Catarina ($\leq 4 \text{ mg P}_{\text{Total}} \text{ L}^{-1}$).

Sucessão da comunidade microbiana em grânulos

No presente estudo, as técnicas de FISH e MEV serviram como poderosas ferramentas para visualizar a arquitetura detalhada da composição microbiana nos grânulos, que pode ser composta principalmente por EPS e bactérias, e também por protozoários e / ou fungos (WEBER et al., 2007). A análise de MEV no LGA documentou a presença de colônias de ciliados, representadas principalmente por *Epistylis* sp. (Figura 23A) na estrutura granular. A presença de protozoários ciliados tem sido descrita por outros estudos em grânulos aeróbios cultivados em esgoto real (LEMAIRE; WEBB; YUAN, 2008; WAGNER et al., 2015a), os quais são primeiramente responsáveis pela assimilação das pequenas partículas orgânicas, incluindo bactérias (SCHWARZENBECK; ERLEY; WILDERER, 2004). Embora o comportamento predatório possa ocorrer, sabe-se que os ciliados excretam compostos estimulantes ao crescimento, os quais aumentam a atividade bacteriana, além de seus talos servirem como suporte de crescimento para as bactérias no processo de formação de grânulos (WEBER et al., 2007). A Figura 23B mostra colônias bacterianas (coradas com DAPI) em forma de nuvem na matriz de EPS, as quais são suportadas por hastes ciliadas. As bactérias observadas nos grânulos aeróbios apresentaram uma ampla variedade morfológica, sendo principalmente encontradas em forma de cocos e bastonetes (Figura 23B). A identificação da coabitação entre ciliados e bactérias no presente estudo indica a importância desta interação em grânulos cultivados em esgoto sanitário. Ciliados e fungos foram sugeridos como o principal substrato de apoio na formação de biofilmes bacterianos e, portanto, atuam como uma espinha dorsal nos grânulos (WEBER et al., 2007).

As oxidadoras de amônia (AOB) foram as bactérias nitrificantes dominantes localizadas principalmente na camada mais externa dos grânulos alimentados com esgoto sanitário (Figura 23C), mas também foram ligeiramente detectadas no interior do grânulo (Figura 23D), como ilustrado com imagens de FISH. Os aglomerados de AOB

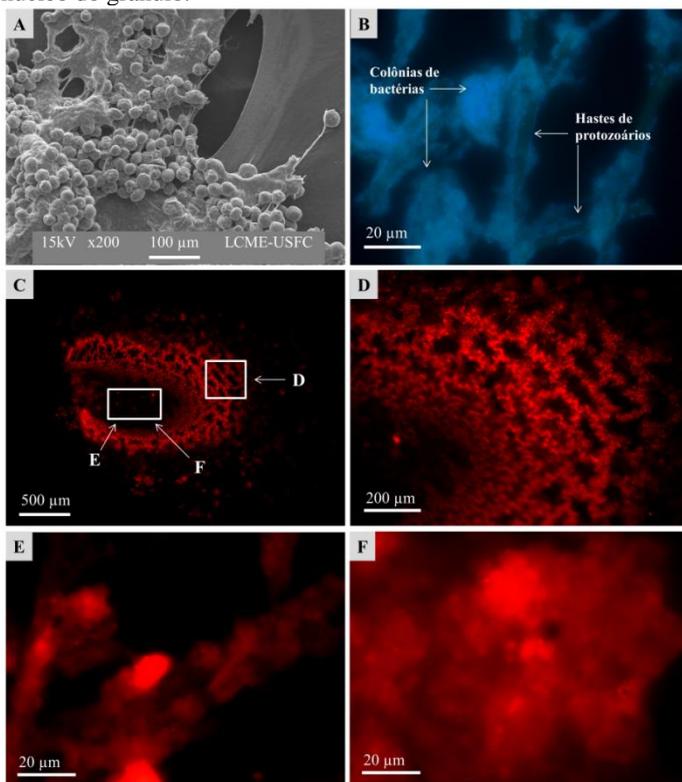
apareceram em uma estrutura de rede ondulada circundante à borda do grânulo, o que é muito peculiar e nunca foi relatada anteriormente de acordo com o melhor conhecimento dos autores. Em outros estudos, os aglomerados de AOB foram detectados na superfície dos grânulos e também no centro, onde podem ocorrer micro-perfis de oxigênio dentro dos grânulos como sugerido anteriormente (LEMAIRE; WEBB; YUAN, 2008). Por outro lado, as AOB localizadas em camadas mais profundas podem usar nitrito como receptor de elétrons e realizar o processo de desnitrificação autotrófica (KAMPSCHREUR et al., 2009).

Poucas colônias de NOB foram detectadas, suportando o observado processo de nitrificação parcial representado pelo acúmulo de nitrito no presente sistema RBS. Embora *Nitrospira* spp. seja a NOB mais comumente encontrada nas ETE (DAIMS et al., 2001a), o escasso número detectado por FISH neste estudo pode estar relacionado à amônia livre (AL), e/ou ao ácido nitroso livre (ANL), e/ou à estratificação das camadas dos grânulos. A presença de NOB pode ter sido ligeiramente influenciada pela AL (média de $1,2 \pm 0,5$ mgAL L⁻¹), cuja quantidade mostrou estar no limite da faixa de inibição de NOB (0,1-1,0 mgAL L⁻¹), enquanto o ANL apresentou valores ($0,04 \pm 0,02$ mg ANL L⁻¹) fora do intervalo de inibição deste organismos ($0,22-2,8$ mg ANL L⁻¹) (ANTHONISEN et al., 1976). A Figura 23C mostra a localização das colônias de *Nitrospira* spp. na área interna do grânulo e a Figura 23E revela os detalhes das mesmas colônias utilizando uma maior ampliação no microscópio. A estratificação de AOB e NOB em grânulos aeróbios revela a repressão de NOB. A presença de colônias de AOB na camada externa é mais favorável à competição pelo oxigênio uma vez que estão mais próximas da superfície dos grânulos, resultando assim numa maior repressão de NOB e no acúmulo de nitrito (POOT et al., 2016).

Foram detectadas bactérias desnitrificantes no núcleo do grânulo (área delimitada na Figura 23C), onde o oxigênio é limitado e onde os produtos NO_x derivados das AOB estão disponíveis. *Paracoccus* spp. é afiliado do filo *Proteobacteria* e as estruturas detalhadas de suas colônias estão representadas na Figura 23F. *Paracoccus denitrificans* crescem aerobicamente ou anaerobicamente, usando nitrato ou nitrito como receptor de elétrons. *Paracoccus* spp. é o gênero dominante entre os reatores com grânulos aeróbios operados em condições especiais tais como: altas temperaturas (26-27 °C), elevada carga de nitrogênio (470 mg NH₄⁺-N L⁻¹) e presença de fase anóxica no início do ciclo (CYDZIK-KWIATKOWSKA; WOJNOWSKA-BARYLA, 2015). No reator piloto LGA estudado, estas bactérias

possivelmente realizaram a maior parte da desnitrificação via nitrito, uma vez que era o receptor de elétrons mais disponível no sistema. Além da camada anóxica no interior do grânulo, o ciclo operacional foi composto pela fase anóxica (10 min) no início do ciclo em temperatura média de 24 °C, proporcionando condições operacionais favoráveis o crescimento das *Paracoccus* sp. neste estudo.

Figura 23: Composição microbiana dos grânulos cultivados em esgoto real. (A) Imagens de MEV e (B, C, D, E e F) imagens de FISH. (A) Ciliados pedunculados - majoritariamente representados por *Epistylis* sp., (B) Colônias bacterianas coradas com DAPI envolvidas na matriz de EPS apoiadas pelas hastes dos ciliados. (C) Fatia de grânulo corada com sonda NSO190, representando o local onde as colônias bacterianas foram identificadas nas imagens D, E e F. (D) Detecção de AOB com sonda NSO190 na camada externa do grânulo. (E) Detecção de colônias de *Nitrospira* sp. com a sonda Ntspa662 e (F) Detecção de *Paracoccus denitrificans* com a sonda PDV1031 no núcleo do grânulo.



Dinâmica na abundância relativa de genes catabólicos das rotas de conversão do nitrogênio

A nitrificação é um processo aeróbio de duas etapas onde primeiro NH_4^+ é catalisado pela enzima amônia monooxigenase (codificada pelo gene *amoA*) a NH_2OH que é então reduzido a NO_2^- pela hidroxilamina oxidoreductase (codificada pelo gene *hao*) (KAMPSCHEUR et al., 2009). Neste trabalho, o gene *amoA* foi utilizado para identificar o processo de nitrificação e foi detectado em todas as amostras analisadas (Figura 24). A partir do dia 86 para 177, houve um aumento de 6 ordens de grandeza (de 10^3 a 10^9) na abundância de cópias do gene *amoA*, indicando que os organismos portadores deste gene (AOB) foram fortemente selecionados nas condições aplicadas neste estudo (Figura 24). Este resultado está de acordo com a população predominante de AOB detectada também pelo FISH. A alta capacidade de oxidação aeróbia do lodo encontrada foi o ponto inicial da remoção de nitrogênio no presente processo, o que eleva a produção de nitrito na nitrificação corroborando com as altas concentrações de nitrito encontrada neste estudo. Além disso, as AOB podem também estar envolvidas na rota metabólica de desnitrificação autotrófica, podendo usar nitrito como receptor de elétrons (KAMPSCHEUR et al., 2009).

Os genes das enzimas nitrato (*narG*), nitrito (*nirS*), óxido nítrico (*qnorB*) e óxido nitroso (*nosZ*) redutases foram utilizados para inferir sobre processos de desnitrificação no presente estudo. É importante ressaltar que um mesmo organismo pode ser portador de mais de um gene da desnitrificação, por exemplo no genoma da *Pseudomonas stutzeri*, os genes *nar*, *nir*, *nor* e *nos* foram identificados (YAN et al., 2005). Portanto, neste estudo a quantificação dos genes responsáveis por cada etapa da desnitrificação indica potenciais rotas metabólicas, as quais podem estar sendo realizadas pelo mesmo organismo.

O gene *narG* foi detectado em todas as amostras, exceto no dia 156, e a abundância não mostrou diferenças estatísticas ao longo do tempo, mantendo assim o número de cópias deste gene entre 10^4 e 10^5 por mL de amostra (Figura 24). O número de cópias do gene *narG* detectadas neste estudo foram cinco ordens de grandeza inferior às cópias 16S rDNA, o que representa a baixa densidade deste grupo em relação às bactérias totais. Como este estudo mostrou nitrificação parcial com acúmulo de nitrito e baixas concentrações de nitrato, o sistema não

induziu o crescimento de bactérias que abrigam o gene *narG* que codifica a nitrato redutase responsável pela redução de nitrato a nitrito por bactérias facultativas (HENRY et al., 2004). Portanto, a presença do gene *narG* neste estudo, pôde ocorrer advindo de algumas bactérias que são comuns em ETE como *Comamonadaceae*, *Azoarcus*, *Thauera*, *Dechloromonas* e *Candidatus Accumulibacter* da família *Rhodocyclaceae* (ZIELIŃSKA et al., 2016), as quais podem estar envolvidas em outras vias metabólicas como a de produção de EPS ou desnitrificação heterotrófica a partir do nitrito ou do pouco nitrato que foi detectado neste estudo (WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014).

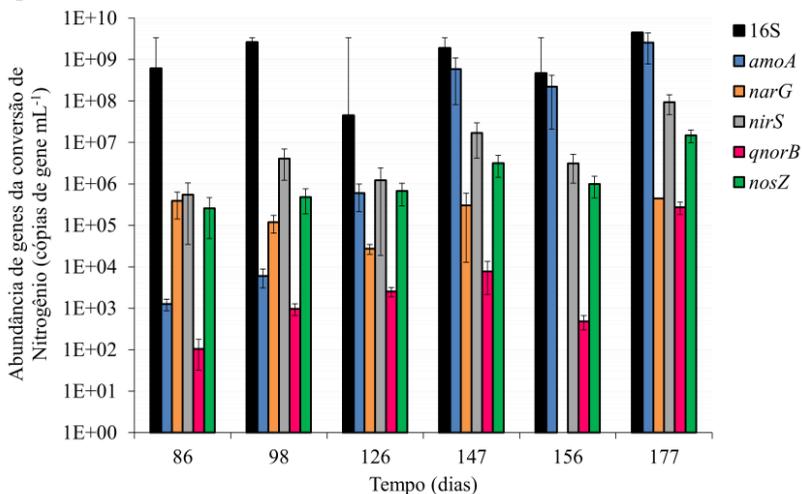
Os genes *nirS* e *norB*, responsáveis pela redução de NO_2^- e NO respectivamente, foram detectados em todas as amostras analisadas e ambos apresentaram um aumento de três ordens de grandeza em abundância. *NirS* foi utilizado para amplificar o gene mais amplamente distribuído responsável pela produção da enzima nitrito redutase, uma enzima chave no processo de desnitrificação dissimilatória (BRAKER; FESEFELDT; WITZEL, 1998). A abundância do grupo *nirS* foi maior do que os outros genes quantificados neste estudo, variando de 10^5 a 10^8 cópias de genes (Figura 24).

Para a análise de redução de óxido nítrico, foram utilizados números de cópias de genes *qnorB* que codificam redutases de óxido nítrico. Existem dois tipos de óxido nítrico redutases (*cNor* ou *qNor*), que são codificados por duas variantes do mesmo gene (*norB*) e distribuídos em grupos de bactérias que se diferenciam a nível de família ou ordem (BRAKER; TIEDJE, 2003). No presente estudo, o gene *qnorB* foi utilizado para captar a presença de grupos específicos de bactérias (β -, γ -, ϵ -*Proteobactérias*, alguns *Firmicutes*, *Cianobactéria* e *Ralstonia eutropha*). O número de cópias do gene *qnorB* variou significativamente ao longo do tempo com valores aumentando de 10^2 para 10^5 por mL de amostra (Figura 24). Embora a quantificação do gene *qnorB* não considere toda a população bacteriana que reduz o óxido nítrico no sistema AGS, fornece meios de detectar a presença de vias potenciais. Os genes que codificam NO_2^- e NO redutase (*nirS* e *norB*) foram encontrados no genoma de AOB (CASCIOTTI; WARD, 2005). Isso significa que o aumento da abundância de *nirS* e *qnorB* poderia estar associado não só à atividade de desnitrificantes, mas também à atividade de AOB, neste caso através da via de desnitrificação autotrófica até N_2O (KAMPSCHREUR et al., 2009). Contudo, no presente estudo, ainda é difícil distinguir se a emissão de N_2O é proveniente da desnitrificação autotrófica ou das vias de desnitrificação

heterotrófica. Estudo prévio sob condição de baixo nível de oxigênio mostrou que 58-83% da emissão de N_2O em ETE foi causada pela desnitrificação autotrófica, e 42-17% por desnitrificação heterotrófica (TALLEC et al., 2006). A presença desses genes no presente estudo poderia estar associada à produção de N_2O por ambas as rotas realizadas por AOB e desnitrificantes. No entanto, o presente estudo aborda algumas perspectivas sobre as potenciais rotas metabólicas até então ainda não elucidadas dentro da diversidade das desnitrificantes encontradas no presente LGA.

O gene *nosZ* codifica a óxido nitroso redutase, que reduz o óxido nitroso para nitrogênio gasoso, comumente através desnitrificantes, estabelecendo assim um processo de desnitrificação completa. No presente estudo, o gene *nosZ* foi analisado para dois grupos diferentes de bactérias: *Proteobacteria* e não-*Proteobacteria*, a última codificando os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (JUNG et al., 2013). *NosZ* codificando *Proteobacteria* resultou em nenhuma detecção (dados não mostrados). No entanto, *Paracoccus* spp. (do filo *Proteobacteria*) foi detectada no interior do grânulo por FISH, indicando o envolvimento deste grupo de bactérias em processos de desnitrificação incompleta e conseqüentemente resultando em emissões de N_2O . *NosZ* para as não-*Proteobacteria* apresentou um aumento significativo em duas ordens de grandeza ao longo do tempo, de 10^5 para 10^7 cópias por mL da amostra (Figura 24). Estes resultados estão de acordo com a detecção de N_2O no sistema, que é substrato para a atividade de *nosZ*, e indica que a desnitrificação completa de N_2 foi realizada por grupos bacterianos *Firmicutes* e/ou *Bacteroidetes*. *Bacteroidetes* spp. são consideradas bactérias dominantes no intestino dos seres humanos e na flora fecal humana (SGHIR et al., 2000), que em conjunto com as α -, β - e γ -*Proteobacteria* e as *Firmicutes* já foram detectadas em grânulos cultivados a partir de lodos ativados no tratamento de esgoto sanitário (CHEN et al., 2013). Portanto, o presente estudo vem sugerindo que *Bacteroidetes* e *Firmicutes* estão fortemente relacionados com a rota de desnitrificação completa em sistemas LGA alimentados com esgoto sanitário. Estudos metagenômicos e proteômicos adicionais são essenciais para entender a funcionalidade desses grupos microbianos e seriam úteis para encontrar fatores operacionais para melhorar o processo de desnitrificação completa, reduzindo assim as emissões de N_2O em sistemas de nitrificação parcial com LGA.

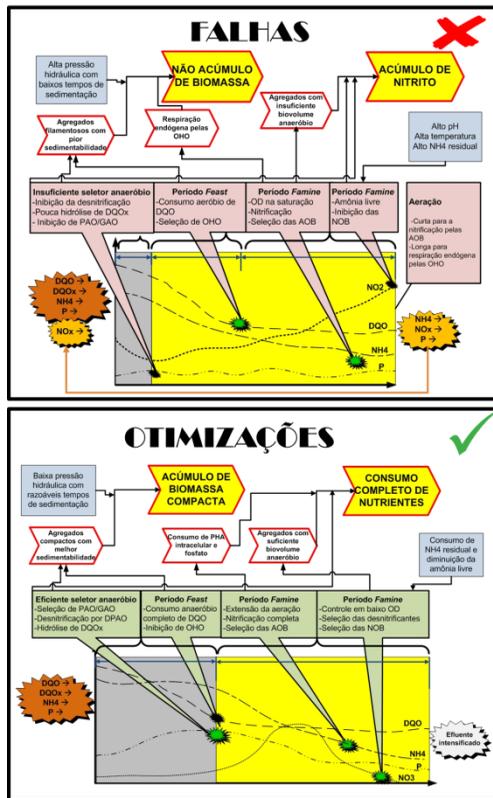
Figura 24: Distribuição de genes bacterianos que compõem o sistema LGA com esgoto sanitário. As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas.



4.1.4 Conclusões

Granulação ($d > 200 \mu\text{m}$) foi obtida em um RBS alimentado com esgoto sanitário de baixa carga ($\text{DQO} < 200 \text{ mg DQO}_{\text{solúvel}} \text{ L}^{-1}$). As condições aplicadas (ciclo 4 h, alimentação rápida e aeração longa) permitiram a remoção de DQO e de nitrogênio amoniacal através da nitrificação parcial com acúmulo considerável de nitrito ($16,5 \text{ mg NO}_2^- \text{ N L}^{-1}$) e moderada emissão de N_2O (2,8% da carga total de nitrogênio). Grânulos apresentaram a coabitação de protozoários e bactérias, indicando a importância desta relação na estrutura granular em sistemas LGA com esgoto sanitário. AOB predominou a camada externa do grânulo, enquanto NOB e desnitrificantes estavam nas camadas internas. Os genes catabólicos das conversões de nitrogênio revelaram seguintes rotas metabólicas: nitrificação parcial, desnitrificação via nitrito, desnitrificação autotrófica, desnitrificação completa e incompleta. *Firmicutes* e *Bacteroidetes* estão envolvidos na via de desnitrificação completa até N_2 . Portanto, uma compreensão mais profunda desses organismos e suas interações elucidariam seu papel na redução das emissões de N_2O . Para a remoção de nitrogênio em uma única unidade, os municípios e os projetistas de ETE podem considerar o sistema LGA como tecnologia promissora para economizar custos.

4.2 ESCLARECENDO FALHAS NO DESEMPENHO DO LODO GRANULAR NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO SOB CONDIÇÕES DE CLIMA SUBTROPICAL²



A tecnologia de lodo granular tem se expandido mundialmente para tratamento de efluentes sanitários. A composição do esgoto e as condições climáticas diferem de um local para outro, afetando a granulação e a remoção biológica de nutrientes (*Biological nutrient removal* - BNR). Além de pouca informação disponível sobre o uso desse processo no contexto real, a transferência da tecnologia requer investigações em ambientes regionais. No presente trabalho, os impactos do esgoto sanitário de baixa concentração e do clima quente costeiro foram estudados em um reator operado em bateladas sequenciais (RBS), com lodo granular, em escala piloto, em termos das propriedades

físicas do lodo e do desempenho da BNR. Foram testadas duas estratégias operacionais (EO) que se diferenciaram quanto ao regime de alimentação do

² A versão resumida deste trabalho foi aceita para apresentação oral do tipo *fusion keynote* (Guimarães & Weissbrodt) no “The 14th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies”, Florianópolis, Brasil, em maio 2017. O trabalho completo aqui descrito será submetido para uma revista internacional.

L. B. Guimarães*, J. Wagner, T. R. V. Akaboci, G. C. Daudt, P. H. Nielsen, M. C. M. van Loosdrecht, D. G. Weissbrodt*, R. H. R. da Costa. From failures to successful granular sludge process: Hints for real wastewater treatment under coastal warm climate. *Equal writing contribution

reator: enchimento em pulso seguido por uma fase de repouso (EO1) e enchimento lento em fluxo ascendente (EO2). O enchimento lento foi benéfico para a formação de grânulos maiores, em maior fração e com melhor sedimentabilidade (EO1: 290 μm , 55% de grânulos e IVL de 109 mL g^{-1} SST; EO2: 450 μm , 78% e IVL de 74 $\text{mL g}_{\text{SST}}^{-1}$). O enchimento lento também foi mais vantajoso na hidrólise da matéria orgânica particulada com 1,3 e 3,1 $\text{g DQO}_{\text{tot}} \text{g}^{-1}$ SSV d^{-1} em EO1 e EO2, respectivamente, bem como para o acúmulo de biomassa (0,7 g SSV L^{-1} em EO1 e 1,5 g SSV L^{-1} em EO2) e remoção de fósforo (33% em EO1 e >97,5% em EO2 a partir de 165 dias). Porém, notou-se em ambas EO que a biomassa não se acumulou substancialmente no sistema, houve nitrificação parcial com o acúmulo de nitrito, além de desnitrificação e biodesfosfatação (EBPR) ineficientes, resultando no insatisfatório processo de BNR. As principais falhas encontradas no sistema piloto relacionadas com estes resultados estão na configuração do ciclo do RBS e nos micro-organismos selecionados com a operação. Mesmo que organismos acumuladores de fósforo (PAO) tenham sido identificados em EO2 (2,3-3,4%), os organismos heterotróficos ordinários (OHO) foram predominantes em ambas EO (30% de *Thauera* em EO1; 56% de *Comamonas* em EO2). Em conclusão, junto com os princípios da ecologia microbiana, a resposta para uma engenharia bem sucedida do processo de LGA consiste (i) na gestão de um seletor anaeróbio eficiente para PAO e (ii) no controle da aeração para uma eficiente nitrificação/desnitrificação e limitação da respiração endógena, melhorando a BNR e o acúmulo da biomassa. Isto pode ser realizado por meio do aperfeiçoamento da configuração do ciclo do RBS. A operação eficiente do processo permitirá o alcance de padrões de lançamento mais elevados, mediante a promoção da completa BNR.

ELUCIDATING PERFORMANCE FAILURES IN GRANULAR SLUDGE FOR DOMESTIC WASTEWATER TREATMENT UNDER COASTAL WARM CLIMATE

The granular sludge technology expands worldwide for municipal wastewater treatment. Sewage composition and climate conditions differ from one place to another, impacting granulation and biological nutrient removal (BNR). Besides the few reports available on process implementation in the real context, technology transfer requires investigations under local settings. Impacts of low-strength domestic wastewater and coastal warm climate were studied at pilot scale on the physical properties of granular sludge and BNR under two different operational strategies involving fast (OS1) and slow (OS2) upflow feeding regimes. The slow filling was beneficial for larger granules, which were present in greater fraction and with better sedimentability (OS1: 290 μm , 55% of granules and SVI of 109 $\text{mL g}_{\text{TSS}}^{-1}$; OS2: 450 μm , 78% e SVI of 74 $\text{mL g}_{\text{TSS}}^{-1}$). It was also advantageous for the hydrolysis of particulate organic matter with 1,3 and 3,1 $\text{g COD}_{\text{tot}} \text{g}^{-1} \text{VSS d}^{-1}$ under OS1 and OS2, respectively, as well as for biomass accumulation (0,7 $\text{g}_{\text{VSS}} \text{L}^{-1}$ under OS1 e 1,5 $\text{g}_{\text{VSS}} \text{L}^{-1}$ under OS2) and phosphorus removal (33% under OS1, >97,5% under OS2 after 165 days). However, the biomass did not accumulate substantially under both OS, there was partial nitrification with nitrite accumulation, besides inefficient denitrification and biological desphosphation (EBPR). This resulted in an unsatisfactory BNR process. The main process failures detected in this pilot system related to the configuration of the sequencing batch reactor (SBR) cycle and to the microorganisms selected under operation. Although phosphorus accumulating organisms (PAO) were identified in OS2 (2.3-3.4%), ordinary heterotrophic organisms (OHO) were predominant under both OS1 (30% of *Thauera*) and OS2 (56% of *Comamonas*). In conclusion, a successful engineering of the AGS process should cope with principles of microbial ecology in order to (i) manage an efficient anaerobic selector for PAO selection and (ii) control aeration for an efficient nitrification / denitrification and for limiting endogenous respiration, thus improving BNR and biomass accumulation. These design hints should be targeted by improving the SBR cycle configuration. An efficient process operation will enable the achievement of higher water quality standards by promoting full BNR.

4.2.1 Introdução

As estações de tratamento em escala real que utilizam a tecnologia LGA para remoção biológica de nutrientes (BNR) estão se expandindo mundialmente para o tratamento de águas residuárias municipais e industriais (GIESEN; THOMPSON, 2013; PRONK et al., 2015). Desde o início do desenvolvimento na Europa (BATHE et al., 2005), até as últimas transferências para países em desenvolvimento como o Brasil (2016), diferenças significativas tanto nas águas residuárias quanto nas condições climáticas devem ser consideradas na concepção e operação do processo.

O processo de lodo granular aeróbio (LGA) bem sucedido em escala real para esgoto municipal foi recentemente relatado (PRONK et al., 2015). Porém, as características complexas dos esgotos sanitários continuam a ser um desafio para o desempenho do processo. Semelhante à impressionante quantidade de pesquisas sobre sistemas de lodos ativados, os sistemas de lodo granular também devem se beneficiar de investigações que se aproximem de condições reais. Os esgotos sanitários abrigam uma ampla gama de fontes de carbono dissolvido e particulado, cujos impactos na granulação e na remoção de nutrientes precisam ser desvendados. Os impactos da carga de carbono baixa e flutuante também são de interesse relevante, no entanto, foram pouco testados (WAGNER, 2015). Além disso, questões como o longo tempo de granulação, a imprevisível morfologia dos grânulos e sua desintegração, e a ineficiente BNR ainda são reportadas (SARMA; TAY; CHU, 2017).

No contexto do Brasil, em pesquisas com reator piloto, utilizando esgoto sanitário (JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; WAGNER et al., 2015a; WAGNER; COSTA, 2013), observou-se a formação de grânulos juntamente com a remoção de matéria orgânica (DQO e DBO) e de nitrogênio amoniacal, com concentrações efluentes que atenderam o critério de qualidade nacional brasileiro (CONAMA, 2011). Porém, notou-se a desintegração dos grânulos (GUIMARÃES et al., 2016) e as concentrações de lançamento permitidas ($120 \text{ mg DBO L}^{-1}$ ou 60% de remoção; e $< 20 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}$) ainda permanecem altas quando comparadas, por exemplo, com os limites de lançamento de efluentes da Europa (25 mg DBO L^{-1} ou 70-90% de remoção; 10 mg N L^{-1} ou 70-80% de remoção) (EEC COUNCIL, 1991). Além disso, esses estudos têm mostrado um acúmulo elevado de nitrito, de até $15 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$ no efluente, enquanto a remoção de fósforo ainda não foi alvo do tratamento, uma vez que não existe padrão de lançamento nacional.

Outros grupos de pesquisa também já reportaram o acúmulo de nitrito utilizando processos LGA (COMA et al., 2012; ISANTA et al., 2012; YANG et al., 2013).

O primeiro critério de projeto para as investigações de LGA em escala piloto conduzidas pelo grupo na UFSC em Florianópolis, Brasil, baseou-se na geometria do reator com uma alta relação altura/diâmetro (A/D) de aproximadamente 9, assumindo que grânulos seriam formados, enquanto a biomassa floculenta seria lavada do sistema (FIGUEROA et al., 2009). As condições operacionais foram definidas de modo a aplicar uma elevada força de cisalhamento e tempos de sedimentação reduzidos, fatores esses que foram propostos como cruciais para a formação de grânulos (FIGUEROA et al., 2009). O cisalhamento hidrodinâmico é promovido em tal sistema por velocidade superficial de gás de fluxo ascendente acima de $1,0 \text{ cm s}^{-1}$ (MCSWAIN STURM; IRVINE, 2008). Tempos curtos de sedimentação, como por exemplo, de 2 min, para uma altura de reator de 150 cm, sendo 50 cm a altura de sedimentação de biomassa (cama de lodo), têm sido utilizados como pressão de seleção hidráulica, para selecionar biomassa com velocidades de sedimentação mais elevadas (BEUN et al., 1999).

A composição e a carga do substrato são também fatores importantes para a formação de grânulos. Nos estudos da UFSC, a configuração do ciclo e a operação do reator RBS basearam-se, portanto, em estudos realizados com águas residuárias municipais de baixa carga (NI et al., 2009). O clima subtropical úmido do estado de Santa Catarina, que envolve variações de temperatura do esgoto de 14-30 °C, também é um relevante aspecto que traz diferença nos processos.

Os projetos piloto iniciais análogos têm sido frequentemente desenvolvidos considerando as características dos sistemas de bancada de LGA (SARMA; TAY; CHU, 2017). A operação do RBS com alimentação/reação/sedimentação é bastante fácil e oferece flexibilidade, gerando gradientes de substrato para estimular a granulação. Geralmente é aplicado um fluxo de aeração elevado em um reator de coluna, para induzir a formação de grânulos pela força de cisalhamento, porém isto pode afetar a remoção biológica de nutrientes (BNR). Corroborando com esse fato, os regimes de alimentação e aeração podem ser adaptados para ajustar a remoção de fósforo e a desnitrificação. As flutuações e as baixas cargas de DQO e fósforo nos esgotos sanitários (200-600 mg DQO L⁻¹, 2-4 mg P_{total} L⁻¹) (LI et al., 2014) quando comparadas com as condições de laboratório (400-800 mg DQO L⁻¹, 10-200 mg P_{total} L⁻¹) limitam, no entanto, o crescimento de organismos que acumulam polifosfato (PAO) e o desempenho de remoção de fósforo (SARMA;

TAY; CHU, 2017). Ácidos graxos voláteis (AGV) poderiam ser adicionados como fontes de carbono e elétrons para melhorar a remoção de fósforo e nitrogênio, respectivamente. Porém, como uma alternativa financeira e funcionalmente melhor, um regime estático e lento de alimentação sob condições anaeróbias pode promover a seleção de PAO, juntamente com a estabilidade de grânulos e a BNR (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005). Se o EBPR não for um alvo, a seleção para organismos de acumulação de glicogênio (GAO) sob alternância anaeróbio-aeróbia também pode contribuir para a estabilidade dos grânulos (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004).

O histórico dos estudos que mais se aproximam das condições das ETE no Brasil e de outros países com condições similares, tanto com o tipo e carga de esgoto quanto com o clima, demonstrou que ainda são necessárias melhoras para uma aplicação segura da tecnologia LGA. As concentrações do efluente tratado, ainda que dentro nos padrões nacionais, são relativamente altas quando comparadas àquelas obtidas em estudos internacionais. Igualmente, problemas como a desintegração dos grânulos, o acúmulo de nitrito e a ineficiência na remoção de fósforo, já reportados, tornam o sistema vulnerável para sua aplicação e o atendimento aos padrões de lançamento. As configurações de ciclo de RBS variam muito entre os estudos, grânulos têm sido produzidos tanto em regime de pulso (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2002; NI et al., 2009; WAGNER; COSTA, 2013) quanto em regime de fluxo lento ascendente (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005; LI et al., 2014; PRONK et al., 2015). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi explorar as características físicas dos grânulos e o desempenho de reator piloto nas remoções de carbono e nutrientes, alimentado com esgoto sanitário de baixa carga, bem como desvendar a comunidade microbiana presente no reator, para duas estratégias operacionais (EO), que se diferenciaram principalmente quanto ao regime de enchimento. Os autores buscaram com este artigo discutir as falhas observadas, propondo melhorias de operação para os sistemas com LGA.

4.2.2 Materiais e Métodos

Operação em diferentes estratégias

O reator utilizado neste estudo faz parte do sistema experimental I, descrito no item 3, cujas características operacionais estão apresentadas na Tabela 6. O RBS piloto foi operado para granulação e remoção de

Esclarecendo falhas no desempenho do lodo granular no tratamento de esgoto sanitário sob condições de clima subtropical

nutrientes de esgoto sanitário sob (i) uma alimentação de um único pulso seguida por uma fase repouso e (ii) um regime de alimentação de fluxo ascendente lento. As fases de repouso na EO1 e de alimentação lenta na EO2 foram planejadas para fornecerem condições anaeróbias e potencialmente selecionar os PAO, e atingir a remoção biológica de fósforo. O reator foi inoculado com lodo ativado (40 L) e operado em modo RBS com ciclos de 4 horas, em ambas as estratégias. Para EO1, o ciclo teve alimentação (3 min), repouso não misturado (10 min), aeração (211 min), sedimentação (13 min) e descarte do efluente (3 min); enquanto para EO2, o ciclo teve alimentação lenta (20 min), aeração (203 min), sedimentação (15 min) e descarte (2 min). O regime de alimentação difere em cada estratégia em termos de tempo de contato entre a cama de lodo e o afluente. A condição de *wash-out* com a diminuição gradual no tempo de sedimentação (tempo inicial em 30 min) foi aplicada levando à lavagem da biomassa floculenta e à seleção de biomassa de sedimentação rápida.

Tabela 6: Configuração experimental, descrição das estratégias operacionais estudadas e características do esgoto sanitário

Instalação operacional configurações dos ciclos	EO1	EO2
Características do esgoto sanitário		
Carga orgânica (g DQO _{Total} L _r ⁻¹ d ⁻¹)	1,1 ± 0,4	2,0 ± 0,5
Carga orgânica (g DQO _{Solúvel} L _r ⁻¹ d ⁻¹)	0,6 ± 0,3	1,0 ± 0,3
Carga nitrogenada (g N-NH ₄ L _r ⁻¹ d ⁻¹)	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Carga de fósforo (g P _{Total} L _r ⁻¹ d ⁻¹)	0,02 ± 0,005	0,03 ± 0,01
Carga específica ou relação A/M (gDQO _{solúvel} g _{SSV} ⁻¹ d ⁻¹)	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,3
pH	7,2 ± 0,2	6,9 ± 0,2
Temperatura (°C)	26 ± 3	26 ± 2
Razão C:N:P (g DQO _s :g N-NH ₄ :g PT)	100:27:2,8	100:27:2,5

Características do lodo granular e do desempenho da remoção dos nutrientes

O índice volumétrico de lodo foi monitorado pela medição do volume de biomassa sedimentado após 5, 10 e 30 min (IVL_5, IVL_{10} e IVL_{30}), respectivamente (SCHWARZENBECK; ERLEY; WILDERER, 2004). A distribuição de tamanho das partículas foi determinada por difração a laser (MasterSizer Series 2000, Malvern Instruments, UK). O conceito de porcentagem de volume de lodo com tamanho abaixo de 200 μm (*sludge volume percentage with size below 200 μm* ; SVP-SB200), proposto por Liu et al. (2010), foi utilizado para determinar o ponto de viragem em que o reator era predominantemente de lodo granular. Estes autores consideraram o reator como LGA dominante quando o SVP-SB200 é inferior a 50%. As observações da granulação e da forma dos grânulos, ao longo do período experimental, foram realizadas por microscopia óptica (Olympus BX40, Japão).

As séries temporais de concentrações de sólidos em suspensão (SSV, SST e cinzas), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_4\text{-N}$) e fósforo total (P_{Total}) foram analisadas de acordo com os métodos padrão de APHA-AWWA-WEF (2005). As concentrações de nitrogênio-nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$), nitrogênio-nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$) e fosfato ($\text{PO}_4\text{-P}$) foram analisadas por cromatografia iônica (DIONEX ICS 5000, DIONEX[®], EUA). Para acompanhar a desnitrificação durante o monitoramento de um ciclo operacional, foi realizada a soma das formas solúveis de nitrogênio. A temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido (OD) foram medidos utilizando sonda multiparâmetro (YSI 6600 V2).

A amônia que entra no reator está em solução na forma de íon amônio (NH_4^+) e amônia não ionizada (NH_3). Estes estão em um equilíbrio que é afetado pelo pH da solução. As concentrações de amônia não ionizada [Amônia livre, (AL)] foram calculadas de acordo com Anthonisen et al. (1976), com as equações 23 e 24 apresentadas no item 3. Assim como a amônia, o nitrito produzido no reator se encontra em equilíbrio com o ácido nitroso livre (ANL), o qual pode ser calculado usando as equações 25 e 26, também mostradas no item 3.

Os parâmetros cinéticos velocidade específica observada de crescimento da biomassa (μ_{obs}), coeficiente de produção observada de biomassa (Y_{obs}), velocidade específica de decaimento da biomassa (k_d), velocidade específica de remoção de DQO, amônia e fósforo (q_{DQO} , q_{NH_4} , $q_{\text{P}_{\text{tot}}}$) e velocidade volumétrica de remoção de DQO, amônia e

Esclarecendo falhas no desempenho do lodo granular no tratamento de esgoto sanitário sob condições de clima subtropical

(r_{DQO} , r_{NH_4} , $r_{P_{tot}}$) foram calculados baseados nas equações descritas por Liu e Tay (2007), demonstradas pelas equações 15 a 22 no item 3.

Os cálculos da velocidade de sedimentação e do tempo de contato entre o afluyente e a biomassa para a hidrólise da matéria orgânica particulada (GUJER et al., 1999) também foram descritos no item 3 pelas equações 28 a 32.

Para a conversão da unidade de SSV para DQO particulada (DQO_x), considerou-se a fórmula molecular da biomassa como C₁H_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}, resultando em um fator de conversão de 1,366 g DQO_x g⁻¹ SSV. As unidades utilizadas seguiram o padrão proposto por Corominas et al. (2010).

Identificação das populações e dinâmicas bacterianas por métodos moleculares

Amostras de licor misto foram coletadas durante as fases de aeração. O DNA foi extraído destas amostras biológicas utilizando o kit de isolamento de DNA PowerSoil® (MoBio Laboratories Inc., EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As composições das comunidades bacterianas e a dinâmica de populações foram analisadas por sequenciamento de amplicon de nova geração baseado no gene 16S rRNA, região v1-v3 utilizando o como guia o MiDAS field guide (MCILROY et al., 2015b). O par de iniciadores bacterianos universais 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') foi utilizado para a amplificação por PCR (ALBERTSEN et al., 2015). Os amplicons foram sequenciados utilizando o sequenciador MiSeq desktop (Illumina, EUA). Os conjuntos de dados de sequenciamento foram processados *in silico* de acordo com Karst et al. (2016). O mapeamento foi conduzido contra a base de dados MiDAS, com as sequências do gene 16S rRNA como referência para atribuir as leituras das unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic units* - OTUs) ao parentesco bacteriano mais próximos. Cada conjunto de dados da amostra foi rarefeito para 10.000 leituras como base de comparação e processado em R usando o pacote ampvis (ALBERTSEN et al., 2015).

As análises de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em microscópio de fluorescência baseada no gene 16S rRNA foram conduzidos de acordo com Nielsen; Seviour; Nielsen (2016), a fim de confirmar visualmente mudanças nas associações microbianas predominantes. O procedimento de preservação da amostra e as etapas da hibridização foram de acordo com Amann et al. (1990), e se

encontram descritos no item 3 e apêndice A. As sondas utilizadas neste trabalho foram EUB_{mix}, NSO190, NEU, AMX820, NIT3 Ntspa662 e PAO_{mix}, as quais estão detalhadas na Tabela 3, item 3.

4.2.3 Resultados e discussão

Características físicas dos grânulos

Para ambas as estratégias operacionais EO1 (alimentação por pulso) e EO2 (alimentação de fluxo lento), a granulação foi alcançada com sucesso em 56 dias no RBS piloto, alimentado com esgoto sanitário de baixa carga, situado em clima subtropical (Florianópolis, Brasil). Em termos de IVL, a EO2 foi mais vantajosa, proporcionando um lodo granular com melhores propriedades de sedimentação (Tabela 7). O tamanho das partículas do lodo foi acompanhado pela porcentagem de volume de lodo com tamanho inferior a 200 μm (SVP-SB200) (LIU et al., 2010), determinando a dominância de lodo granular no reator (isto é, quando SVP-SB200 <50%). Os grânulos cultivados durante a EO2 foram maiores, com melhor sedimentação e formaram uma fração maior do lodo quando comparados com os grânulos da EO1 (Tabela 7).

Tabela 7: Propriedades físicas do lodo granular no estado estacionário sob ambas as estratégias operacionais (EO).

Propriedades físicas dos grânulos	EO1	EO2
IVL ₃₀ (mL g _{SS} ⁻¹)	109 ± 27	74 ± 16
IVL ₁₀ (mL g _{SS} ⁻¹)	141 ± 46	85 ± 22
IVL ₅ (mL g _{SS} ⁻¹)	216 ± 110	109 ± 31
IVL ₃₀ /IVL ₁₀	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
IVL ₃₀ /IVL ₅	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1
SVP-SB200 (%)	45 ± 4	22 ± 11
Tamanho médio (μm)	289 ± 25	449 ± 90

Para as duas estratégias, entretanto, o sistema não acumulou biomassa substancialmente. As concentrações médias de biomassa foram de apenas 0,7 g_{SSV} L⁻¹ (EO1) e 1,5 g_{SSV} L⁻¹ (EO2) (Figura 25 A). Para alcançar a intensificação do processo, estudos mostram uma concentração de biomassa muito superior, de 8-10 g_{SSV} L⁻¹ (PRONK et al., 2015). A idade do lodo ou tempo de retenção do lodo (*sludge retention time* – SRT, θ) também foi curto, de 6,5 dias (EO1) e de 15,5 dias (EO2), enquanto que uma idade de lodo acima de 20 dias seria

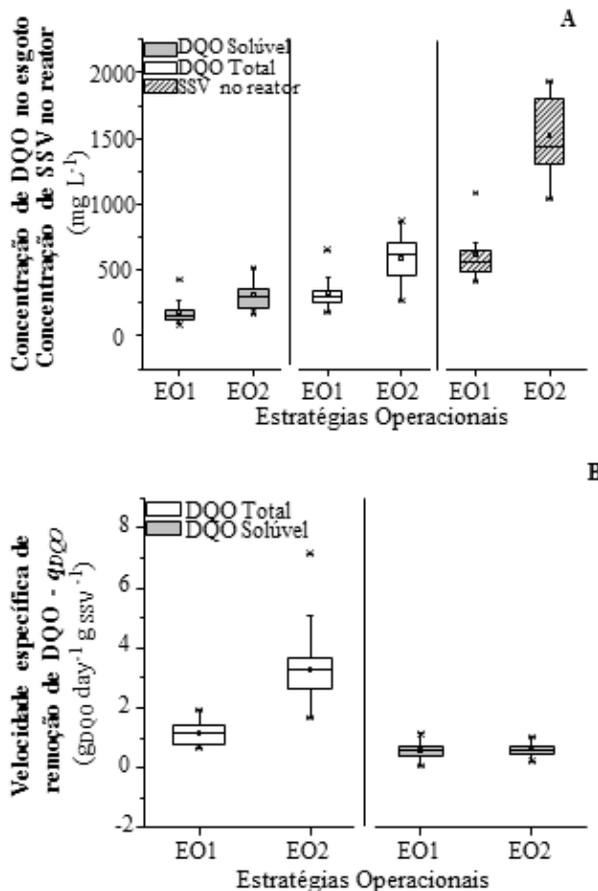
típica para um sistema de lodo granular bem executado (PRONK et al., 2015), chegando até 71 dias como reportado em sistemas com enchimento anaeróbico lento e com eficiente remoção de fósforo (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005; DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004).

Hidrólise da matéria orgânica particulada

A razão para um teor de biomassa ligeiramente mais alto, juntamente com melhores propriedades físicas do lodo granular, observadas em EO2, pode estar relacionada com a maior concentração de DQO total presente no esgoto durante o período de execução da EO2 ($335 \pm 124 \text{ mgDQO}_{\text{tot}} \text{ L}^{-1}$ na EO1; $596 \pm 165 \text{ mgDQO}_{\text{tot}} \text{ L}^{-1}$ na EO2) (Figura 25A). Ao mesmo tempo, a velocidade específica de remoção de DQO_{tot} ($q_{\text{DQO}_{\text{tot}}}$) também foi maior durante EO2, com média de $3,1 \pm 1,4 \text{ gDQO}_{\text{tot}} \text{ g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, enquanto que para EO1 a média foi de $1,3 \pm 0,7 \text{ gDQO}_{\text{tot}} \text{ g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Figura 25B). O fato de que a relação entre maior concentração e maior velocidade de remoção de DQO total não ser observada para a fração de DQO solúvel (Figura 25A-B) indicou um envolvimento primário da DQO particulada (DQO_x).

Durante o enchimento, o tempo de contato entre o esgoto afluyente e a biomassa foi extremamente curto na EO1 (24 s) e um pouco maior na EO2 (2 min), como consequência de baixas concentrações de biomassa e relativamente altas velocidades de fluxo ascendente do afluyente (18 e $3,5 \text{ L min}^{-1}$ em EO1 e EO2, respectivamente). O tempo de contato ligeiramente mais longo fornecido pelo regime de alimentação mais lento em EO2 foi propenso para aumentar a hidrólise da matéria orgânica particulada (WAGNER et al., 2015b; WEISSBRODT et al., 2014). Portanto, a DQO dissolvida e prontamente biodegradável (DQO_{pb}) foi provavelmente mais disponível para assimilação e crescimento de biomassa em EO2 do que em EO1. Em sistemas de escala laboratorial, alimentados com uma mistura de acetato dissolvido e amido particulado, Wagner et al., (2015b) também relatam maior concentração de biomassa e grânulos mais compactos, com melhores condições de sedimentação, quando o período de alimentação lenta (e supostamente anaeróbico) foi estendido a fim de aumentar a hidrólise.

Figura 25: Impacto da matéria orgânica afluyente e estratégias operacionais no acúmulo de biomassa no reator: **(A)** Flutuações do esgoto real resultaram em maior DQO total afluyente em EO2, enquanto a DQO solúvel não mostrou muita diferença. Em EO2, o RBS apresentou maior concentração de biomassa (SSV), porém, o acúmulo de sólidos no reator foi considerado baixo em ambas as estratégias. **(B)** Maiores velocidades de remoção de DQO foram observadas em EO2 como resultado do regime de enchimento lento, melhorando a hidrólise da matéria orgânica.



Considerando a variação da carga orgânica particulada do esgoto sanitário real e o clima quente local (com temperaturas variando de 14 a 30 °C ao longo das variações sazonais), com base nos cálculos cinéticos conduzidos de acordo com Gujer et al. (1999), tem-se 32 min (mínimo

Esclarecendo falhas no desempenho do lodo granular no tratamento de esgoto sanitário sob condições de clima subtropical

de 11min e máximo de 56 min) como o valor médio teórico de tempo de contato entre o afluente e a biomassa, durante o enchimento, necessário para hidrolisar completamente a matéria orgânica particulada. Portanto, 24 s e/ou 2 min obtidos nas EO1 e EO2, respectivamente, não foram suficientes para ocorrer a hidrólise. Outra explicação pode estar relacionada à adsorção de DQO_x na biomassa (DE KREUK et al., 2010). Uma vez que em EO2 foi observado um teor de biomassa mais elevado, o qual poderia proporcionar uma maior adsorção de material particulado no lodo e mais hidrólise poderia ocorrer, resultando em maiores velocidades de remoção de DQO total.

No geral, a gestão do ciclo operacional pode ser feita afim de aumentar a carga orgânica aplicada ao reator quando se tem os afluentes diluídos dos dias chuvosos. Tais adaptações do ciclo têm sido aplicadas na operação de processos de LGA em escala real (PRONK et al., 2015). Nesse caso, a duração da fase de enchimento anaeróbio foi prolongado em 50%, enquanto o tempo total do ciclo RBS foi minimizado através da redução da fase de aeração para tratar uma carga hidráulica 5 vezes maior durante os eventos chuvosos. Além disso, para um bom processo de granulação se faz necessária a otimização da configuração do ciclo RBS para melhorar o fornecimento de DQO_{pb} a partir da hidrólise da matéria orgânica bruta. O aumento do tempo de contato entre o esgoto e a biomassa em condições anaeróbias deve ser considerada para permitir a fermentação da DQO_{pb} em AGV, os quais podem ser preferencialmente absorvidos pelos PAO e / ou GAO, como pré-requisito para uma boa granulação (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004). De acordo com De Kreuk et al., (2010); e De Kreuk; Van Loosdrecht (2004), o processo de granulação tem como fator chave uma etapa anaeróbia antes da aeração, de forma a permitir a hidrólise da DQO_{total} em DQO_{pb} , a fermentação da DQO_{pb} em AGV e a absorção de AGV por PAO e GAO. A engenharia do processo deve então se beneficiar da flexibilidade da tecnologia RBS (MORGENROTH et al., 1997; WEISSBRODT et al., 2013b): isto pode ser via (i) um regime de enchimento de fluxo ascendente através de uma substancial cama de lodo ou (ii) uma enchimento de pulso seguido por uma fase extensa anaeróbia com mistura ou (iii) uma combinação de ambos (WEISSBRODT et al., 2014).

Cinética do desenvolvimento da biomassa

A cinética observada do desenvolvimento de biomassa granular foi influenciada pelas condições operacionais aplicadas. A produção da

biomassa observada (Y_{obs}) foi duas vezes mais elevada em EO1 ($0,31 \pm 0,16$ g SSV g⁻¹ DQO_{Solúvel}) do que em EO2 ($0,14 \pm 0,07$ g SSV g DQO_{Solúvel}⁻¹), sugerindo a presença de organismos de crescimento mais rápido durante EO1. Os valores de Y_{obs} em EO1 ficaram abaixo aos valores típicos relatados para o processo de lodo ativado convencional (0,4 a 0,8 g SSV g DQO⁻¹) e RBS sem lodo granular (0,4 a 0,5 g SSV g DQO⁻¹) (METCALF; EDDY, 2003). Por sua vez, os valores mais baixos obtidos em EO2 aproximaram-se das alternativas de minimização de lodo em processos de lodo ativado, como o processo OSA (*oxic-settling-anaerobic*) (0,10 g SSV g DQO⁻¹) ou o tratamento de cloração (0,15 g SSV g DQO⁻¹) (VELHO et al., 2016), e processos de lodo granular anaeróbico (0,16 g SSV g DQO⁻¹) (ANGENENT; SUNG, 2001). Estes resultados cinéticos demonstraram a baixa produção de lodo e, portanto, uma baixa concentração de biomassa foi verificada em todo o período de estudo, mas, especialmente na EO1.

A velocidade observada de crescimento (μ_{obs}) encontrada em EO1 foi o dobro (0,18 dia⁻¹) daquela observada em EO2 (0,08 dia⁻¹). Porém, a velocidade específica de decaimento da biomassa (k_d) indicou uma perda de biomassa quatro vezes maior em EO1 (0,154 dia⁻¹) quando comparado com EO2 (0,038 dia⁻¹). Os mecanismos de perda de biomassa estão associados ao metabolismo endógeno, morte celular e processos de predação (LIU; TAY, 2007). Os valores de k_d em EO1 estão acima daqueles geralmente encontrados em sistemas de lodos ativados (0,06-0,1 d⁻¹) (METCALF; EDDY, 2003), corroborando com o pouco acúmulo de biomassa neste sistema.

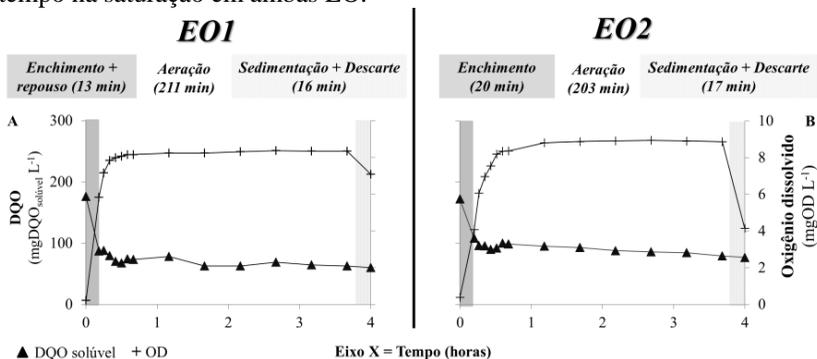
Neste estudo, o decaimento da biomassa pode estar associado ao fenômeno da respiração endógena (GUJER et al., 1999), como consequência dos longos períodos de fome (*famine*) em regime de aeração com concentração de OD próxima ao nível de saturação (8-10 mg O₂ L⁻¹). Além disso, neste estudo, como o tempo de contato anaeróbico entre o esgoto e a biomassa não foi projetado para permitir a absorção anaeróbia completa da matéria orgânica, a maior parte da DQO foi consumida em ambas EO durante os primeiros 30 a 40 min de areação (período *feast*) (Figura 26 A e B).

Assumindo a oxidação completa da matéria orgânica, os processos foram subsequentemente submetidos a mais de 170 minutos de aeração sem a presença de uma fonte de carbono (período *famine* ou *starvation*). No presente caso, o tempo *famine* foi excessivamente longo, isto é, mais de 80% da duração da fase de aeração (Figura 26 A e B). Tal período de fome prolongado pode ter definitivamente afetado o crescimento dos organismos heterotróficos ordinários (OHO), os quais principalmente

Esclarecendo falhas no desempenho do lodo granular no tratamento de esgoto sanitário sob condições de clima subtropical

povoaram o lodo em ambas EO, como será discutido posteriormente. O longo período aerado causou ainda um consumo de energia extra pelo excesso de aeração para a baixa capacidade do reator. Embora esta fase de aeração longa fosse necessária para sustentar a atividade de bactérias autotróficas oxidadoras de amônia (AOB), o nível de OD e a duração da fase de aeração são parâmetros cruciais a serem ajustados para o controle do acúmulo de biomassa no sistema.

Figura 26: Perfil de um ciclo operacional em EO1 (A) e em EO2 (B). Para ambas as EO nota-se o consumo de DQO nas fases supostamente anaeróbias de repouso (EO1) e enchimento (EO2), mas que foram na verdade anóxicas, e no início da aeração. OD esteve na maior parte do tempo na saturação em ambas EO.



Pressão de seleção hidráulica na granulação

A principal pressão de seleção hidráulica responsável pela granulação está relacionada com o tempo de sedimentação e a troca volumétrica. Tempos de sedimentação curtos têm sido propostos como cruciais para a granulação através da seleção do lodo denso com altas velocidades de sedimentação (LIU; WANG; TAY, 2005). Os reatores de bancada que utilizam esgoto sintético têm aplicado drástica pressão de seleção hidráulica, com tempos de sedimentação normalmente inferior a 5 min, para uma altura útil de reator com cerca de 1 m. Portanto, altas velocidades de sedimentação (maiores que 30 m h^{-1}) são descritas para grânulos cultivados nesses casos (MORGENROTH et al., 1997). Durante o *start-up* do presente estudo, foi aplicada a diminuição gradual no tempo de sedimentação para alcançar a granulação. Com base em tal proposição de projeto experimentada em escala laboratorial com sedimentação curta, foram aplicados tempos de sedimentação de 30 a 13

min na EO1 e de 15 min na EO2 para uma altura útil de reator de 2,18 m e 2,42 m, respectivamente. As velocidades de sedimentação do lodo aumentaram do inóculo para os grânulos, de 1,8 a 3,3 m h⁻¹ (em ambas EO), mostrando uma melhoria na sedimentação do lodo, mesmo que ainda seja considerada uma sedimentação lenta para LGA. De Kreuk e De Bruin (2004), trabalhando com esgotos municipais em escala de bancada, observaram a completa remoção de biomassa do sistema quando o tempo de sedimentação foi de 5 min, enquanto aplicando 6-15 min alcançaram velocidades de sedimentação semelhantes (2-5 m h⁻¹) às do presente estudo.

No estudo relatado por Pronk et al. (2015), em sistema de lodo granular aeróbio em escala real, que trata também esgoto municipal, foi aplicado um tempo de sedimentação de 30 min e operação em modo de enchimento e descarte simultâneos (*simultaneous fill/draw*). Esse modo de operação proporciona maior tempo para a biomassa sedimentar, uma vez que o descarte do efluente (posterior à sedimentação) leva 60 ou 90 minutos, para condições de tempo seco ou chuvoso, respectivamente.

Estudos recentes demonstraram que as condições de operação dos reatores de LGA para BNR devem ser adaptadas de acordo com o tipo de substrato (DERLON et al., 2016; WAGNER et al., 2015c). A aplicação de uma intensa pressão de seleção pela biomassa de rápida sedimentação, de modo a conseguir a granulação completa, mostrou-se inadequada ao tratar águas residuárias contendo matéria orgânica particulada (Xs) lentamente biodegradável (WAGNER et al., 2015c). A presença de Xs nas águas residuárias resulta no desenvolvimento de agregados com crescimentos filamentosos nas suas superfícies. Sob forte pressão de seleção pela biomassa de rápida sedimentação, o crescimento de grânulos aeróbios é limitado devido à lavagem contínua de biomassa de sedimentação ruim. Portanto, o acúmulo de biomassa no sistema e o desempenho da remoção do substrato são afetados (WAGNER et al., 2015c). Desta forma, para otimizar o acúmulo de biomassa, se faz necessária a diminuição da pressão de seleção hidráulica, aumentando o tempo de sedimentação no presente reator piloto. Além desta otimização na configuração do ciclo, os processos de respiração endógena podem ser remediados pelo controle da aeração.

Remoção de nitrogênio

As eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal aumentaram concomitantemente com a formação de grânulos para ambas EO (Apêndice B). Em média, o RBS apresentou 73 ± 8% de conversão de

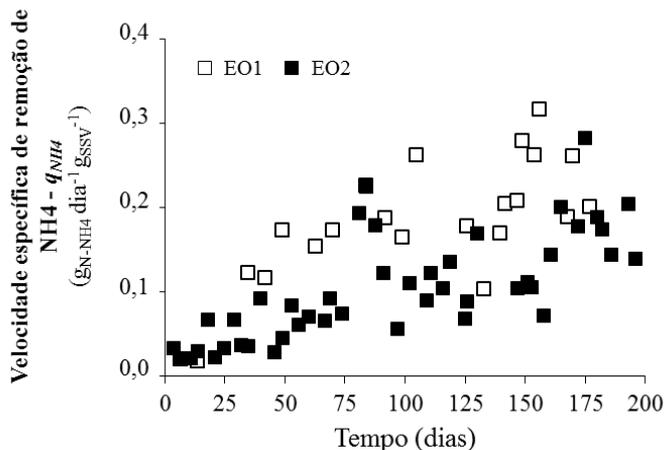
Esclarecendo falhas no desempenho do lodo granular no tratamento de esgoto sanitário sob condições de clima subtropical

nitrogênio amoniacal com concentração do efluente em 13 ± 4 mg N-NH₄ L_{Efluente}⁻¹ (EO1), enquanto na EO2 a eficiência chegou em $78 \pm 15\%$ com efluente em 17 ± 12 mg N-NH₄ L_{Efluente}⁻¹. Durante EO1, observou-se uma eficiência de remoção máxima de 83% (com 6,6 mg N-NH₄ L_{Eff}⁻¹) no dia 133; na EO2, a eficiência de remoção atingiu $95 \pm 5\%$ e 5 ± 5 mg N-NH₄ L_{Efluente}⁻¹ no final do período experimental, entre os dias 175 a 200. Em sistema LGA bem consolidado em escala real, as melhores eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal foram alcançadas (97%) resultando em baixa concentração efluente (1,1 mg N-NH₄ L_{Eff}⁻¹), aplicando-se 5 h de aeração (PRONK et al., 2015).

A velocidade de conversão de nitrogênio amoniacal (r_{NH4}) foi quase duas vezes menor para EO1 (média de $0,12$ g N-NH₄ dia⁻¹ L_R⁻¹) do que em EO2 (média de $0,21$ g N-NH₄ dia⁻¹ L_R⁻¹), fato possivelmente relacionado às diferenças nas concentrações de biomassa (dados plotados e mostrados no Apêndice B). Estas r_{NH4} foram duas vezes mais lentas do que aquela obtida com esgoto sintético em um reator em escala de laboratório ($0,4$ g N-NH₄ dia⁻¹ L_R⁻¹) por De Kreuk; Heijnen; van Loosdrecht (2005), porém na mesma faixa daquela medida em LGA em escala real para tratamento de esgotos municipais ($0,17$ g N-NH₄ dia⁻¹ L_R⁻¹) (PRONK et al., 2015). Isto sugere que uma extensão no tempo da fase de aeração pode ser considerada em ambas EO para melhorar a remoção de nitrogênio amoniacal, enquanto que o controle do nível de DO especificamente ($1,8$ - $2,5$ mg L⁻¹) também é necessário para limitar a respiração endógena e favorecer a remoção de nitrogênio.

A velocidade específica de remoção de nitrogênio amoniacal (q_{NH4}) (Figura 27) aumentou em ambas EO, indicando que as condições aplicadas apoiaram o estabelecimento progressivo de AOB e sua atividade ao longo do tempo. No entanto, esse comportamento de aumento contínuo na q_{NH4} sem o estabelecimento de um platô, indicaram que a operação estável ainda não havia sido atingida nos 200 dias de ambos os períodos experimentais. Na EO1, a q_{NH4} foi ligeiramente superior (de $0,02$ a $0,32$ g N-NH₄ dia⁻¹ g⁻¹ SSV) do que na EO2 (de $0,02$ a $0,28$ g N-NH₄ dia⁻¹ g⁻¹ SSV). Utilizando esgoto sintético de baixa carga, Cydzik-Kwiatkowska e Wojnowska-Baryła (2011) relataram um q_{NH4} de $0,59$ g N-NH₄ dia⁻¹ g⁻¹ SSV em um estudo de LGA, enquanto que apenas $0,024$ g N-NH₄ dia⁻¹ g⁻¹ SSV foi obtido em um reator piloto de LGA alimentado com esgoto real no estudo de Liu et al. (2010).

Figura 27: As velocidades específicas de remoção de nitrogênio amoniacal (q_{NH_4}) observadas em EO1 e EO2 ao longo de 200 dias no RBS piloto para granulação e BNR de esgoto sanitário de baixa carga em condições climáticas subtropicais.



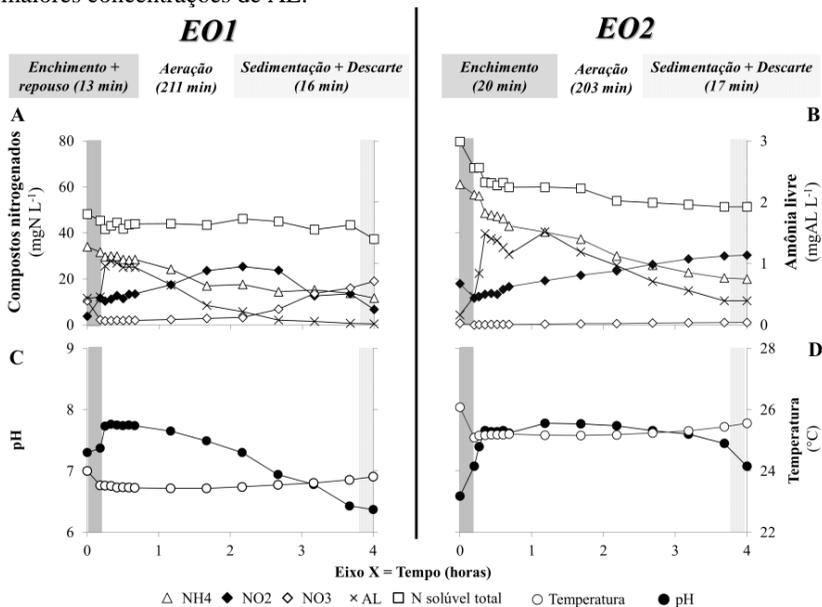
Embora o nitrogênio amoniacal tenha sido progressivamente bem oxidado, o processo de nitrificação foi incompleto e resultou em uma acumulação substancialmente desfavorável de nitrito em ambas EO (Figura 28 A e B). Na EO1, flutuações de nitrito e nitrato foram observadas no efluente (17 ± 8 mg N-NO₂ L⁻¹, 8 ± 7 mg N-NO₃ L⁻¹). Na EO2, o RBS obteve principalmente nitrificação parcial com alto acúmulo de nitrito (20 ± 7 mg N-NO₂ L⁻¹, $0,7 \pm 0,3$ mg N-NO₃ L⁻¹). O acúmulo de nitrito foi relatado em sistemas de lodo granular em várias ocasiões em escala de laboratório (WANG et al., 2007; WEISSBRODT et al., 2013a), e notadamente nas investigações piloto anteriores conduzidas na UFSC (JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; WAGNER et al., 2015a; WAGNER; COSTA, 2013). Os estudos com sistemas LGA relataram que as AOB predominaram as NOB (GUIMARÃES et al., 2017; WINKLER et al., 2012a), especialmente nas condições de *start-up*, onde a presença das colônias de AOB na camada externa é mais favorável para utilizar o oxigênio resultando na repressão das NOB e no acúmulo de nitrito (POOT et al., 2016). Claramente, fatores físico-químicos estão relacionados com tal falha repetitiva no presente sistema piloto, executado em um contexto de clima quente e costeiro, tendo como exemplo, a temperatura elevada e a

concentração de amônia livre, de acordo com o relatado por Peng e Zhu (2006).

Em termos de temperatura, as AOB efetivamente superam as NOB em condições mesofílicas acima de 25 °C (HELLINGA et al., 1998; HUNIK, 1993). O acúmulo de nitrito é comumente observado ao longo dos períodos de verão em plantas de lodos ativados (PHILIPS; LAANBROEK; VERSTRAETE, 2002). Esta discrepância nas velocidades de crescimento de AOB e NOB em altas temperaturas tem sido utilizada para projetar o sistema de reator único para remoção de nitrogênio amoniacal por meio de nitrito (*System for High Ammonium Removal Over Nitrite* - SHARON®) operado a 35 °C (MULDER et al., 2001). As condições de tempo quente de 18-30 °C contribuíram no presente estudo para o acúmulo de nitrito, pela seleção preferencial de AOB contra NOB.

Concentrações de amônia livre (AL) entre 0,1 a 1,0 mg AL L⁻¹ inibem a atividade de NOB, enquanto que as AOB são inibidas em concentrações muito mais elevadas de 10 a 150 mg AL L⁻¹. A formação de AL depende do pH, temperatura e concentração de NH₄⁺ (ANTHONISEN et al., 1976). As evoluções de AL ao longo de um ciclo típico do RBS, monitoradas em ambas EO são visualizadas na Figura 28 A e B. Em EO1 (dia 170, Figura 28A), a oxidação preferencial de nitrogênio amoniacal em nitrito ocorreu a partir do início da fase de aeração e durou 1,6 h. Em seguida, a concentração de AL diminuiu de 1,8 para 0,21 mg AL L⁻¹ em 1,6 h. Nas 2,1 horas de aeração subsequentes, observou-se valores abaixo de 0,1 mg AL L⁻¹ concomitantemente com um aumento de r_{NO3} de 0,67 a 8,78 mg de N-NO3 L⁻¹ h⁻¹. Em EO2 (dia 130, Figura 28 B), observou-se uma estável nitrificação parcial a nitrito. Foram detectadas concentrações de inibição de NOB de 0,4-1,5 mg AL L⁻¹ ao longo de todo o ciclo do RBS. A combinação de uma maior concentração de amônio afluente no esgoto durante EO2 (29-114 mg N-NH4 L⁻¹) do que durante EO1 (29-69 mg N-NH4 L⁻¹) com um pH ligeiramente básico (7-7,3) (Figura 28 D) resultou em concentrações de AL mais elevadas e, portanto, inibição estendida da atividade de NOB. Desta forma, a AL foi correlacionada com o acúmulo de nitrito nas condições atuais. Em geral, a otimização da fase de aeração beneficiaria todo o processo de nitrificação, já que a duração de fase de aeração mais longa pode ser importante para consumir mais o nitrogênio amoniacal e concomitantemente diminuir a formação de AL, evitando assim o acúmulo de nitrito. No entanto, em tal caso, o controle do OD em níveis mais baixos deve ser implementado, de forma a evitar a oxigenação demasiada do sistema e a excessiva respiração endógena.

Figura 28: Perfil do ciclo operacional em EO1 (A, C) e em EO2 (B, D). Para ambas as EO nota-se o acúmulo de nitrito, sendo preferencial na EO2, com maiores concentrações de AL.



A fração e o tamanho dos grânulos impactam na transferência de massa resultando em gradientes de substrato e oxigênio dissolvido através da profundidade do biofilme granular (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005; MOSQUERA-CORRAL et al., 2005). As associações microbianas se estabelecem ao longo destes gradientes de substratos e de condições redox (WINKLER et al., 2012b). Em lodos granulares, a nitrificação e a desnitrificação podem ocorrer simultaneamente (NDS) durante a aeração, dependendo da fração e do tamanho dos grânulos, da atividade microbiana e, portanto, da profundidade de penetração de OD e dos receptores de elétrons nitrogenados (NO_x). A difusão de oxigênio mostrou ser cerca de 300 µm no grânulo quando a concentração de OD na superfície dos grânulos foi de 7 mg L⁻¹ (MATSUMOTO et al., 2010). Esta profundidade de penetração de OD referenciada representa praticamente todo o diâmetro de grânulo apresentado neste estudo em ambas EO. A menor fração de lodo granular e o menor tamanho dos grânulos medidos especialmente na EO1 resultaram em biovolumes quase exclusivamente aerados dentro

dos bioagregados. Assim, o OD fornecido em nível de saturação durante a aeração (Figura 26 A e B) promoveu a nitrificação, mas definitivamente impediu a desnitrificação simultânea. A redução de NO_x ocorreu principalmente durante a fase de repouso em EO1 (de 48 a 41 mg N_{solúvel} L⁻¹) e na fase de enchimento em EO2 (de 79 a 68 mg N_{solúvel} L⁻¹). A desnitrificação prosseguiu assim durante a fase de aeração, na qual o nitrogênio solúvel apresentou uma ligeira diminuição em EO1 (de 41 a 37 mg N_{solúvel} L⁻¹) e EO2 (de 68 a 51 mg N_{solúvel} L⁻¹) (Figura 28 C e D), indicando a ocorrência de NDS. Estas duas fases foram concebidas como anaeróbias, mas foram anóxicas como resultado do fato do acúmulo de NO_x. Durante EO1, tanto o nitrato como o nitrito poderiam ser usados como receptores terminais de elétrons, enquanto que somente nitrito na EO2 (Figura 28 C-D).

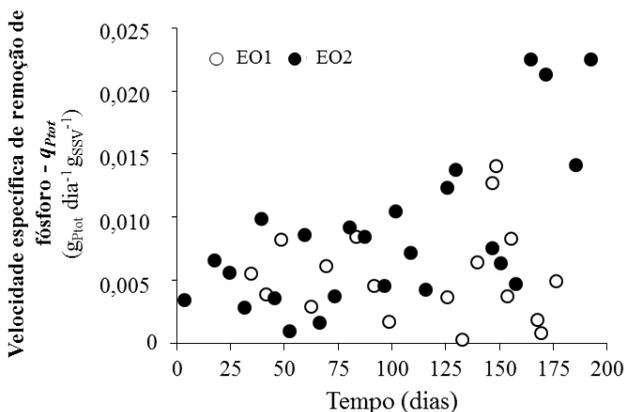
Em geral, o controle da fração e do tamanho dos grânulos pode consistir em um importante objetivo operacional, mas é bastante desafiador, especialmente em processo de grande escala em direção a aplicações reais. No entanto, as estratégias de controle de OD (LOCHMATTER; GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2013) podem ser implementadas durante a aeração em função das distribuições de tamanho dos bioagregados, a fim de fornecer zonas redox nos grânulos e promover NDS. A aplicação de estratégias alternadas de nitrificação-desnitrificação (NDA) (LOCHMATTER; GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2013) também deve ser considerada para aumentar a remoção de nitrogênio. Além disso, o acúmulo de NO_x nos ciclos do RBS também pode ser evitado pela implementação de uma fase adicional pós-anóxica como medida de segurança.

Remoção de fósforo

Baixas velocidades específica de remoção de fósforo total ($q_{P_{tot}}$) (Figura 29) foram observadas por mais de 100 dias para ambas EO. Contudo, observou-se uma tendência crescente com velocidades duas vezes maiores (0,022 g P_{Tot} g⁻¹ SSV dia⁻¹) até ao final da EO2, indicando o estabelecimento progressivo de PAO no lodo. Esse período de maior $q_{P_{tot}}$ na EO2 correspondeu com alta eficiência EBPR (> 97,5% e <0,2 mg P_{tot} L_{Eff}⁻¹ dos dias 165-193). Durante EO1 não foi observado aumento na $q_{P_{tot}}$ e a eficiência máxima de EBPR foi de apenas 33%, com 3,9 mg P_{tot} L_{Eff}⁻¹ no efluente tratado.

Figura 29: As velocidades específicas de remoção de fósforo ($q_{P_{tot}}$) observadas em EO1 e EO2 ao longo de 200 dias no RBS piloto para

granulação e BNR de esgoto sanitário de baixa carga em condições climáticas subtropicais.



A velocidade específica de consumo de polifosfato por PAO, utilizada na modelagem de EBPR é de 1,5 e 3,6 g P g⁻¹ DQO_{PAO} dia⁻¹ a 20 °C e 28 °C, respectivamente (HENZE et al., 1999; LIAU et al., 2015). O $q_{P_{tot}}$ máximo conseguido no presente trabalho foi de 0,016 g P g⁻¹ DQO_x dia⁻¹, considerando o teor total de biomassa e um fator de conversão de 1,366 g DQO_x g⁻¹SSV (como C₁H_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}) (HEIJNEN; KLEEREBEZEM, 2009). As análises de sequenciamento revelaram que o período de bom EBPR na EO2 correlacionou com o estabelecimento de uma população de "*Candidatus Accumulibacter*" em uma abundância relativa de 2,3%, enquanto este gênero de PAO não foi detectado em EO1. Esta abundância relativa de PAO relacionada com a quantidade de SSV resulta em 0,042 g SSV_{PAO} L⁻¹ e uma massa de 5 g SSV_{PAO} no reator, correspondendo a uma velocidade de 0,5 g P g⁻¹ DQO_{PAO} dia⁻¹. Esta atividade ainda é considerada baixa para um EBPR estável. A seleção de quantidade três vezes maior de PAO no sistema seria necessária para este fim. Isto se beneficiaria a partir de uma concepção melhorada do seletor anaeróbio. Semelhante aos processos de remoção biológica de nutrientes em lodo ativado (BARNARD; ABRAHAM, 2006), condições totalmente anaeróbias devem ser garantidas evitando o escape de qualquer receptor final de elétrons para fase anaeróbia. Portanto, o acúmulo de nitrito e nitrato deve ser evitado nos ciclos anteriores. Isto também não foi o caso aqui no presente estudo, uma vez que o nitrito e/ou nitrato acumulou ao longo das fases de aeração tanto

Esclarecendo falhas no desempenho do lodo granular no tratamento de esgoto sanitário sob condições de clima subtropical

na EO1 (17 ± 8 mg NO₂-N L⁻¹, 8 ± 7 mg NO₃-N L⁻¹) quanto na EO2 (20 ± 7 mg NO₂-N L⁻¹, $0,7 \pm 0,3$ mg NO₃-N L⁻¹).

A configuração do ciclo com um regime de alimentação prolongado em EO2 proporcionou condições mais adequadas para a seleção de PAO do que em EO1. Apesar dos grânulos estarem presentes durante EO1, as camadas internas não puderam proporcionar a condição adequada para estes organismos. Ao contrário do possível pensamento tradicional, a obtenção de EBPR e da completa BNR em lodo granular não ocorre simultaneamente por si: é necessária a alternância controlada de condições redox e substrato, como é feito em sistemas de lodo ativado (WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). O estabelecimento de PAO em lodos granulares deve, portanto, ser através da alternância bem controlada dos períodos *feast* anaeróbio e *famine* aeróbio impostos pelo operador durante o ciclo do RBS (BARNARD; ABRAHAM, 2006; WEISSBRODT et al., 2013b).

A carga de fósforo e a relação C/P também podem afetar o desempenho EBPR. Durante EO2 foram medidas maiores cargas de fósforo (27 mg P_{Tot} L⁻¹ dia⁻¹) e uma razão C/P de 84 g DQO_{Tot} g⁻¹ P_{Tot} no afluente, do que as medidas durante EO1 (18 mg P_{Tot} L⁻¹ dia⁻¹, 71 g DQO_{Tot} g⁻¹ P_{Tot}). O impacto da relação C/P foi testado em escala de laboratório em um sistema RBS operado com fonte de carbono mista (etanol, lixiviado, extrato de carne) em uma faixa de concentração baixa (~ 500 mg DQO L⁻¹) no afluente sintético (PUIG et al., 2007). Os resultados desse estudo apontaram que uma relação C/P abaixo de 36 g DQO g⁻¹ P-PO₄ afetou o desempenho do EBPR levando ao acúmulo de fosfato na fase líquida. A aplicação subsequente de uma razão C/P de 67 g DQO g⁻¹ P-PO₄ resultou no rápido restabelecimento de PAO, com o excesso de DQO estimulando o crescimento de biomassa. Isto também se relaciona com outros estudos realizados com lodos ativados e lodos granulares com uma constante razão C/P (SCHULER; JENKINS, 2003b; WEISSBRODT et al., 2014). A relação C/P abaixo de 20 g DQO g⁻¹ P-PO₄ é usada principalmente em conjunto com a alternância anaeróbio-aeróbia para o enriquecimento de PAO na escala de bancada, sendo o excesso de fósforo descartado no efluente. Uma alta limitação de fósforo correspondente a uma razão C/P de 200 g DQO g⁻¹ P-PO₄ seleciona os GAO. A relação C/P em torno de 50 - 100 g DQO g⁻¹ P-PO₄ é capaz de sustentar o crescimento de PAO, também dependendo de outras condições ambientais (isto é, temperatura e pH). A razão C/P aqui experimentada constitui, portanto, uma boa base para a seleção de PAO.

O esgoto sanitário apresentou baixas concentrações de fósforo ($0,8$ - $11,1$ mg P_{Tot} L⁻¹) e uma quantidade limitada de AGV (0 - 13 mg_{acetato} L⁻¹).

O ciclo do RBS deve, por conseguinte, ser configurado com um tempo de contato anaeróbio substancial (implementado por enchimento ou por batelada) para permitir a hidrólise da matéria particulada, seguida pela produção e absorção de AGV por PAO. Durante o *start-up*, um incremento de fósforo ou de AGV pode ser considerada para equilibrar a relação $C_{AGV}:P$ dependendo da realidade do esgoto local (WEISSBRODT et al., 2012). O suprimento de AGV poderia advir da fermentação do excesso de lodo (MOSER-ENGELER et al., 1998).

Pronk et al. (2015) obtiveram EBPR com sucesso no sistema de lodo granular em escala real, cujo afluente apresentava concentrações de C, N e P semelhantes ao do presente estudo. Esse reator foi operado com enchimento anaeróbio em fluxo ascendente através de uma substancial cama de lodo granular ($> 8 \text{ g SSV L}^{-1}$). Tal modo lento de enchimento permite concentrações elevadas de substrato na superfície dos grânulos. Em condições anaeróbias ocorre a seleção de PAO de crescimento lento, pois o substrato pode difundir completamente através dos bioagregados. Isto contribui para a formação de biomassa granular estável e densa (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005). Além disso, a remoção de P pode ser melhorada quimicamente por acréscimo de, por exemplo, alumínio e sais de cloreto de ferro (em dosagem precisa para evitar efeitos colaterais) diretamente no reator em períodos de baixas cargas. Isto é convencionalmente feito nos sistemas de lodo ativado com EBPR e BNR, como medida de segurança para controlar os picos de fósforo de segunda-feira no efluente, depois de reduzidas cargas de DQO durante os finais de semana (KOCH; KUHNI; SIEGRIST, 2001; RIEGER et al., 2001).

Ecologia bacteriana

A combinação do escape de DQO para a fase de aeração e a operação com o nível de OD na saturação resultou na seleção preferencial de OHO. Em tal condição, esses são organismos de rápido crescimento que podem facilmente superar os organismos de crescimento lento, como PAO e GAO. Além disso, a uma velocidade de crescimento relativamente rápida, tal como a obtida com o crescimento aeróbio, o aparecimento de filamentosas e estruturas espalhadas (*finger type*) conduz a grânulos irregulares com IVL elevado, o que poderia desestabilizar o sistema além de ser prejudicial para a remoção completa de nutrientes (DE KREUK et al., 2010; DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005).

Em termos de nitrificação, as AOB foram substancialmente selecionadas em EO1 com 4-10% de *Nitrosomonas* entre os dias 140-177 (Figura 30), o que relacionou com a q_{NH_4} mais elevada. Populações autotróficas oxidadoras de amônia quase não foram detectadas por sequenciamento de nova geração em EO2 (<0,03%). No entanto, as análises de FISH mostraram a presença de AOB β -proteobacterianas detectada com a sonda NSO190 em ambas EO (dias 156 e 165 em EO1 e EO2, respectivamente). As colônias de *Nitrosomonas* spp. foram também detectadas com a sonda NEU na EO2 (dia 91). As imagens são fornecidas no Apêndice B.

A oxidação do amônio é ainda conhecida por ser realizada por desnitrificantes heterotróficas, como as do gênero *Pseudomonas* (DAUM et al., 1998; LI et al., 2015) que foi detectado tanto em EO1 (9-1% entre os dias 77-107) como em EO2 (24-8% nos dias 56-91) (Figura 30). *Comamonas* é também uma conhecida nitrificante heterotrófica (PATUREAU et al., 1994; PATUREAU; BERNET; MOLETTA, 1997), que foi principalmente abundante em EO2, 4-56% entre os dias 123-186, enquanto que 3-23% entre os dias 49-98 em EO1 (Figura 30). Seriam necessárias análises de ecofisiologia para confirmar a propriedade funcional de nitrificação destes organismos nitrificantes-desnitrificantes para as condições de processo aqui experimentadas. Outras investigações podem considerar a detecção de um conjunto mais amplo de organismos oxidadores de amônio.

As populações de *Bradyrhizobiaceae* (supostamente NOB do gênero *Nitrobacter*) foram detectadas na EO1 ao longo de dois padrões (dias 0-107: 0,9-3%, dias 126-177: 0,1-0,5%) e continuamente na EO2 (0,2-2%) (Figura 30). As sequências OTU relacionadas foram mapeadas contra a base de dados de nucleotídeos NCBI utilizando o algoritmo BLASTN: estas sequências relacionaram em 99% de identidade com o gênero *Nitrobacter*. No entanto, outras espécies diferentes também estavam relacionadas, com alta identidade. As sequências utilizadas foram muito curtas para discriminar os filótipos, sendo necessárias sequências mais longas para este fim. A detecção destes organismos na EO2 pode indicar que a AL ou outros fatores apenas inibem a atividade de NOB, mas não os mata. Após um período de cultivo, as NOB poderiam recuperar atividade como já foi observado anteriormente (HAN; CHANG; KIM, 2003). As populações NOB da família *Nitrospiraceae* que também podem estar envolvidas tanto na oxidação de nitrato como na de amônia (Comammox) (DAIMS et al., 2015; VAN KESSEL et al., 2016) não foram detectadas com o sequenciamento em ambas EO. O FISH destacou ainda a presença de populações

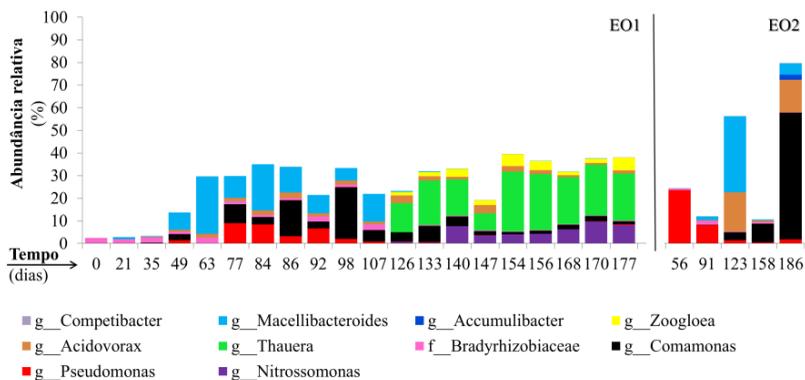
relacionadas com *Nitrobacter* (NIT3) e *Nitrospira* (Ntspa662) formando pequenos aglomerados na EO1, embora não detectadas na EO2. Estudos de lodos granulares evidenciaram em diferentes ocasiões um desequilíbrio entre AOB e NOB, sendo este último predominante (WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014; WINKLER et al., 2013). No entanto, existe uma discrepância entre *Nitrobacter* ou *Nitrospira* como NOB predominante ao longo desses estudos relatados.

Em termos de desnitrificação, as duas EO mostraram diferenças na composição da comunidade dos organismos desnitrificantes heterotróficos (DHO). As condições de EO1 selecionaram principalmente para membros da família *Rhodocyclaceae* com a *Thauera* (7-29%) sendo o gênero predominante. Em EO2, *Comamonas* (4-56%) e *Acidovorax* (0,7-17%), afiliados da família *Comamonadaceae*, foram os mais abundantes (Figura 30). Adav; Lee e Lai (2010) cultivaram grânulos que podiam reduzir concentrações elevadas de nitrito e encontraram membros da família *Comamonadaceae* como populações predominantes (52%) da comunidade desnitrificante e que agrupavam dentro de 100-200 µm de profundidade de grânulos. Por outro lado, Yan et al. (2016) cultivaram grânulos que reduziram nitrito e nitrato, e encontraram *Thauera* (20%) como DHO dominante. Definitivamente, a composição da comunidade desnitrificante depende das principais fontes de carbono e dos receptores de elétrons contidos nas águas residuárias. No presente caso, o mesmo esgoto do mesmo sistema de coleta foi usado para ambas EO. A diferença nas populações desnitrificantes pode assim estar relacionada com o receptor de elétrons disponível e às condições operacionais aplicadas. Isso destacou os impactos operacionais na ecologia bacteriana.

Elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal residual e nitrito podem ser utilizadas para estimular o crescimento de organismos oxidadores de amônia anaeróbios participantes do processo anammox (*ANAerobic AMMonium OXidation*), adicionando, por exemplo, uma fase anóxica misturada após a aeração. Estes organismos não foram investigados através do sequenciamento. Para a detecção de Anammox a região alvo do DNA investigada deve ser v4 (WEISSBRODT et al., 2015), e no presente estudo a região do DNA avaliada foi v1-v3. As anammox não foram detectadas por FISH.

Esclarecendo falhas no desempenho do lodo granular no tratamento de esgoto sanitário sob condições de clima subtropical

Figura 30: Perfil das comunidades microbianas relacionadas com BNR do sistema estudado para as diferentes EO. Um mapa completo com mais organismos identificados é fornecido no Apêndice B.



Em termos de EBPR, a operação com enchimento mais lento na EO2 levou à progressiva e seleção preferencial da população do gênero *Macellibacteroides*, de 0,04% no dia 56 a 34% no dia 123, concomitantemente ao aumento de "*Ca. Accumulibacter*" (2,3-3,4%). Imagens de FISH são fornecidas no Apêndice B, capturadas durante EO2. No entanto, os *Macellibacteroides* também estavam substancialmente presentes na EO1 (8-25% a partir dos dias 49-63) (Figura 30). Este organismo fermentativo foi pela primeira vez isolado de filtros anaeróbios de fluxo ascendente (JABARI et al., 2012). Ele pode agir aqui como um indicador interessante da presença de processos hidrolíticos e fermentativos no lodo, relacionados com a hidrólise da matéria orgânica particulada do esgoto ou à degradação da biomassa (k_d). Outras análises de ecofisiologia e genômicas podem ser realizadas para desvendar o metabolismo deste organismo neste ecossistema.

Definitivamente, a ecologia bacteriana do lodo granular aeróbio foi impactada pelas condições impostas nas duas EO diferentes. Embora as diferenças nas populações nitrificantes e supostamente desnitrificantes fossem destacadas, as condições de operação devem ser projetadas para a seleção preferencial de PAO de crescimento lento (se a remoção total de nutrientes for o objetivo) ou GAO (se apenas a remoção de C e N for o objetivo) como agentes microbianos de uma granulação robusta. Selecionar PAO pode fornecer uma vantagem adicional definitiva para EBPR, promovendo assim efluentes dentro de padrões de lançamento mais rigorosos.

4.2.4 Conclusões

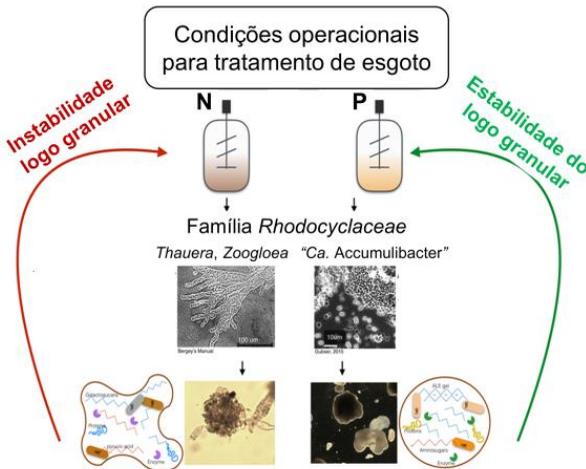
A transferência da tecnologia de lodo granular requer considerações locais específicas para que a engenharia de operação do RBS alcance eficiente granulação e BNR. As investigações piloto no local fornecem sugestões sobre o comportamento do processo com o esgoto de interesse. Este estudo piloto comparativo destacou um conjunto de parâmetros operacionais e da ecologia microbiana, que precisam ser considerados para remediar falhas na perspectiva de estabelecer um processo robusto. Em geral, as falhas nos desempenhos dos processos BNR do lodo granular, cultivado em esgoto sanitário de baixa carga, devem ser corrigidas pelo tempo das fases de enchimento, aeração e sedimentação. Tem-se em conclusão, como estratégias para um bom funcionamento do processo LGA com BNR:

(1) A utilização de um seletor anaeróbio é um pré-requisito para a seleção de PAO/GAO, como agentes microbianos de granulação robusta. A hidrólise total, conversão e captação da matéria orgânica afluyente em condições anaeróbias completas (ausência de qualquer receptor de elétrons) é uma prioridade para este fim. Um tempo de contato anaeróbio substancial pode ser conseguido por uma alimentação de fluxo ascendente lento através de uma cama de lodo concentrada ou pela operação de uma fase anaeróbia com mistura após a alimentação.

(2) O controle da fase de aeração é necessário para promover a remoção de nitrogênio e fósforo com o crescimento de biomassa, evitando a perda de biomassa por respiração endógena prolongada. A duração da fase de aeração e o controle do nível de OD são fatores específicos a serem manipulados para estes fins. O acúmulo de nitrito deve ser evitado por meio da prevenção da inibição das NOB por AL. O escape de qualquer receptor de elétrons (OD, nitrito e nitrato), da fase de aeração para a fase de enchimento anaeróbio, deve ser prevenido pelo controle do OD, seja para NDS ou para NDA e/ou pela inclusão de uma posterior fase anóxica para reduzir concentrações residuais de NO_x . Estimular o crescimento de anammox também pode ser uma solução.

(3) A ecologia microbiana deve ser integrada para compreender as comunidades dos processos de LGA. As EO mostraram ter impacto nas composições bacterianas. A gestão dos fatores de seleção é necessária para que as principais rotas metabólicas de interesse sejam projetadas. Além das comunidades principais, as comunidades paralelas, tais como micro-organismos hidrolíticos e fermentadores, que são importantes para o fornecimento de DQO prontamente biodegradável para PAO e GAO, a partir da matéria orgânica complexa do esgoto sanitário.

4.3 EFEITOS DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA SELEÇÃO BACTERIANA EM REATORES RBS VISANDO A GRANULAÇÃO ESTÁVEL E A PRODUÇÃO DE EPS³.



O novo paradigma no tratamento de águas residuárias visa o alcance da sustentabilidade junto à proteção ambiental e à saúde pública, por meio da intensificação do processo e da recuperação de recursos. A tecnologia de lodo granular tem

se tornado um novo padrão no tratamento de esgoto sanitário e pode atingir os critérios mais rigorosos de qualidade de água. As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas no microbioma granular permitem a agregação e a estabilidade dos agregados. Estes exopolímeros, que se comportam como alginato (ALE), representam biomateriais de alto valor de interesse industrial. Assim, os lodos granulares oferecem novas perspectivas para a biorrefinaria da matéria orgânica. Nesse contexto, o presente trabalho investigou os efeitos das condições operacionais aplicadas em reatores de bateladas sequencias (RBS) na dinâmica microbiana, com objetivo de obter uma granulação estável e a produção de EPS. Para tal, foi estudado o tratamento de esgoto sanitário real em reator em escala piloto (sistema experimental I – SEI), operando em ciclos com fases predominantemente aeróbias, visando a remoção de C e N do esgoto. A

³ A versão resumida deste trabalho foi apresentada como *fusion keynote* (Weissbrodt & Guimarães) no “The 13th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies”, realizado em Jerez de la Frontera, Espanha, em junho, 2016. Os resultados apresentados neste subitem fazem parte de artigo que será submetido para um periódico internacional.

D. G. Weissbrodt*, L. B. Guimarães*, N. R. Gubser, M. Albertsen, R. H. R. Costa, M. C. M. van Loosdrecht, P. H. Nielsen. Intensification and exopolymers biorefining in water resource recovery processes: an enterprise from the microbiome of nutrient-removing granular sludge biofilms. *Equal contribution

granulação foi alcançada em 56 dias, porém ocorreu a desintegração dos grânulos aos 274 dias de operação do reator. Os fenômenos de granulação-desintegração relacionaram-se com a dinâmica da razão PS/PN dos EPS (concomitante aumento e diminuição na produção de PS, de 0,4 a 1,2 a 0,6g $PS_{Glc-eq} g^{-1} PN_{BSA-eq}$) e com a dinâmica das populações bacterianas específicas. As populações afiliadas à *Rhodocyclaceae*, tais como o gênero produtor de EPS *Thauera* (n.d.-28%), contribuíram positivamente para a estabilidade dos grânulos nas condições operacionais utilizadas para a remoção de C-N. Com o objetivo de selecionar organismos acumuladores de fósforo (PAO), foi realizado um estudo complementar, utilizando um reator de bancada (sistema experimental II – SEII) e esgoto sanitário sintético, aplicando ciclos com fases anaeróbia-aeróbia. Os resultados revelaram correlação entre a granulação (em 30 dias), a produção de EPS (0,16 a 0,48 g $ST_{EPS} g^{-1} SV_{BM}$) e o enriquecimento de "*Candidatus Accumulibacter*" (n.d.-56%). Em ambos os experimentos, a família *Rhodocyclaceae* foi predominante em períodos de boa estrutura de grânulos e alta produção de EPS. Porém, em nível de gênero, notou-se que gêneros como *Thauera* e *Zoogloea* não conseguiram sustentar a estrutura dos grânulos em longo prazo, enquanto o gênero "*Ca. Accumulibacter*" formou grânulos robustos e estáveis. Portanto, a seleção de PAO por meio da gestão da operação do reator é um fator que pode levar à efetiva coesão dos grânulos, promover o processo de remoção de fósforo e sustentar a produção de biopolímeros de elevado valor agregado.

OPERATIONAL CONDITIONS EFFECTS ON BACTERIAL SELECTION IN SBR REACTORS TARGETING STABLE GRANULATION AND EPS PRODUCTION

The new paradigm in wastewater treatment aims for the achievement of sustainability along with environmental protection and public health, through process intensification and resource recovery. The granular sludge technology has become a new standard in domestic sewage treatment and can achieve most stringent water quality criteria. Extracellular polymeric substances (EPS) produced in the granular sludge microbiome allow for aggregation and stability of the bioaggregates. These exopolymers, which behave as alginate (ALE), represent high value biomaterials of industrial interest. Thus, granular sludge offers new perspectives for the biorefining of organic matter from used streams. In this context, the present work investigated the effects of operational conditions applied under sequencing batch reactor (SBR) regime on the microbial population dynamics, in order to obtain a stable granulation and the production of EPS. The treatment of sanitary sewage was studied in a pilot scale reactor (experimental system - ESI) operating in cycles consisting of pulse feeding followed by an aeration phase, aiming for the simultaneous removal of C and N from sewage. Granulation was achieved in 56 days, but the granules disintegrated 274 days after reactor start-up. The granulation-disintegration phenomena were related to the dynamics of the PS/PN ratio (concomitant increase and decrease in PS production, from 0,4 to 1,2 to 0,6 g PS_{Glc-eq} g⁻¹ PN_{B_{SA}-eq}) and the dynamics of specific bacterial populations. Populations affiliated with *Rhodocyclaceae*, such as the EPS-producing genus *Thauera* (n.d.-28%), contributed positively to granules stability under the operating conditions used for C-N removal. In order to select for phosphorus accumulating organisms (PAO), a complementary study was carried out using a bench reactor (experimental system - ESII) and synthetic sewage, applying cycles with anaerobic-aerobic phases. The results showed a correlation between granulation (within 30 days), EPS production (0,16 to 0,48 g ST_{EPS} g⁻¹ SV_{BM}) and enrichment of the PAO genus "*Candidatus Accumulibacter*" (n.d.-56%). Under both experiments, members of the family of *Rhodocyclaceae* were predominant under periods of stable granules and high EPS production. However, at the genus level, it was noted that the *Thauera* and *Zoogloea* genera could not sustain the granules structure on the long term, while the genus "*Ca. Accumulibacter*" formed robust and stable granules. Therefore, the selection of PAO through the management of the reactor operation is a factor that can lead to the effective cohesion of the granules, promote the removal of phosphorus, and sustain the production of biopolymers of high added value.

4.3.1 Introdução

O tratamento de efluentes está passando por uma mudança de paradigma (DAIGGER, 2008) para alcançar a sustentabilidade junto à proteção ambiental e à saúde pública. Nos países desenvolvidos, a recuperação de energia, nutrientes, produtos químicos e biopolímeros de alto valor agregado já são um alvo, além da intensificação dos processos biológicos de remoção de poluentes (VAN LOOSDRECHT; BRDJANOVIC, 2014). Esta mudança de paradigma coloca o saneamento no contexto da economia circular e da economia azul, partindo do termo de estações de tratamento de esgoto (ETE), para instalações de recuperação de recursos hídricos (DAIGGER, 2011; WEF, 2014), focando no reaproveitamento dos recursos. Portanto, as tecnologias modernas de tratamento de águas residuárias devem continuar a sustentar a obtenção de elevados padrões de proteção do meio ambiente e da saúde, assim como ter uma perspectiva de biorrefinaria.

A tecnologia de lodo granular, comercialmente conhecida como Nereda[®], atua como novo um padrão, constituindo de apenas um reator em bateladas sequenciais (RBS) para a completa remoção biológica de nutrientes (BNR) e para a decantação secundária (GIESEN; NIERMANS; VAN LOOSDRECHT, 2012). As estações em escala real estão sendo progressivamente instaladas tanto nos países industrializados como nos países em desenvolvimento, cerca de 50 plantas estão atualmente em implantação a nível mundial, sendo 6 no Brasil (GIESEN et al., 2015; VAN DER ROEST et al., 2011), Além da intensificação do processo em espaço reduzido (PRONK et al., 2015), o LGA fornece a oportunidade para a recuperação de produtos como fósforo (MAÑAS; BISCANS; SPÉRANDIO, 2011) e exopolímeros (LIN et al., 2010).

O lodo granular consiste em biofilmes de rápida sedimentação, obtidos pela auto-agregação microbiana, sustentada por matrizes de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que conferem ao grânulo uma consistência de hidrogel (SEVIOUR et al., 2012). Tais exopolímeros extraídos do LGA exibiram um comportamento reológico como do alginato (*Alginate-like exopolymer* – ALE), o que proporciona a aplicabilidade deste material, seja na formação de película sobre uma superfície hidrofílica (indústria de papel), ou como barreira resistente à água (fabricação de concretos), entre outros (LIN et al., 2015). Assim, o lodo granular é um excelente agente de captura de carbono e conversão deste em materiais de alto valor agregado. Portanto, a otimização do

processo LGA oferece oportunidades para alcançar não apenas uma elevada qualidade de efluente, bem como a recuperação de bioprodutos.

A seleção concomitante dos micro-organismos que removem carbono, nitrogênio e fósforo pode ser efetuada em sistemas LGA, resultando na completa remoção de nutrientes (de Kreuk, et al., 2005a, Yilmaz, et al., 2008). As associações bacterianas de organismos heterótrofos ordinários (OHO) e desnitrificantes (DHO) (por exemplo, da família de *Rhodocyclaceae*) demonstraram formar grânulos em curtos períodos de *start up* sob condição de *wash out* (WEISSBRODT et al., 2012). Porém, a seleção de populações de crescimento lento, como os heterotróficos acumuladores de polifosfato (PAO, sendo "*Ca. Accumulibacter*" o gênero mais representativo), confere estabilidade ao grânulo (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004). Deste modo, além dos PAO serem fundamentais no processo de remoção biológica de fósforo, estes organismos demonstram ser um potencial produtor de exopolímeros. Um tipo de exopolímero nomeado como "*Granulan*" foi extraído de grânulos enriquecidos em organismos acumuladores de glicogênio (GAO -sendo "*Ca. Competibacter*" o gênero representativo) (SEVIOUR, et al., 2011). Porém, ainda não se sabe sobre o envolvimento de PAO na formação de EPS. A elucidação do potencial de formação de exopolímeros pelos PAO é, portanto, de grande interesse à estabilidade do processo e à recuperação de biopolímeros.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito das condições operacionais e da seleção bacteriana na formação da matriz de EPS e na estabilidade dos grânulos em reator RBS. Inicialmente, foi estudada a granulação e a estrutura dos grânulos para o tratamento de esgoto sanitário real, em um reator piloto, denominado como "Sistema Experimental I (SEI)", como descrito no item 3. As condições aplicadas neste reator tiveram como objetivo a remoção de carbono e nitrogênio do esgoto sanitário, com a consequente seleção de organismos de rápido crescimento, como OHO e/ou DHO. Para melhor compreensão nas relações entre a produção de exopolímeros e as populações bacterianas de crescimento lento no LGA, principalmente os PAO, foi realizado um estudo em escala de bancada ("Sistema Experimental II – SEII") para a granulação em condições bem definidas de enriquecimento de "*Ca. Accumulibacter*".

4.3.2 Materiais e Métodos

Configuração e operação dos sistemas experimentais

Sistema experimental I – Piloto com esgoto sanitário

O reator em coluna RBS ($A/D = 8,7$) em escala piloto (98 L) foi operado na UFSC no Brasil para granulação e remoção de C e N de esgoto sanitário. O RBS foi inoculado com lodo ativado floculento ($3,2 \text{ g SSV L}^{-1}$) de uma ETE projetada para remoção de DQO e N (Florianópolis, Brasil). A operação deste sistema durou 275 dias, ao longo de variações sazonais de temperatura ($18\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$) e sem controle de pH ($6,7\text{-}7,6$ no afluente). Baseado em estudos prévios (JUNGLES et al., 2011; JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; WAGNER et al., 2015; WAGNER; COSTA, 2013), o ciclo do RBS de 4 h foi dividido em: 3 min de alimentação em pulso ascendente, 10 min de período de repouso, 211 min de aeração ascendente, 13 min de sedimentação e 3 min de descarte de efluente (troca volumétrica de 56%) (Figura 31). As características de cada fase do ciclo estão detalhadas no item 3, assim como a composição do esgoto sanitário está apresentada na Tabela 1.

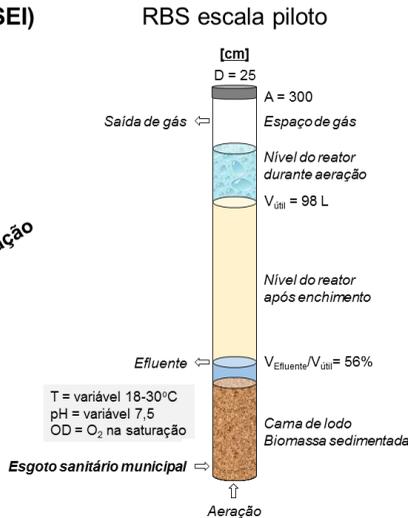
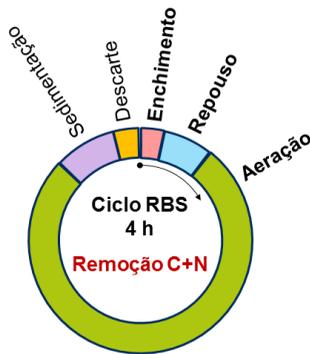
Sistema experimental II – Bancada com esgoto sintético para enriquecimento de “*Ca. Accumilibacter*”.

O reator em coluna RBS (relação $A/D = 14,3$) em escala de bancada (2,4 L) foi operado na TU Delft nos Países Baixos, para granulação e seleção de PAO. O RBS foi inoculado com lodo ativado floculento ($1,5 \text{ g SSV L}^{-1}$) de uma ETE projetada para remoção de C, N e P (Harnaspolder, Países Baixos). A operação deste sistema durou 60 dias, sob condições controladas de temperatura ($18 \text{ }^\circ\text{C}$), pH ($7,5$ no reator) e OD (50% da saturação na fase de aeração). Baseado em estudo prévio de enriquecimento de PAO (WEISSBRODT et al., 2014), o ciclo do RBS de 6 h foi dividido em: 5 min de aplicação de nitrogênio gasoso, 15 min de alimentação do afluente em fluxo ascendente, 5 min de aplicação de nitrogênio gasoso, 150 a 175 min de mistura anaeróbia, 150 min de mistura aeróbia, 30 a 5 min de sedimentação (adaptada com a formação da biomassa) e 5 min de descarte de efluente (troca volumétrica de 50%) (Figura 31). As características de cada fase do ciclo e metodologias analíticas utilizadas estão detalhadas no item 3, assim como a composição e as adaptações feitas no esgoto sintético. A composição detalhada do esgoto sintético está mostrada no Apêndice A.

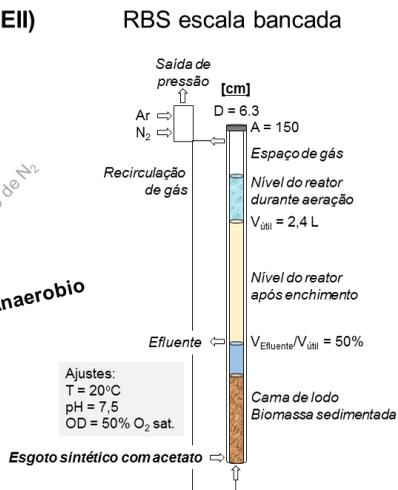
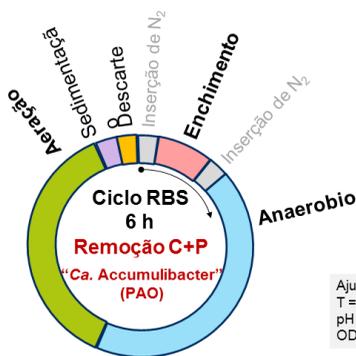
Efeitos das condições operacionais na seleção bacteriana em reatores RBS visando a granulação estável e produção de EPS

Figura 31: Ciclo operacional dos reatores RBS utilizados nos sistemas experimentais I e II. O sistema experimental I foi composto por um RBS piloto tratando esgoto sanitário para remoção de C e N. O sistema experimental II consistiu de reator RBS de bancada operado para seleção e enriquecimento de PAO.

Sistema experimental I (SEI)



Sistema experimental II (SEII)



Análises físico-químicas

As análises de DQO e DBO do esgoto sanitário e da série de sólidos (SST, SSV e SSF) das amostras de licor misto de ambos os reatores foram efetuadas de acordo com os métodos padrões do *Standard Methods* (AWWA; APHA; WEF, 2012). Nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+), nitrogênio total (NT), ortofosfato e fósforo total (PT) foram analisados espectrofotometricamente utilizando kits colorimétricos (Hach-Lange, Alemanha) ou ensaios (AWWA; APHA; WEF, 2012). Nitrato (N-NO_3^-) e nitrito (N-NO_2^-) nas amostras do RBS piloto foram medidos por cromatografia iônica utilizando um sistema DIONEX, ICS-5000 (Dionex®, EUA). As concentrações de AGV das amostras do RBS de bancada foram medidas por HPLC (BioRad, EUA).

Análises de biomassa

A evolução das distribuições de tamanho das partículas do lodo foi seguida por difração a laser (MasterSizer Series 2000, Malvern Instruments, RU) para as amostras de biomassa provenientes do reator piloto (SEI) e por analisador de imagem (Quantiment 500 Image Analyzer, Leica Cambridge Instruments, RU) para a biomassa do reator de bancada (SEII). O conceito de porcentagem de volume de lodo com tamanho abaixo de 200 μm (*sludge volume percentage with size below 200 μm - SVP-SB200*), proposto por Liu et al. (2010), foi utilizado no SEI para determinar o ponto de viragem em que o reator era dominado por lodo granular. Estes autores consideram o reator como LGA dominante quando o SVP-SB200 está abaixo de 50%.

Análises de EPS

No SEI, os EPS foram extraídos a partir de 5 mL de licor misto coletados no fim da fase de aeração. A amostra foi submetido a condições alcalinas ($\text{pH} > 10$) adicionando 5 mL de NaOH a 1 mol L^{-1} e à alta temperatura (30 min a 80 °C), seguido por sonicação (5 min a 55 kHz) (TAY; LIU; LIU, 2001b). As frações de exopolissacarídeos (PS) e proteínas (PN) do EPS foram analisadas utilizando os métodos fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e folin-fenol (LOWRY et al., 1951), respectivamente. Os resultados de produção de EPS são descritos com base na mediana, primeiro e terceiro quartis (m; q1-q3).

No SEII, os EPS foram extraídos a partir de 1 g do licor misto centrifugado e seco, coletado no fim da fase de aeração. A amostra foi

Efeitos das condições operacionais na seleção bacteriana em reatores RBS visando a granulação estável e produção de EPS

submetida a condições alcalinas ($\text{pH} > 10$) adicionando Na_2CO_3 a 0,5% (peso / volume) e alta temperatura (30 min a $80\text{ }^\circ\text{C}$), seguido por precipitação utilizando HCl a 1 mol L^{-1} (FELZ et al., 2016; LIN et al., 2010). A fração de massa dos extratos ácidos de ALE (w_{ALE}) foi calculada de acordo com a equação 27, mostrada no item 3. A propriedade de geleificação e o comportamento semelhante ao alginato dos exopolímeros extraídos foram verificados pela adição de sais de cálcio e medições reológicas (LIN; SHARMA; VAN LOOSDRECHT, 2013; SEVIOUR et al., 2009a).

Identificação das populações e dinâmicas bacterianas por métodos moleculares

As séries temporais das composições de comunidades bacterianas foram medidas por sequenciamento de *amplicon* de nova geração e alta resolução. A região hipervariável V1-V3 do gene 16S rRNA foi amplificada por PCR de acordo com o manual MIDAS (ALBERTSEN et al., 2015; MCILROY et al., 2015a) e os *amplicons* sequenciados utilizando um sequenciador MiSeq (Illumina, EUA). As abundâncias relativas das comunidades microbianas específicas foram expressas como porcentagem da contagem de leitura do sequenciamento total.

As análises de FISH foram realizadas com o gene alvo 16S rRNA e microscopia de epifluorescência (*Epifluorescence Microscopy - EFM*) para validar as mudanças nas populações microbianas predominantes, encontradas no sistema de bancada (SEII) detectadas por sequenciamento. Amostras do licor misto foram primeiramente homogeneizadas utilizando um moedor do tipo Potter-Elvehjem. Em seguida, as células foram fixadas, imobilizadas e hibridizadas de acordo com a metodologia padrão (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; NIELSEN et al., 2009). Todas as eubactérias foram hibridizadas com o conjunto de sonda EUB338 (AMANN et al., 1990). "*Ca. Accumulibacter*" foi alvo utilizando o conjunto de sondas PAOMix PAO462, PAO651 e PAO846 (CROCETTI et al., 2000b). As análises de PAO foram ainda refinadas utilizando apenas a sonda PAO651, uma vez que outros PAO462 e PAO846 hibridizam com outras linhagens (ALBERTSEN et al., 2016). Adicionalmente, as linhagens PAO I e II foram hibridizadas com as sondas Acc-1-444 e Acc-2-444, respectivamente (FLOWERS et al., 2009b). "*Ca. Competibacter*" foi hibridizada utilizando o conjunto de sondas GAOmix (GAO_Q431 e GAO_Q989) (CROCETTI et al., 2002). As lâminas de microscopia foram analisadas utilizando um microscópio de epifluorescência

Axioplan 2 (Zeiss, Alemanha) equipado com conjuntos de filtros 26, 20 e 17 para os cromóforos Cy5, Cy3 e Fluos, respectivamente. Detalhes das sondas se encontram na Tabela 3, item 3.

4.3.3 Resultados

Sistema experimental I (SEI)

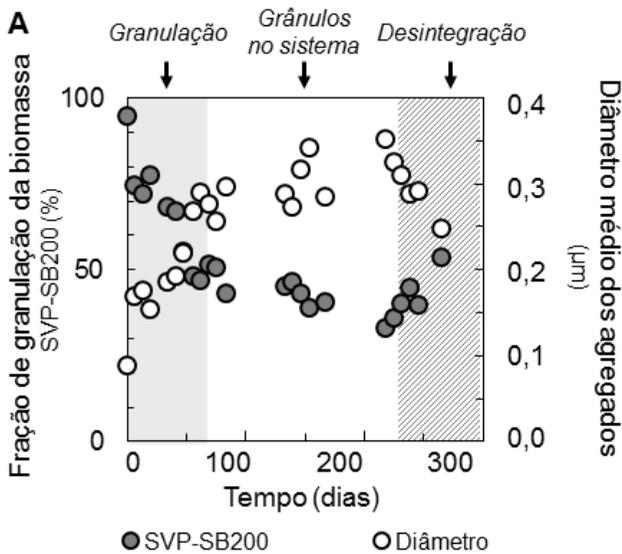
Correlação dos EPS com a Granulação-Desintegração

O RBS piloto (SEI), inoculado com lodo ativado e alimentado com esgoto sanitário de baixa carga (193 ± 60 mg DQO_{Tot} ciclo⁻¹ L_R⁻¹ e 120 ± 34 mg DBO ciclo⁻¹ L_R⁻¹), atingiu rápida granulação (56 dias) e seu estudo foi conduzido por 275 dias. O tempo de granulação de 56 dias foi próximo àqueles relatados (70-50-60 dias) em reatores que tratam águas residuárias com composições similares (ARAÚJO et al., 2016; ISANTA et al., 2012; WAGNER et al., 2015a). A formação de grânulos foi evidente ao longo do período inicial do estudo pelo aumento no diâmetro médio das partículas, partindo de 87 µm no inóculo chegando a 268 µm no dia 56 (Figura 32 A-B). Os grânulos prevaleceram no sistema por 220 dias (média de 300 ± 50 µm, SVP-SB200 de 43%), mas desfavoravelmente desintegraram e foram lavados do sistema no dia 270. A diminuição na distribuição do tamanho das partículas ocorreu a partir do dia 218, apesar do diâmetro médio ainda ser mantido acima de 200 µm até a total perda da biomassa (Figura 32A).

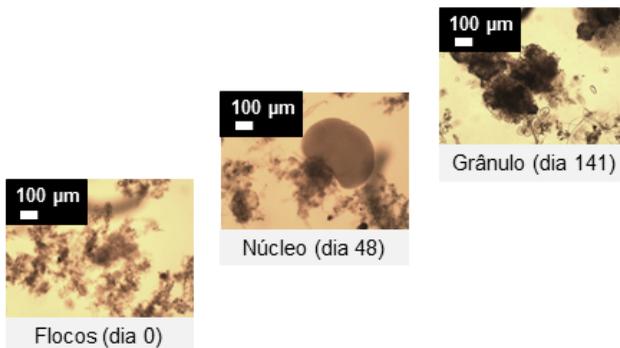
Os resultados (Figura 32 C) evidenciam relações diretas entre os fenômenos de granulação-desintegração e as quantidades e as razões PS/PN do EPS extraído do lodo. As quantidades medianas de PN (161, 103-199 mg de PN_{BSA-eq} g⁻¹ SV_{BM}) e PS (101; 83-117 mg PS_{Glc-eq} g⁻¹ SV_{BM}) encontradas nos grânulos (Tabela 8) corroboram com trabalhos anteriores relatando proteínas como o componente predominante dos EPS de lodos granulares (MCSWAIN et al., 2005; ZHU et al., 2015). PN diminuiu ao longo do tempo, enquanto PS aumentou juntamente com a granulação e diminuiu com a desintegração. A razão PS/PN correlaciona-se com o tamanho das partículas, com um aumento de 3 vezes de 0,4 a 1,2 g PS_{Glc-eq} g⁻¹ PN_{BSA-eq} ao longo da granulação e redução de 2 vezes de 1,2 a 0,6 g PS_{Glc-eq} g⁻¹ PN_{BSA-eq} durante a desintegração (Figura 32 B). Estes resultados sugerem que a razão PS/PN da matriz de EPS se relaciona com a estrutura do grânulo, e que PS contribui de forma importante para sua coesão. A resistência da

matriz de EPS de grânulos foi relatada por Seviour et al., (2009) como independente do teor de proteínas.

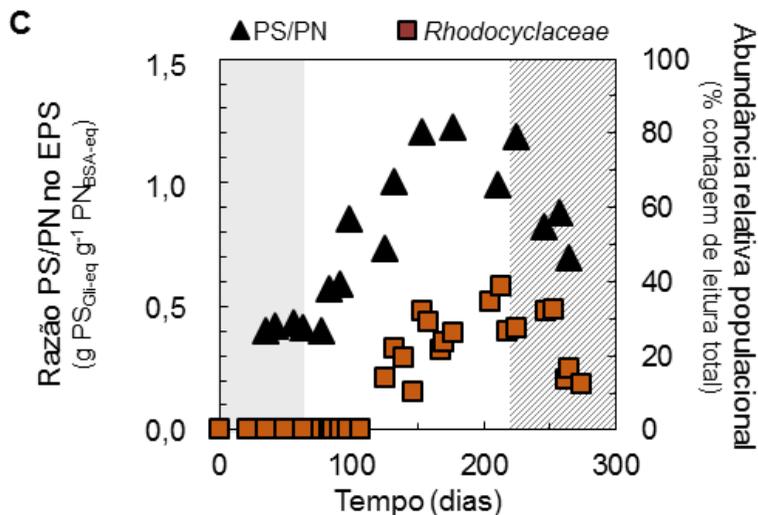
Figura 32: (A) Evolução da granulação-desintegração descrita pela porcentagem de lodo com tamanho abaixo de 200 μm (SVP-SB200) e distribuição média do diâmetro dos agregados. (B) Imagens digitais de estereomicroscopia mostrando a formação de bioagregados granulares.



B



Continuação Figura 32: (C) Evolução da relação exopolissacarídeos-proteínas (PS/PN) do EPS e a abundância relativa dos membros da família *Rhodocyclaceae*. **(D)** *Heatmap* exibe a composição bacteriana baseada na região V1-V3 do gene 16S rRNA. As 10 comunidades mais abundantes estão destacadas neste *heatmap*.



D Parentesco bacteriano mais próximo (família / gênero)

Abundância relativa (% contagem de leitura total)

<i>Rhodocyclaceae</i> <i>Thauera</i>	0.0	0.0	0.1	12.7	21.9	28.1	27.6	10.9	0.8
<i>Rhodocyclaceae</i> <i>Zoogloea</i>	0.0	0.0	0.0	1.4	1.7	10.4	4.9	2.8	11.7
<i>Campylobacteraceae</i> <i>Arcobacter</i>	0.0	0.0	0.0	1.1	0.7	0.3	3.1	2.1	28.8
<i>Flavobacteriaceae</i> <i>Flavobacterium</i>	0.0	0.5	1.8	1.3	1.5	8.6	2.2	1.2	6.7
<i>Flavobacteriaceae</i> <i>Cloacibacterium</i>	0.0	1.7	7.2	0.2	0.3	0.1	0.8	0.8	7.1
<i>Comamonadaceae</i> <i>Acidovorax</i>	0.0	0.4	2.0	1.5	0.4	0.3	3.1	2.6	6.6
<i>Comamonadaceae</i> <i>Comamonas</i>	0.0	2.5	16.5	4.0	2.4	1.2	0.8	0.8	0.9
<i>Porphyromonadaceae</i> <i>Macellibacteroides</i>	0.0	7.8	10.9	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.9
<i>Planctomycetaceae</i> <i>Pirellula</i>	0.3	17.1	0.2	0.6	0.1	1.5	0.1	0.2	0.0
Alpha cluster <i>FukuS110</i>	26.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0	49	86	126	170	213	253	262	274
	Tempo (dias)								

Tabela 8. Quantidade de polissacarídeos (PS) e proteínas (PN) nos exopolímeros extraídos da biomassa do sistema piloto (SEI) tratando esgoto sanitário. Os valores de mediana são fornecidos junto com o primeiro (q1) e terceiro (q3) quartis.

Condições dos grânulos	Período operacional	Mediana PS (q1-q3)	Mediana PN (q1-q3)
		(mg PS _{Glc-eq} g ⁻¹ V _{EPS})	(mg PN _{BSA-eq} g ⁻¹ SV _{EPS})
Granulação	dia 0 a 56 (n=3)	69 (66-98)	161 (159-233)
Grânulos	dia 56 a 218 (n=10)	101 (83-117)	161 (103-199)
Desintegração	dia 218 a 270 (n=4)	87 (73-86)	102 (96-102)

A desintegração dos grânulos pode ser consequência de diferentes fatores. Um dos mais conhecidos está relacionado à proliferação de organismos filamentosos ocasionando grânulos maiores, de estrutura frouxa e de baixa densidade. O crescimento excessivo de bactérias filamentosas pode levar a grânulos fofos (*fluffy*) e dispersos que podem ser facilmente lavados para fora do reator (LIU; LIU, 2006; MORGENROTH et al., 1997; WEISSBRODT et al., 2012; ZHENG et al., 2006). Em sistema de lodos ativados, os aglomerados de *Zoogloea*, também conhecido como *zoogloal bulking*, são indesejáveis, pois deterioram o desempenho da sedimentação do lodo. Isto acontece pois estes organismos, assim como *Thauera* e *Acinetobacter*, são grandes produtores de polissacarídeos, os quais produzidos em excesso aprisionam água, dificultando a separação do lodo (LAJOIE et al., 2000). A desintegração de bioagregados pode também estar relacionada com baixos níveis de OD aplicados na fase de aeração em sistema operado para remoção de nitrogênio (MOSQUERA-CORRAL et al., 2005). Falhas nos sistemas de aeração também já provocaram desintegração (WAGNER et al., 2015a). Outras causas estão associadas à limitações de transferência de massa promovidas pela baixa relação C/N (LUO et al., 2014) e variações na carga afluyente (WAGNER; COSTA, 2013). Influências de toxicidade (MASCARENHAS; MIKKELSEN; NIELSEN, 2004; NIELSEN; KEIDING, 1998), desequilíbrio catiônico e do impacto de íons, como o manganês na desregulação bacteriana (WAN et al., 2013), também podem levar à desintegração. No presente estudo, a desintegração está ligada à

diminuição da razão PS/PN do EPS. Em função das complexas características do esgoto sanitário, alguns dos fatores descritos acima podem ter contribuído para a desagregação dos grânulos. Correlações adicionais foram encontradas com as mudanças nas populações microbianas dentro dos agregados (mostradas abaixo), cuja influência nos fenômenos de deflocação em lodos ativados também foi relatado por Wilén et al. (2000).

Desempenho do reator na remoção de carbono e nitrogênio

Com relação ao desempenho na remoção de DQO e DBO no RBS piloto, os resultados atenderam aos padrões brasileiros da Resolução 430 (CONAMA, 2011) e do estado de Santa Catarina (CONSEMA-SC, 2009). As concentrações médias de DQO e DBO obtidas a partir da análise do efluente tratado foram de 125 ± 78 mgDQO_{tot} L⁻¹ (64% de remoção) e 45 ± 23 mg L⁻¹ (79% de remoção), respectivamente. Porém, ressalta-se que com estas características, o efluente não poderia ser lançado em países como os da União Européia, uma vez que as concentrações efluentes de DQO_{tot} estavam no limite dos valores permitidos pela União Européia, e os de DBO acima do aceitável (Tabela 9).

A eficiência média de remoção do nitrogênio amoniacal foi de 75%, com uma concentração no efluente de 13 ± 4 mg N-NH₄ L_{Efluente}⁻¹ em conformidade com a legislação local (Tabela 9). Nitrito e nitrato foram formados por nitrificação e tiveram concentrações efluentes de 15 ± 7 mg N-NO₂ L_{Efluente}⁻¹ e 6 ± 6 mg N-NO₃ L_{Efluente}⁻¹. Pesquisas anteriores reportaram níveis similares de acúmulo de nitrito em sistemas LGA (COMA et al., 2012; JUNGLES et al., 2011; WAGNER et al., 2015a). A nitrificação-desnitrificação simultânea foi provavelmente prejudicada pela limitada zona anóxica formada dentro dos biofilmes granulares durante a aeração (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005; MOSQUERA-CORRAL et al., 2005). Isto ocorreu pela penetração total do OD nos agregados, como consequência dos altos níveis de OD no líquido mantidos na aeração e pequeno tamanho de grânulos. Além disso, a fase de repouso foi muito curta para a redução completa de nitrito e nitrato remanescente dos ciclos anteriores. O processo no RBS piloto foi conduzido somente para a remoção de C-N, uma vez que a remoção de P não é considerada no lançamento de águas residuárias pela regulamentação nacional (CONAMA, 2011) (Tabela 9). Portanto, como o RBS não foi operado para EBPR, o fósforo total residual (P_{total}) permaneceu alto ($4,6 \pm 1,5$

Efeitos das condições operacionais na seleção bacteriana em reatores RBS visando a granulação estável e produção de EPS

mg TP L_{Efluente}⁻¹) com média de 21% de remoção, a qual ocorreu principalmente via anabolismo.

Tabela 9: Características do afluente e efluente do RBS (SEI). Comparação dos padrões de lançamento de efluentes entre as diretrizes do Brasil, Estado de Santa Catarina e União Européia.

Parâmetros	Afluente (mg L ⁻¹)	Efluente (mg L ⁻¹) % removal	Padrões de lançamento de águas residuárias (se não especificado: mg L ⁻¹) % de remoção		
			Brasil [^a]	Santa Catarina [^b]	União Européia [^c]
SST	116 ± 53	37 ± 15 68%	1 mL L _{Efl} ⁻¹ em 1 h	Local	60 ^{c1} / 35 ^{c2} 70% ^{c1} / 90% ^{c2}
DQO total	350 ± 106	125 ± 78 64%	n/e n/e	n/e n/e	125 75%
DQO solúvel	197 ± 83	53 ± 21 73%	n/e n/e	n/e n/e	n/e n/e
DBO ₅	217 ± 62	45 ± 23 79%	120 60%	60 80%	25 70-90%
Nitrogênio total ^d	62 ± 9	42 ± 9 (32%)	n/e n/e	n/e n/e	15 ^{c3} / 10 ^{c4} 70-80%
N-NH ₄	51 ± 8	13 ± 4 75%	20 ^{a1} n/e	n/e n/e	n/e n/e
N-NO ₂	n/d	15 ± 7	n/e	n/e	n/e
Fósforo total	5,8 ± 1.8	4,6 ± 1.5 (21%)	n/e n/e	4 75%	2 ^{c3} / 1 ^{c4} 80%

^a CONAMA (2011) para efluentes domésticos; von Sperling, et al. (2008).

Critério para materiais sedimentáveis: 1 mL L⁻¹ (1 h, cone Imhoff).

^{a1} CONAMA (2011) para efluentes diversos.

^b CONSEMA-SC (2009): Critério para sólidos suspensos é definido pelas autoridades de licenciamento ambiental local.

^c EUR-Lex (1991): Diferentes critérios em termos de tamanho da estação: ^{c1} 2k-10k p.e.; ^{c2} >10k p.e.; ^{c3} 10-100k p.e.; ^{c4} >100k p.e.

^d Nitrogênio total significa a soma do nirogênio Kjeldahl (N_{Org} + NH₄-N), nitrogênio nitrito e nitrato (NO_x-N).

n/d: não detectado; n/e: não especificado.

Comunidades microbianas nos grânulos

O sequenciamento de amplicons evidenciou um conjunto de populações dominantes afiliadas às famílias de *Rhodocyclaceae* (nd-39% do total de sequências lidas), *Xanthomonadaceae* (0,5-12%), *Comamonadaceae* (1,9-26%), *Chitinophagaceae* (nd-17%), *Porphyromonadaceae* (nd-29%) e *Flavobacteriaceae* (nd-15%) (Figura 32D). Todas as bactérias são capazes de produzir EPS, mas, especialmente *Rhodocyclaceae* e *Xanthomonadaceae* são conhecidos como produtores de exopolissacarídeos (ADAV; LEE; LAI, 2010; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014).

Rhodocyclaceae foram preferencialmente selecionados juntamente com o fenômeno de granulação no sistema piloto. O gênero de produção de EPS *Thauera* (ALLEN et al., 2004) foi predominante (28%) durante o pico de exopolissacarídeos sob o período de grânulos no reator (Figura 32 C-D). O gênero *Zoogloea* foi selecionado em menor grau (12%), cuja proliferação correlacionou positivamente com a granulação, assim como já observado por outro sistema LGA (WEISSBRODT et al., 2012). As *Xanthomonadaceae* (por exemplo, o gênero *Thermomonas*) foram presentes em abundâncias relativas moderadas independentemente da condição do grânulo. *Comamonadaceae* (gênero *Acidovorax*) são desnitrificantes conhecidos, semelhantes a vários membros de *Xanthomonadaceae* e *Rhodocyclaceae* (MCILROY et al., 2016; NIELSEN et al., 2012; WEISSBRODT et al., 2013a; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). As *Chitinophagaceae* (não cultivadas) pertencem à ordem *Sphingobacteriales*, cujas populações estão amplamente presentes em estações de lodo ativado, e são conhecidos por realizarem a hidrólise de macromoléculas, tais como polissacarídeos e proteínas (KIRCHMAN, 2006; NIELSEN et al., 2010). Os polissacarídeos e proteínas abundantes, formados no lodo granular no presente estudo, podem ter favorecido seu estabelecimento. Estas populações microbianas são consideradas por constituir ecossistemas de produtores e consumidores de EPS (WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). *Porphyromonadaceae*, membros da ordem *Bacteroidales*, estiveram presentes após a inoculação com lodo ativado, mas posteriormente diminuíram quando os grânulos foram estáveis, semelhante ao estudo prévio com esgoto sintético realizado por Weissbrodt et al. (2012).

Portanto, neste primeiro estudo piloto, os fenômenos de granulação-desintegração relacionaram-se com a dinâmica da razão PS/PN dos EPS e com a dinâmica das populações bacterianas

específicas. As populações afiliadas à *Rhodocyclaceae*, tais como o conhecido grupo de produtores de EPS *Thauera*, contribuíram positivamente para a estabilidade dos grânulos nas condições operacionais utilizadas para a remoção de C-N. Contudo, não foi alcançada uma granulação robusta de longo prazo para as condições aplicadas utilizando esgoto sanitário real.

Sistema experimental II (SEII)

Correlação dos EPS com a granulação

O aumento gradual da carga de carbono afluyente (0,3 a 2,0 $\text{gDQO}_{\text{acetato}} \text{ dia}^{-1} \text{ L}_R^{-1}$) durante o *start up* do SEII ocorreu durante 30 dias. Com o acúmulo progressivo da biomassa, a carga orgânica específica aumentou até 30 dias e depois se manteve em torno de 0,2 $\text{gDQO}_{\text{acetato}} \text{ dia}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$ (Figura 33A). A granulação foi conseguida em 30 dias no SEII, operado em condições bem definidas para seleção de “*Ca. Accumulibacter*” (Figura 33 B), sem a aplicação de condições de *wash out* no *start up*. A biomassa foi continuamente acumulada de 1,5 no inóculo para 8,0 $\text{g}_{\text{SSV}} \text{ L}^{-1}$ após 60 dias. Os grânulos exibiram uma distribuição de tamanho de partícula entre 200 a 310 μm de 30 a 60 dias.

Foram identificadas relações diretas entre o fenômeno de granulação e as frações de massa de exopolímeros do tipo alginato (ALE, *Alginate-like exopolymers*) (Figura 33 C). Uma produção substancial de ALE na biomassa foi alcançada, partindo de 0,16 a 0,48 $\text{g ST}_{\text{EPS}} \text{ g}^{-1} \text{ SV}_{\text{BM}}$ (0,15 a 0,31 como relação SV_{EPS}), em 60 dias. A fração em massa de exopolímeros se manteve em nível elevado de 0,46 (0,41-0,49) $\text{g ST}_{\text{EPS}} \text{ g}^{-1} \text{ SV}_{\text{BM}}$ (0,36; 0,31-0,37 como relação SV) durante mais de 100 dias adicionais de operação, com lodo granular estável. Lin et al. (2010) relataram uma fração de massa semelhante ao lodo floculento inoculado no presente estudo 0,16 $\text{gTS}_{\text{EPS}} \text{ g}^{-1} \text{ SV}_{\text{BM}}$, para ALE extraído de lodo granular de um reator piloto tratando esgoto municipal. Aparentemente, ALE é presente tanto em lodo floculento quanto em granular, porém suas características químicas e mecânicas se diferenciam e provocam diferença nas propriedades de formação de gel. Essas diferenças resultaram na capacidade de formação de gel e propriedade mecânica mais forte de ALE derivados de lodo granular em comparação com ALE de lodo floculento (LIN; SHARMA; VAN LOOSDRECHT, 2013). No estudo de Seviour et al. (2011), o aumento do tamanho das partículas (50-560 μm em 70 dias) também correlacionou-se com o enriquecimento de “*Ca. Competibacter*” e com o

EPS produzido pelo lodo de 0,05 g_{EPS} g⁻¹ TS a 0,20 g_{EPS} g⁻¹ TS. Portanto, as condições que selecionam “*Ca. Accumulibacter*” aplicadas no presente estudo, alcançaram as maiores frações de ALE que as reportadas na literatura.

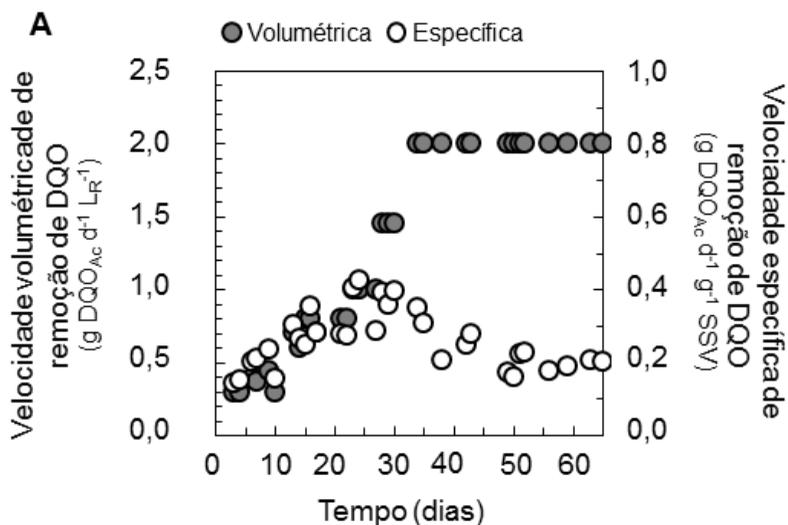
Comunidade microbiana nos grânulos

O sequenciamento de *amplicons* evidenciou um conjunto de populações dominantes afiliadas às famílias de *Rhodocyclaceae* (nd-56% do total de sequências lidas), *Flavobacteriaceae* (nd-8%), *Competibacteraceae* (0,2-9,7%), *Rhodobacteraceae* (0,2-5,9%) e *Intrasporangiaceae* (0,1-5%) (Figura 33D). Assim como no SEI, os membros da família *Rhodocyclaceae*, conhecidos como produtores de exopolissacarídeos (ADAV; LEE; LAI, 2010; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014) foram selecionados com a crescente produção de exopolímeros no SEII.

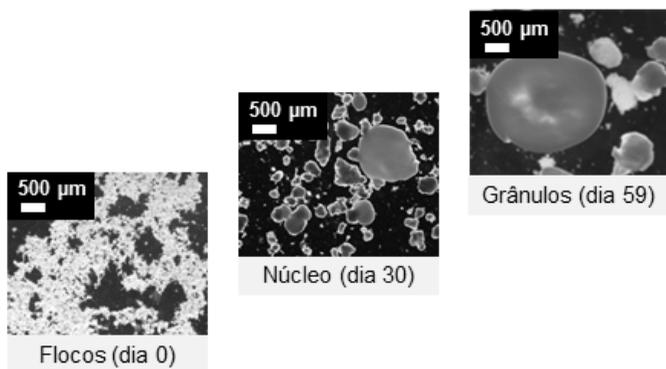
A granulação mostrou uma correlação linear ($r = 0,90$) entre o enriquecimento preferencial de “*Ca. Accumulibacter*” (membro da família *Rhodocyclaceae*) de 0,1 a 56% e a produção de exopolímeros (Figura 33). A comunidade bacteriana abrigou ainda elevada abundância das populações de *Dechloromonas* (0,1-22%) e *Propionivibrio* (n.d.-10%) dentro de *Rhodocyclaceae*, e *Flavobacterium* (0,3-8%), que acompanharam o gênero “*Ca. Accumulibacter*” durante a granulação e a produção de exopolímeros. Populações de *Tetrasphaera* (8-0,1%) e *Rhodobacter* (6-0,2%) foram predominantes no inóculo e diminuíram ao longo da operação com afluente sintético, utilizando o acetato como fonte de carbono. “*Ca. Competibacter*” (2-7%) e a linhagem candidata CPB_S60 (0,2-10%) da família *Competibacteraceae* (MCILROY et al., 2015b) foram inicialmente selecionados durante as duas primeiras semanas, mas em seguida diminuíram juntamente com o enriquecimento de “*Ca. Accumulibacter*”.

O estudo com o SEII reforça e comprova a consideração de que organismos de crescimento lento, como “*Ca. Accumulibacter*” são agentes microbianos que favorecem uma granulação robusta. Deste modo, a investigação do genoma e metabolismo biossintético deste organismo PAO modelo, para a produção de exopolímeros, é de grande interesse. Além de ser benéfico à granulação e EBPR (com possível recuperação de P), “*Ca. Accumulibacter*” pode impulsionar a biorrefinaria de exopolímeros do tipo alginato, a partir de águas residuárias.

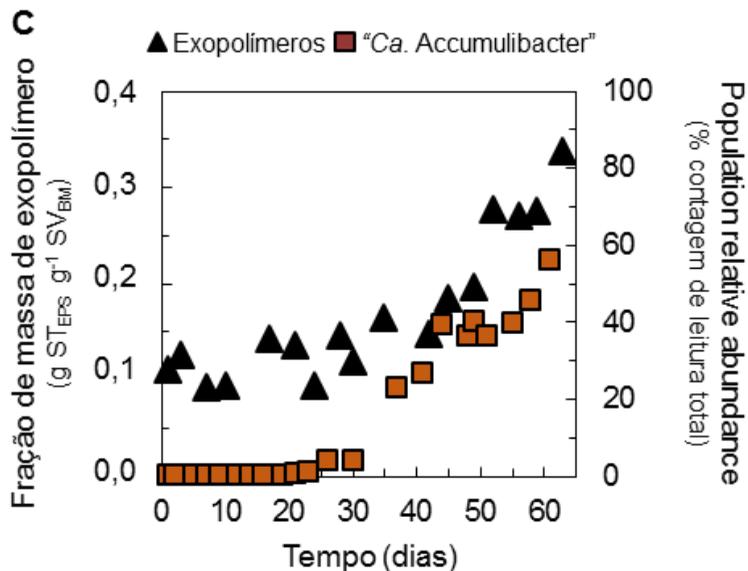
Figura 33: (A) Condições aplicadas de aumento gradual da carga orgânica volumétrica e em paralelo a evolução da carga orgânica específica; (B) Imagens digitais de estereomicroscopia mostrando a formação de bioagregados granulares.



B



Continuação Figura 33: (C) Evolução da fração de massa de EPS no lodo e a abundância relativa do gênero “*Ca. Accumulibacter*”. **(D)** *Heatmap* que exibe a composição bacteriana baseadas na região V1-V3 do gene 16S rRNA. As 10 comunidades mais abundantes foram destacadas neste *heatmap*.



D

Parentesco bacteriano mais próximo (família / gênero)		Abundância relativa (% contagem de leitura total)						
<i>Rhodocyclaceae</i>	“ <i>Ca. Accumulibacter</i> ”	0.1	0.1	0.4	3.9	22.9	40.2	56.0
<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>	0.1	0.3	0.2	2.1	11.2	21.6	12.6
<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Propionivibrio</i>	0.0	0.0	0.0	0.8	6.3	9.7	3.1
<i>Rhodocyclaceae</i>	n.a.	0.0	0.1	0.5	9.9	6.5	1.8	1.7
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>	0.3	0.0	0.3	1.4	4.4	4.8	8.3
<i>Competibacteraceae</i>	<i>CPB_S60</i>	0.2	0.7	9.5	9.7	4.7	1.3	0.8
<i>Competibacteraceae</i>	“ <i>Ca. Competibacter</i> ”	2.8	6.7	5.3	4.1	3.3	1.6	1.9
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter</i>	5.9	4.9	4.0	3.3	1.1	0.2	0.2
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Tetrasphaera</i>	5.0	7.5	6.8	3.8	0.7	0.1	0.1

Tempo (dias)

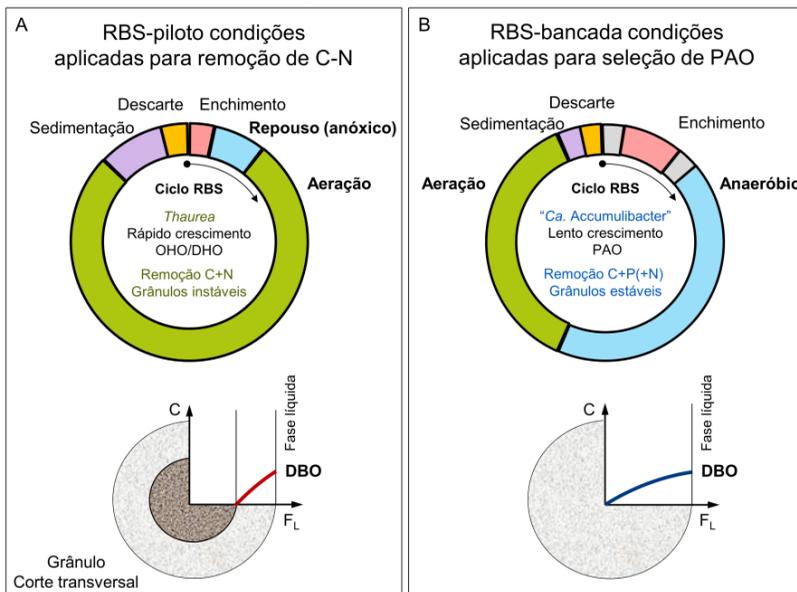
4.3.4 Discussão

O experimento em escala piloto (SEI) mostrou que a granulação em condições para remoção de C-N está interligada à seleção preferencial de populações da linhagem *Rhodocyclaceae*, principalmente do gênero *Thauera* e em menor grau *Zoogloea*. Desta forma, o conhecimento fisiológico na produção de EPS por estes microorganismos pode ajudar a melhorar as condições operacionais para manter os grânulos no sistema. No entanto, as observações de ambos os processos em escala de bancada (SEII) e piloto (SEI) esclareceram que a presença de apenas *Thauera* e *Zoogloea*, organismos de crescimento rápido, não é suficiente para garantir um processo estável. Outras populações da mesma família de *Rhodocyclaceae*, porém de crescimento mais lento, como o gênero "*Ca. Accumulibacter*", proporcionam uma melhor formação de bioagregados compactos e estáveis. Portanto, *Rhodocyclaceae* é uma família de grande importância na produção de EPS nos sistemas LGA, mas os gêneros fazem a diferença na estabilidade dos bioagregados.

A coesão dos grânulos está ligada ainda ao fornecimento de substrato através da profundidade do biofilme. O rápido consumo de substrato nas camadas externas (aeróbias ou anóxicas) do biofilme por organismos de crescimento rápido, como os OHO, conduzirá à limitação de substrato nos núcleos dos grânulos, tornando-os mais susceptíveis à desintegração (Figura 34 A). Por outro lado, a seleção preferencial para organismos de crescimento lento conduzirá ao consumo mais lento e a uma penetração mais longa do substrato orgânico no interior de grânulos (Figura 34 B). Portanto, as condições que selecionam os organismos de crescimento lento e previnam a proliferação das populações de crescimento rápido são cruciais para manter um forte estado de agregação. A operação do reator para apenas remoção de C-N do esgoto sanitário não foi uma solução sustentável para o processo de lodo granular (Figura 34A). Embora a granulação tenha sido alcançada no tratamento de esgoto sanitário de baixa carga em clima subtropical, atendendo às legislações ambientais, o biofilme granular não foi estável em uma operação em longo prazo. Dessa forma, condições operacionais que selecionem corretamente os organismos de crescimento lento (por exemplo, PAO, mas também GAO, nitrificantes, anammox) devem ser utilizadas na perspectiva de se conseguir uma intensificação bem-sucedida do processo de BNR e a estabilidade do lodo granular (Figura 34B). A concepção de uma operação anaeróbia-aeróbia que funcione bem, combinando as características do esgoto sanitário e clima local, é

um importante fator para selecionar PAO como pré-requisito para uma granulação robusta, enquanto permite a BNR completa.

Figura 34: Condições operacionais, seleção bacteriana e estabilidade dos grânulos. **(A)** As condições aplicadas em escala piloto apenas para remoção de C-N levaram à formação de grânulos dominados por organismo heterotrófico de rápido crescimento (OHO/DHO), com predominância do gênero desnitrificante *Thauera*. Porém, estes grânulos não permaneceram estáveis ao longo do tempo e desintegraram-se. **(B)** O estudo em escala de bancada enfatizou que a aplicação de um seletor anaeróbio bem controlado favorece a granulação por PAO de crescimento mais lento, predominantemente do gênero "*Ca. Accumulibacter*". Os grânulos dominados por PAO eram robustos e abrigavam uma fração substancial de exopolímeros.



4.3.5 Conclusões

Grânulos, formados em um RBS piloto, com ciclos predominantemente aeróbios, alimentado com esgoto sanitário para remoção de carbono e nitrogênio (SEI), não foram suficientemente fortes para uma operação em longo prazo e se desintegraram. Os grânulos fofos formados predominantemente por OHO/DHO da família *Rhodocyclaceae* (gêneros *Thauera* e *Zoogloea*) demonstraram substancial relação com a produção da matriz EPS, mas que não trouxe

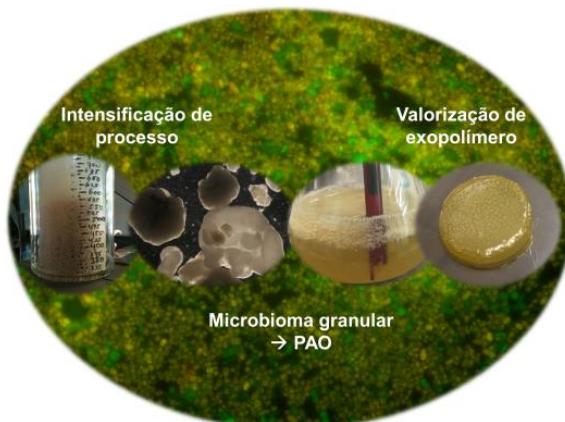
estabilidade suficiente ao biofilme granular. A hipótese para a instabilidade é devida ao rápido consumo de substrato por estes organismos, causando uma menor penetração de substrato no grânulo.

No estudo no RBS em escala de bancada (SEII), operando em ciclos com fases anaeróbio-aeróbias, proporcionando condições para o enriquecimento de PAO, foram formados grânulos compactos, robustos e duradouros, formados predominantemente pelo gênero “*Ca. Accumulibater*”. Observou-se alta correlação com a produção de EPS, que trouxe estabilidade ao biofilme granular. O lento consumo do substrato por esses organismos, proporcionando maior penetração no interior do grânulo, pode também explicar a qualidade do grânulo formado.

Portanto, os processos robustos de lodo granular devem ser direcionados para condições de seleção de PAO, independentemente se o tratamento objetiva somente a remoção de C-N. Além da importância destes micro-organismos para granulação estável e completa BNR, elevadas quantidades de exopolímeros com alto valor agregado (ALE) podem ser produzidas em lodos granulares sob tais condições.

Como principal resultado para a ciência e prática de sistemas de lodo granular e biorrefinaria, este trabalho enfatiza como a seleção para PAO de crescimento lento promove múltiplos benefícios. As vantagens estão desde a intensificação do processo por meio da estabilização do lodo granular e remoção de fósforo (e sua possível recuperação), até à captura de carbono com a valorização dos exopolímeros.

4.4 RECUPERAÇÃO DE EXOPOLÍMERO DO TIPO ALGINATO DE LODO GRANULAR FORMADO POR PAO: “DO LODO RESIDUAL A UM PRODUTO VALORIZADO”⁴.



A tecnologia de lodo granular é utilizada no tratamento de esgoto com a intensificação da remoção biológica de nutrientes e a decantação secundária em uma única unidade operacional. Os lodos granulares sustentam a biorrefinaria de

exopolímeros de alto valor agregado, que se comportam como o material alginato (*Alginate-like exopolymer* – ALE), a partir da matéria orgânica poluente do esgoto. Os organismos acumuladores de polifosfato de crescimento lento (PAO) são essenciais para remover o fósforo e estabilizar os grânulos. Portanto, no presente estudo objetivou-se investigar se as PAO podem desencadear a produção de exopolímeros. Para este fim, um reator operado em bateladas sequenciais de bancada (2,4 L) foi operado durante 5 meses sob condições de granulação e de seleção de PAO. As adaptações no afluente, como o aumento na carga orgânica (gradual), na razão C:P (de 8-16 g DQO g⁻¹ P) e na razão Ca:Mg (de 0,37-1 mol Ca mol⁻¹ Mg), levaram à elevada seleção de PAO (55 ± 15%, máximo 83%), especialmente o gênero “*Ca. Accumulibacter*”, e sustentaram uma substancial fração de ALE no lodo granular (0,48-0,53 g ST_{ALE} g⁻¹ SV_{bm} ou 0,30-0,40 com relação à SV-ALE). O exopolímero extraído do lodo granular enriquecido com PAO foi avaliado em termos de

⁴ A versão resumida deste trabalho foi selecionada para apresentação oral, no “10th International Conference on Biofilm Reactors”, que será realizado em Dublin, Irlanda, em maio, 2017. Os resultados apresentados neste subitem fazem parte de artigo em fase de redação que será submetido para um periódico internacional.

L. B. Guimarães*, N. Gubser, Y. Lin, J. Zlópasa, M. Albertsen, R. H. R. da Costa, P. H. Nielsen, M. C. M. van Loosdrecht, D. G. Weissbrodt*. Alginate-Like Exopolymer Recovery from Granular Sludge Biofilm Reactor under Conditions Selecting for Slow-Growing PAOs. *Equal contribution

Recuperação de exopolímero do tipo alginato de lodo granular formado por PAO: “do lodo residual a um produto valorizado”

decomposição térmica e formação de gel. Análises químicas do exopolímero revelaram sua composição em polissacarídeos (6%), proteínas (31%), material inorgânico (23-24%) e outros (40%). Porém, o teor de polissacarídeos foi subestimado pelo método fenol-sulfúrico, e a presença de glucosamina, por exemplo, foi confirmada por HPAE-PAD. A espectroscopia de Raman indicou a presença de picos de proteínas e polissacarídeos, incluindo blocos manurônicos (monômero típico de alginato). No geral, esta complexa matriz de macromoléculas e material inorgânico conferiu ao exopolímero um comportamento típico de alginato, com características de um hidrogel. Este estudo enfatiza o forte potencial de PAO para estimular a recuperação de exopolímeros de reatores de lodos granulares.

ALGINATE-LIKE EXOPOLYMER RECOVERY FROM GRANULAR SLUDGE ENRICHED WITH PAO: “FROM RESIDUAL SLUDGE TO A VALORIZED PRODUCT”

Granular sludge technology is used in sewage treatment with the enhancement of biological nutrient removal and secondary decantation in a single operating unit. The granular sludge supports the biorefinery of high-value exopolymers, which behave as alginate material, from the polluting organic matter sewage. Slow-growing polyphosphate accumulating organisms (PAO) are essential for phosphorus removal and granules stability. Therefore, the present study aimed to investigate whether PAO can trigger exopolymers production. For this purpose, a reactor operated in sequencing batches (2,4L) was operated for 5 months under conditions for granulation and PAO selection. Adaptations in the affluent, such as the increase in organic load (gradual), C:P ratio (8-16 gCOD gP⁻¹) and Ca:Mg ratio (0,37-1molCa molMg⁻¹) led to high selection of PAO (55 ± 15%, maximum 83%), especially the genus "*Ca. Accumulibacter*" and sustained a substantial fraction of ALE in the granular sludge (0,48-0,53 g_{TS,ALE} g_{VS,bm}⁻¹ or 0,30-0,40 related to VS-ALE). The exopolymer extracted from PAO-enriched granular sludge was evaluated in terms of thermal decomposition and gel formation. Chemical analyzes of the exopolymer revealed its composition in polysaccharides (6%), proteins (31%), inorganic material (23-24%) and others (40%). However, the content of polysaccharides was underestimated by the phenol-sulfuric method, and the presence of glucosamine, for example, was confirmed by HPAE-PAD. Raman spectroscopy indicated the presence of protein and polysaccharides peaks, including manuronic blocks (typical alginate monomer). In general, this complex matrix of macromolecules and inorganic material gave the exopolymer a typical behavior of alginate, with the characteristics of a hydrogel. This study emphasizes the strong potential of PAO to stimulate the exopolymers recovery from granular sludge reactors.

4.4.1 Introdução

Os reatores de lodo granular se encontram, atualmente, no alicerce dos processos de biofilme no contexto da recuperação da água, recursos e energia (VAN LOOSDRECHT; BRDJANOVIC, 2014). O potencial tecnológico dos biofilmes granulares foi inicialmente estabelecido pela produção de bioenergia em reatores anaeróbios de alta taxa. Os biofilmes granulares aeróbios podem impulsionar a intensificação da remoção biológica de nutrientes (*biological nutrient removal* - BNR) e a decantação secundária em uma única unidade de processo. Além disso, os grânulos de BNR mostraram constituir-se por exopolímeros que se comportam como biomateriais do tipo alginato (*alginate-like exopolymer* – ALE) (LIN et al., 2010). Deste modo, esta nova geração de reatores de biofilme ocasiona novas abordagens no uso de resíduos, transformando-os em recursos.

Os biofilmes granulares contituem-se por um emaranhado de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), tanto de origem protéica quanto polissacarídica, como resultado da diversidade de populações microbianas que compõem os agregados (WEISSBRODT et al., 2013a). Dentre outros, os grânulos particularmente contém exopolissacarídeos com ligações 1,3- β ou 1,4- β , semelhantes aos alginatos bacterianos e que conferem propriedades de gelificação e integridade às estruturas do biofilme granular (LIN et al., 2010; SEVIOUR et al., 2009b).

Do ponto de vista microbiológico, sugere-se a seleção de organismos acumuladores de polifosfatos (PAO) e de glicogênio (GAO), os quais formam microcolônias compactas, para a estabilidade do sistema de lodo granular (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). Os PAO de crescimento lento, como o gênero modelo de PAO "*Candidatus Accumulibacter*", são primordiais para a remoção de fósforo de águas residuárias. Desta forma, esta população é hipotetizada aqui por exibir qualidades metabólicas na biossíntese de exopolímeros coesos e firmes. Conseqüentemente, os PAO podem sustentar quatro objetivos para a BNR: remoção e recuperação de fósforo, granulação da biomassa e valorização de exopolímero.

Dentro deste contexto, surge a seguinte questão: “*exopolímeros do tipo alginato podem ser recuperados de grânulos enriquecidos por PAO de crescimento lento?*” Portanto, o objetivo do presente trabalho foi elucidar se PAO podem desempenhar um papel significativo na produção de exopolímeros do tipo alginato (ALE) dentro do microbioma de reatores de lodo granular. As relações entre condições operacionais,

seleção bacteriana, formação de biofilme granular e produção de exopolímeros foram especificamente investigadas. Para este fim, o presente estudo faz o uso da combinação da engenharia de processo de biofilme, da ecologia microbiana e de técnicas analíticas para verificar o comportamento físico e a composição química dos exopolímeros.

4.4.2 Materias e métodos

Granulação sob condições de seleção de PAO⁵

Um reator em coluna operado em bateladas sequenciais (RBS) de 2,4 L foi inoculado com lodo floculento de uma ETE-BNR, localizada em Delft, Países Baixos, e alimentado com acetato como única fonte de carbono. O RBS foi operado para selecionar PAO em ciclos de 6 h, com alternadas fases anaeróbia-aeróbia, sendo: 5 min de fluxo de nitrogênio gasoso, 15 min de alimentação em fluxo ascendente, 5 min de fluxo de nitrogênio gasoso, 150 a 175 min de mistura anaeróbia, 150 min de mistura aeróbia, 30 a 5 min de sedimentação (adaptada com a formação da biomassa) e 5 min de descarte de efluente (troca volumétrica de 50%) (WEISSBRODT et al., 2014). A avaliação da dinâmica de formação do exopolímero foi realizada durante 5 meses, sendo que no primeiro mês (*start-up*) houve um aumento gradual da carga orgânica volumétrica (OLR) de 0,3 para 2,0 g DQO_{Acetato} d⁻¹ L_R⁻¹ visando garantir uma completa absorção anaeróbia de compostos orgânicos, enquanto que as razões de nutrientes foram mantidas inicialmente constantes em 8 gDQO gP⁻¹ e 20 gDQO g⁻¹NH₄. O tempo de retenção de lodo (RTL) foi mantido em 20 ± 5 dias e adicionou-se alitioureia (ATU) a fim de bloquear a nitrificação.

Análise da seleção de PAO e da dinâmica das populações bacterianas

O acúmulo de biomassa granular no reator foi medido via análises de sólidos, utilizando o *Standard Methods* (AWWA; APHA; WEF, 2012). A seleção e a atividade de PAO foram acompanhadas por análises de acetato, fosfato e condutividade, efetuadas por HPLC (Biorad, EUA), kits de ensaio fotométrico (kits 348, 349, 350, Hach, Alemanha) e por um condutivímetro em tempo real (Consort, Bélgica)

⁵ Neste estudo, foi utilizado o sistema experimental II (SEII), o qual está detalhado no item 3 e no Apêndice A.

Recuperação de exopolímero do tipo alginato de lodo granular formado por PAO: “do lodo residual a um produto valorizado”

(WEISSBRODT et al., 2014), respectivamente. A dinâmica da comunidade bacteriana foi caracterizada em alta resolução por sequenciamento de nova geração. A região hipervariável V1-V3 do gene 16S rRNA foi amplificada por PCR de acordo com o manual MIDAS (ALBERTSEN et al., 2015; MCILROY et al., 2015a) e os *amplicons* foram sequenciados utilizando um sequenciador MiSeq (Illumina, EUA). As abundâncias relativas das comunidades microbianas específicas foram expressas como porcentagem da contagem de leitura do sequenciamento total.

As análises de FISH 16S rRNA foram realizadas para validar as mudanças das populações microbianas predominantes (PAO, GAO e populações acompanhantes) identificadas no sequenciamento. As células foram fixadas, imobilizadas e hibridizadas de acordo com a prática padrão (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; NIELSEN et al., 2009). Todas as eubactérias foram hibridizadas com o conjunto de sonda EUB338 (AMANN et al., 1990). "*Ca. Accumulibacter*" foi alvo utilizando o conjunto de sondas PAOmix PAO462, PAO651 e PAO846 (CROCETTI et al., 2000b). As análises de PAO foram ainda refinadas utilizando apenas a sonda PAO651, uma vez que outros PAO462 e PAO846 hibridizam com outras linhagens estreitamente relacionadas (ALBERTSEN et al., 2016). Outras PAO foram avaliadas utilizando as sondas TET1-266 e DECHLO2, para os organismos *Tetrasphaera* e *Dechloromonas*, respectivamente. Para a detecção dos GAO, foi utilizado o conjunto de sondas GAOmix (GAO_Q431 e GAO_Q989) para a detecção do gênero "*Ca. Competibacter*" e a sonda CPB_654 para a família *Competibacteraceae* (CROCETTI et al., 2002). Os detalhes das sondas utilizadas se encontram na Tabela 3, item 3. As lâminas de microscopia foram analisadas utilizando um microscópio de epifluorescência Axioplan 2 (Zeiss, Alemanha).

Análise da dinâmica e da composição de ALE

A extração físico-química dos exopolímeros produzidos no lodo granular foi realizada sob condições alcalinas (pH ~ 10), alta temperatura (80 ° C) e agitação mecânica (400 rpm) para dissolução completa das matrizes. Em seguida, o exopolímero foi precipitado em condições ácidas (pH ~ 2,5), liofilizado e pesado (FELZ et al., 2016; LIN et al., 2010). A fração de massa de ALE no lodo foi calculada de acordo com a equação 27 descrita no item 3.

A decomposição térmica e as frações inorgânicas e voláteis de sólidos nos exopolímeros foram medidas por análise de

termogravimetria (*thermogravimetric analysis* – TGA). Uma quantidade de cerca de 5 mg das amostras de ALE ácido liofilizado foi colocada em cadinho de cerâmica, o qual foi disposto no analisador térmico (STA 449 F3 Jupiter, Netzsch, Alemanha). A temperatura de aquecimento máxima foi de 700 °C, com uma velocidade de aquecimento de 5 K min⁻¹ e sob atmosfera de ar como gás protetor. A propriedade de formação de gel foi testada pela adição de solução de CaCl₂ a 2% (m/v) no ALE (LIN; SHARMA; VAN LOOSDRECHT, 2013). O ALE ácido fresco (sem ser congelado e liofilizado) foi dissolvido por adição de NaOH a 0,5 mol L⁻¹ até atingir pH final de 8, em seguida vertido em uma placa de Petri de 2,5 cm e seca em temperatura ambiente (20 °C) para formar uma película fina e conferir a propriedade de formação de filme (ZLOPASA et al., 2015).

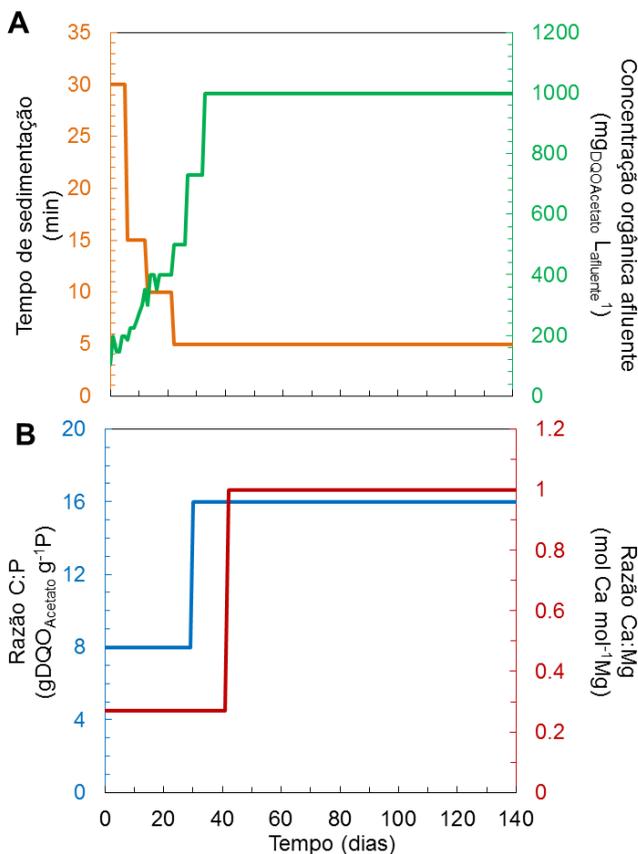
A presença de polissacarídeos na composição química dos extratos de exopolímeros foi verificada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) utilizando glicose como solução padrão. Além desta técnica, a composição de açúcares foi analisada por cromatografia de troca iônica de alto desempenho (*high performance anion exchange* – HPAE) equipado com coluna Carbopac Pa20 e detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD, Dionex, EUA). Antes das amostras serem analisadas por HPAE-PAD, a forma ácida de ALE passou por diálise e hidrólise (ZHANG et al., 2012). As proteínas presentes no ALE foram verificadas pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976) e BCA (bicinchoninic acid assay) seguindo as instruções do kit (Interchim, França). Além disso, a detecção de proteínas foi testada por eletroforese em gel de poli(acrilamida) ou PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*), onde as amostras separam-se com a adição do detergente SDS (*sodium dodecyl sulfate*), sendo a técnica habitualmente conhecida por SDS-PAGE. As variações nas composições químicas globais dos exopolímeros foram medidas por espectroscopia Raman, a qual atinge a amostra com uma fonte de laser, espalhando luz em diferentes frequências dependendo do material. Amostras de grânulos enriquecidos em “*Ca. Accumulibacter*” foram enviadas ao Centro Helmholtz em pesquisa ambiental, Departamento de Ecologia de Rios, Magdeburg, Alemanha, para avaliar a presença de glicoconjugados através da análise de fluorescência de ligação por lectina (*fluorescence lectin-binding analysis* – FLBA) (STAUDT et al., 2003; ZIPPEL; NEU, 2011). As análises FLBA realizada com o auxílio de um microscópio confocal (FLBA-CLSM) foram conduzidas seguindo o protocolo desenvolvido para amostras de lodo granular por Weissbrodt et al. (2013a).

4.4.3 Resultados e discussões

Adaptação das condições experimentais do reator para a granulação e seleção de PAO

O reator RBS de bancada (2,4 L) foi operado durante 140 dias em condições para a granulação e seleção de PAO. Para isso, logo após a inoculação com lodo ativado flocofento, o tempo de sedimentação e a carga orgânica volumétrica foram manualmente adaptados. O tempo de sedimentação foi gradualmente diminuído (30-5 min) a fim de prevenir a lavagem da biomassa. A concentração orgânica afluyente foi progressivamente aumentada de modo a garantir o consumo completo do acetato na fase anaeróbia (Figura 35 A). A composição do afluyente foi adaptada pela alteração da relação C:P e Ca:Mg para melhorar a produção de ALE (Figura 35 B). Inicialmente, a aplicação de um maior teor de fósforo, com proporção DQO:P de 8 g DQO_{Acetato} g⁻¹ P, foi o critério para a seleção de PAO (WEISSBRODT et al., 2014). No dia 30, a razão COD:P foi alterada para 16 g DQO_{Acetato} g⁻¹ P, com a diminuição da porção de fósforo, uma vez que foi relatado que razões mais elevadas de DQO:P conduzem a grânulos maiores, com conseqüente aumento na produção de ALE (LIN; LIU; TAY, 2003). Ainda para estimular essa produção, o teor de cálcio foi aumentado no dia 42 de uma razão de 0,37 para 1,00 g Ca g⁻¹ Mg, uma vez que o cálcio atua como agente ligante entre as cadeias de polissacarídeos, proporcionando as características de formação de gel (BRACCINI; GRASSO; PÉREZ, 1999).

Figura 35: Condições operacionais aplicadas no RBS. **(A)** Gradual aumento na concentração de carbono orgânico afluyente e diminuição no tempo de sedimentação; **(B)** Adaptações realizadas nas razões C:P e Ca:Mg.



Evolução da biomassa

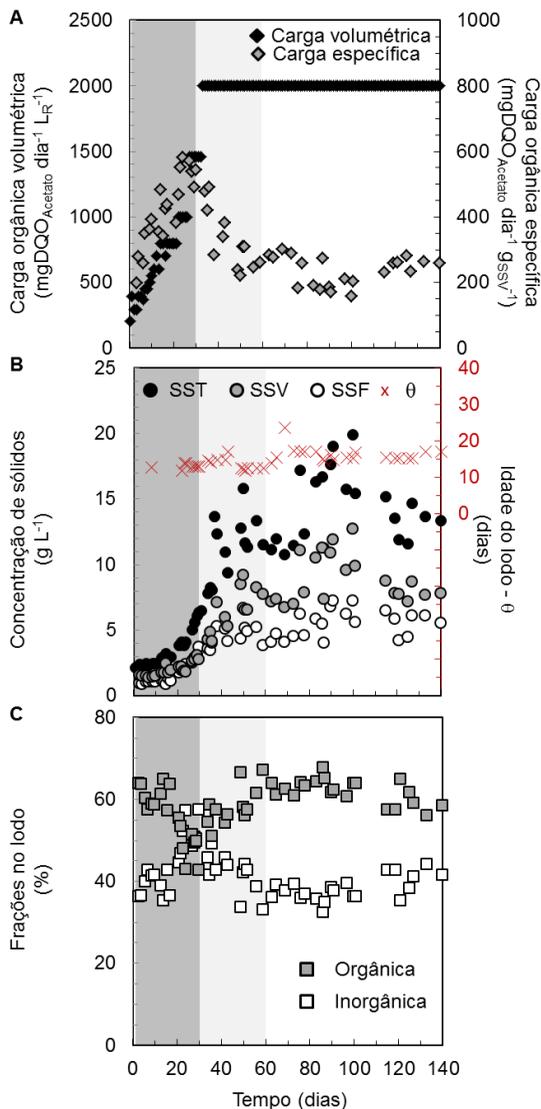
A adaptação das cargas orgânicas (volumétrica e específica), e a evolução da composição da biomassa no RBS podem ser visualizadas pela Figura 36. Com o aumento gradual da concentração afluyente de carbono, as cargas orgânicas volumétrica e específica aumentaram progressivamente de 204 a 2000 mg DQO_{Acetato} d⁻¹ L_R⁻¹ e de 138 a 544 mg DQO_{Acetato} dia⁻¹ g_{SSV}⁻¹ nos primeiros 30 dias, respectivamente. A partir deste período, a carga volumétrica foi constantemente regulada em 2000 mgDQO_{Acetato} dia⁻¹ L_R⁻¹, porém em função do crescimento da

Recuperação de exopolímero do tipo alginato de lodo granular formado por PAO: “do lodo residual a um produto valorizado”

biomassa, a carga orgânica específica diminuiu até 260 mg DQO_{Acetato} dia⁻¹ g⁻¹ SSV e depois se manteve com média de 237 ± 44 mg DQO_{Acetato} dia⁻¹ g⁻¹ SSV (Figura 36 A).

Quanto à evolução da biomassa (Figura 36 B), partindo da inoculação, a concentração inicial de biomassa no reator foi de 1,5 g SSV L⁻¹ (2,0 g SST L⁻¹), a qual ocupou a altura máxima da cama de lodo de 41 cm (correspondente ao ponto de retirada do efluente). Durante os primeiros 10 dias de operação, com um tempo de sedimentação de 30 min, a concentração de biomassa permaneceu em um nível constante de 1,4 g SSV L⁻¹ (2,3 ± 0,06 g SST L⁻¹) e se compactou passando de 41 cm para 7 cm de altura de cama de lodo. A partir do dia 10 até ao dia 30, nota-se um aumento de 3 vezes nos sólidos totais chegando a 6,3 g SST L⁻¹, com incremento também triplicado na fração inorgânica (1,0-3,6 g SSF L⁻¹), enquanto a fração orgânica duplicou-se (2,7 g SSV L⁻¹). Em termos de porcentagem, os sólidos totais no reator variaram de 41 a 57 % de material inorgânico e de 59 a 43 % de orgânico (Figura 36C). Entre os dias 30 e 60, a concentração de sólidos no reator duplicou até 11,5 g SST L⁻¹, com aumento apenas da biomassa (7,7 g SSV L⁻¹, 3,8 g SSF L⁻¹), resultando na elevação da fração orgânica (67 %) e decréscimo na fração inorgânica (33 %) do lodo neste período (Figura 36 B-C). A partir do dia 60, observou-se a estabilização da biomassa até o fim do período monitorado (dia 140), com médias de 14 ± 3 g SST L⁻¹, 5 ± 1 g SSF L⁻¹, 9 ± 2 g SSV L⁻¹, 38 ± 3 % (fração inorgânica) e 62 ± 3 % (fração orgânica). A idade do lodo foi mantida em média de 16 ± 5 dias, controlada pela retirada de lodo para amostragens (Figura 36 B).

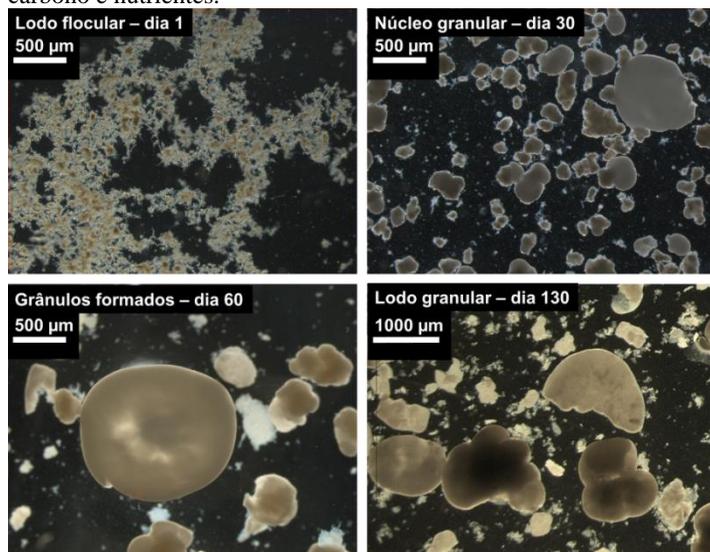
Figura 36: (A) Evolução da carga orgânica volumétrica e específica no sistema e (B) da biomassa; (C) composição orgânica e inorgânica da biomassa ao longo do tempo. **Área cinza escuro:** *start-up* antes da adaptação de C:P de 8 para 16 m/m do dia 30; **Área cinza claro:** período onde ocorreu a adaptação da razão Ca: Mg de 0,37 para 1 mol/mol no dia 42. **Área branca:** período sem ajustes operacionais.



Granulação

A evolução dos grânulos a partir dos flocos de lodo ativado foi acompanhada por meio de um estereomicroscópio. Os primeiros núcleos granulares foram observados nos primeiros 30 dias de operação (diâmetro médio de 200 μm) (Figura 37). Após 60 dias, grânulos compactos e com estruturas bem regulares foram observados com diâmetro médio de 310 μm , os quais se mantiveram estáveis no reator durante todo o restante do período experimental. A formação de uma densa biomassa granular com ótima sedimentabilidade ($IVL_5 = 26,7 \text{ mL g}_{\text{SSV}}^{-1}$) foi conseguida pelo emprego da força de cisalhamento (2 cm s^{-1}), sem a utilização da técnica de *wash-out*. Este estudo confirmou o mecanismo de granulação espontânea sob condições de enriquecimento de “*Ca. Accumulibacter*”, fenômeno já observado anteriormente sob condições semelhantes de seleção de PAO com grânulos de tamanhos similares ($<500 \mu\text{m}$) (WEISSBRODT et al., 2013a). Lin; Liu e Tay, (2003) notaram diminuição no tamanho das partículas (1,7 a 0,5 mm) com o decréscimo na razão C:P (100-10 g DQO g^{-1} P), obtendo tamanhos de agregados próximos (420 μm) com razão C:P semelhante à utilizada no presente estudo (10 g DQO g^{-1} P). Grânulos maiores ($\sim 1000 \mu\text{m}$) foram encontrados em outros estudos (BARR; COOK; BOND, 2010; DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004; SEVIOUR et al., 2011). De Kreuk e van Loosdrecht, (2004) observaram aumento no tamanho dos grânulos (de 1,1 para 1,6 mm) quando deixaram de acrescentar ATU, permitindo o crescimento de organismos nitrificantes e desnitrificantes nos grânulos. No presente estudo, a ATU foi acrescentada durante todo o experimento. O regime de enchimento e a fase anaeróbia aplicada na configuração do ciclo também podem interferir no tamanho dos grânulos. Quando é aplicado o enchimento ascensional lento como fase anaeróbia, os grânulos localizados na parte inferior da biomassa sedimentada recebem maior quantidade de carbono, resultando em diâmetros maiores dos agregados (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004).

Figura 37: Evolução da formação dos grânulos a partir de lodo flocculento de uma ETE municipal de Delft, Países Baixos, operada para completa remoção de carbono e nutrientes.

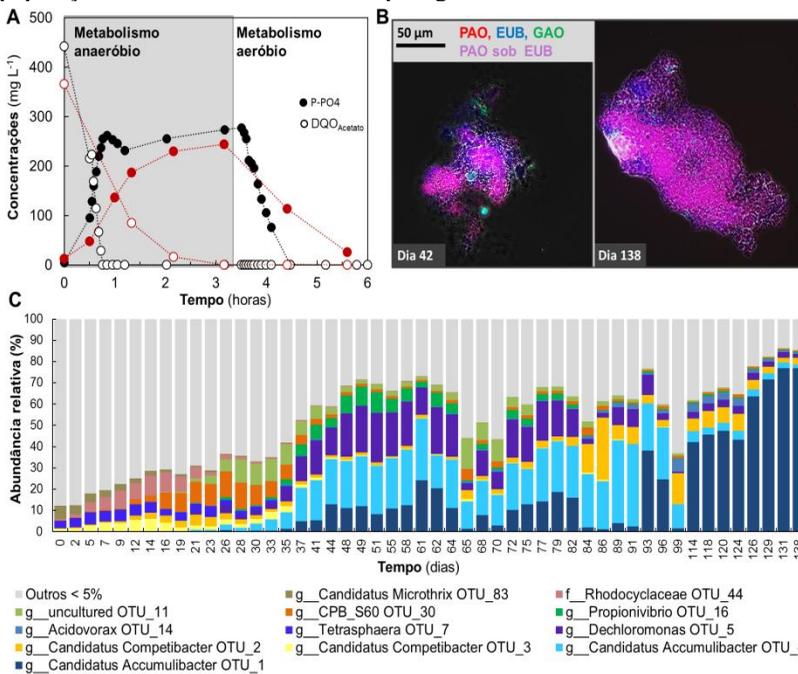


Enriquecimento de PAO

O enriquecimento de PAO foi acompanhado com as medições de orto-fosfato e acetato durante o ciclo operacional. O consumo total do acetato na fase anaeróbia misturada foi assegurado durante todo o período experimental. O comportamento típico de PAO, com a liberação de orto-fosfato e consumo de acetato em fase anaeróbia ($Y_{PO4/C_{Acet}} = 0,25 \text{ mol P-PO}_4 \text{ mol}^{-1} C_{Acet}$, dia 4) com posterior consumo do fosfato aerobiamente, foi observado desde o início da operação, uma vez que o lodo inoculado é proveniente de uma estação EBPR. Na Figura 38A têm-se dois ciclos típicos com atividade EBPR (dias 30 e 138), nos quais ocorrem a concomitante liberação de orto-fosfato e consumo de acetato. Nota-se a intensificação da atividade EBPR ao longo do tempo, uma vez que no dia 30 a velocidade volumétrica de liberação de orto-fosfato com consumo de acetato foi menor ($62 \text{ mg P h}^{-1} L_R^{-1}$ e $116 \text{ mg DQO}_{Acet} \text{ h}^{-1} L_R^{-1}$) quando comparada com a do ciclo no dia 138 ($210 \text{ mg P } L_R^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $283 \text{ mg DQO}_{Acet} L_R^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Recuperação de exopolímero do tipo alginato de lodo granular formado por PAO: “do lodo residual a um produto valorizado”

Figura 38: Evolução do enriquecimento de PAO. (A) Típico ciclo EBPR com liberação de orto-fosfato e consumo de DQO e posterior consumo do orto-fosfato. Ciclos dos dias 30 e 138, em vermelho e preto, respectivamente. **Área cinza:** Fase de enchimento (0,25 h) + injeção de gás N₂ (0,16 h) + fase anaeróbia misturada (2,92 h). **Área branca:** fase aeróbia com OD em 50%. (B) Imagens de FISH dos dias 42 e 138. A sonda PAOMix foi utilizada específica para “*Ca. Accumulibacter*” marcada com Cy3 (vermelha), GAOmix específica para “*Ca. Competibacter*” com fluos (verde) e EUB338mix para todas as bactérias com Cy5 (azul). (C) Abundâncias relativas (acima de 5%) das populações microbianas identificadas pelo gene 16S rRNA.



Considerando o aumento da biomassa no reator, as velocidades específicas ficaram próximas, com 23 mg P h⁻¹ g⁻¹ SSV e 43 mg DQO_{Acet} h⁻¹ g⁻¹ SSV no dia 30, e 27 mg P h⁻¹ g⁻¹ SSV e 37 mg DQO_{Acet} h⁻¹ g⁻¹ SSV no dia 138. Porém, mesmo que as velocidades específicas estejam próximas, o coeficiente de liberação de orto-fosfato e consumo de acetato ($Y_{PO_4/C_{Acet}}$) aumentou ao longo do tempo, chegando a 0,55 e depois a 0,76 mol P-PO₄ mol⁻¹ C_{Acet} no dia 30 e 138, respectivamente. Estes coeficientes obtidos para a liberação e consumo de ortofosfato indicaram o estabelecimento e a intensificação da atividade de PAO no sistema. Resultados semelhantes foram obtidos em sistemas para

enriquecimento de PAO utilizando acetato como fonte de AGV ($0,64 \text{ mol}_{\text{P-PO}_4} \text{ mol}_{\text{C,Acet}}^{-1}$), enquanto valores mais baixos de $Y_{\text{PO}_4/\text{C,Acet}}$ foram encontrados quando o proprionato foi a fonte de carbono ($0,35 \text{ mol P-PO}_4 \text{ mol}^{-1} \text{ C}_{\text{Acet}}$) (WEISSBRODT et al., 2013b). A captação e o armazenamento de acetato com a degradação do poli-fosfato são mecanismos acoplados um ao outro na célula devido às limitações metabólicas e, portanto, a razão entre eles deveria ser constante (JENKINS; TANDOI, 1991). No entanto, os dados da literatura mostram variações ($0,25$ a $0,75 \text{ mol P mol}^{-1} \text{ C}$) para esta razão, as quais foram fortemente influenciadas pelo pH do meio (SMOLDERS et al., 1994; WEISSBRODT et al., 2013b). O pH no presente estudo foi controlado em 7,5, mas outros fatores como as razões C:P e Ca:Mg modificadas nos dias 30 e 42, respectivamente, podem ter influenciado no pH afluente e nas comunidades microbianas, aumentando a atividade de PAO e consequentemente o $Y_{\text{PO}_4/\text{C,Acet}}$.

As análises de FISH demonstraram aumento das células hibridizadas com a sonda PAOmix e diminuição das células coradas com GAOmix ao longo do período experimental. A Figura 38B traz imagens dos dias 42 e 138, que representam esta mudança na comunidade microbiana. No dia 42, é possível observar manchas verdes referentes aos GAO, fortes competidores aos PAO nas condições operacionais aplicadas, enquanto que no dia 138 foram observados raros pontos verdes. Ainda no dia 42, nota-se maior área azul ao redor do floco quando comparada com o dia 138, representando outras comunidades que não PAO e GAO. Estes resultados demonstram o enriquecimento de PAO no presente sistema.

Os resultados de sequenciamento de *amplicon* de nova geração baseado no gene 16S rRNA (Figura 38C) revelaram que no primeiro mês de *start-up* houve uma considerável seleção do gênero *CPB* (0,8-17% da contagem total de leitura) e “*Ca. Competibacter*” (3-11%), os quais são GAO. Entre o dia 1 e o dia 30 a atividade de PAO pode ser atribuída ao gênero *Tetrasphaera*, o qual se mostrou abundante neste período (4-9,5%). *Tetrasphaera* pode ser considerada como PAO e são geralmente detectadas em estações reais EBPR, apresentando metabolismo de fermentação de glicose diferentemente das “*Ca. Accumulibacter*” (KRISTIANSEN et al., 2013; WEISSBRODT et al., 2012). O enriquecimento de “*Ca. Accumulibacter*” foi induzido apenas após o dia 30 (0-4%, dia 1-30). O aumento gradual na abundância relativa de “*Ca. Accumulibacter*” (4-80%) e diminuição concomitante das *Tetrasphaera* (4-0%) foram observados do dia 30 ao dia 140. Junto à seleção de “*Ca. Accumulibacter*” nota-se o aumento da população de

Recuperação de exopolímero do tipo alginato de lodo granular formado por PAO: “do lodo residual a um produto valorizado”

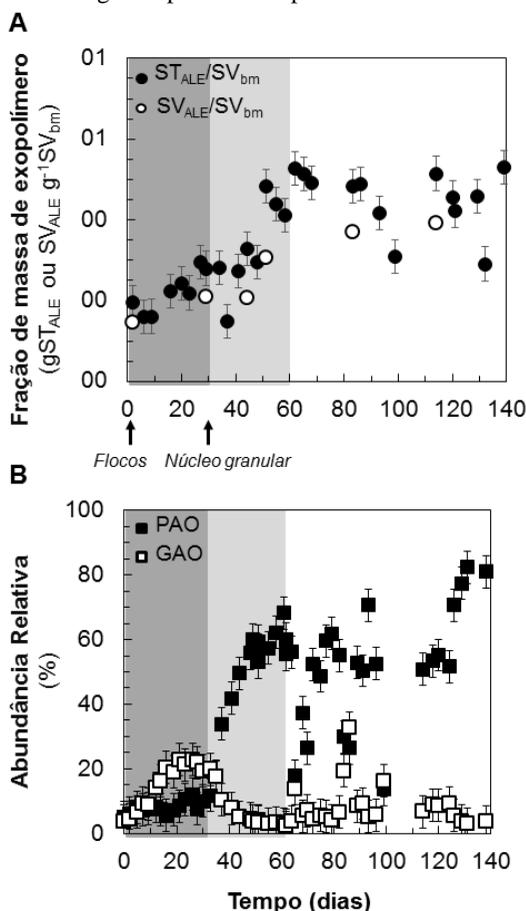
Dechloromonas, com abundância relativa de 0-4 % em 30 dias, chegando à máxima abundância no dia 62 (30%), e posterior queda até o fim do período experimental (2%). *Dechloromonas* spp. foram descritas como populações acompanhantes de “*Ca. Accumulibacter*”, e também foram propostas como supostas PAO (KONG et al., 2007). O aumento na relação COD:P de 8:1 para 16:1 no dia 30 pode ter sido o fator que desencadeou a mudança populacional partir deste dia, para o enriquecimento em “*Ca. Accumulibacter*”. A princípio, não parece intuitivo que a redução de fosfato no meio tenha liderado o aumento na abundância de PAO. Porém, as mais altas concentrações de fósforo afluyente no início da operação podem ter conduzido à precipitação de minerais, como a estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), limitando os íons de fosfato para o metabolismo das PAO. Esta observação é suportada pela evolução da fração inorgânica do lodo (Figura 36 C), a qual chegou ao valor máximo de 57% no dia 30.

Produção de exopolímero do tipo alginato (ALE)

Considerando que a matriz de exopolímeros é constituída por uma mistura de compostos e que os polímeros que conferem à formação de gel são a parte orgânica, os resultados abaixo serão descritos tanto baseados nos sólidos totais de ALE (ST_{ALE}) como nos sólidos voláteis de ALE (SV_{ALE}). Isto leva a maiores rendimentos de ALE quando se referem às razões de SSV do que de SST. A fração de massa orgânica e inorgânica foram medidas em sete amostras de ALE e variou entre 64-77% e 23-36%, respectivamente. Durante o primeiro mês de operação, a produção de exopolímeros acompanhou a granulação, aumentando de 0,20 a 0,30 g ST_{ALE} g $\text{SV}_{\text{bm}}^{-1}$ (0,15 a 0,21 g SV_{ALE} g $\text{SV}_{\text{bm}}^{-1}$) partindo dos flocos inoculados até o inicial lodo granular no dia 30 (Figura 39A). A população de GAO (soma dos gêneros “*Ca. Competibacter*”, “*Ca. Contendobacter*”, e CPB_S60) foi predominante neste período (3-23%) (Figura 39 B). Do dia 30 ao dia 41 nota-se um platô com produção média de $0,26 \pm 0,06$ g ST_{ALE} g $\text{SV}_{\text{bm}}^{-1}$, e em seguida uma crescente produção de ALE até o dia 60 com 0,53 g ST_{ALE} g $\text{SV}_{\text{bm}}^{-1}$ (Figura 39A), com o concomitante crescimento de PAO (soma de “*Ca. Accumulibacter*”, *Tetrasphaera* e *Dechloromonas*) no sistema (12-68 %) (Figura 39B). Uma elevada fração de massa de exopolímeros foi mantida com sucesso (0,48-0,53 g ST_{ALE} g $\text{SV}_{\text{bm}}^{-1}$ e 0,30-0,40 com relação a SV) nos grânulos enriquecidos com PAO ($55 \pm 15\%$, máximo 83%) durante o período compreendido entre os dias 60 e 140, demonstrando a estabilidade do sistema e da produção a longo prazo

(Figura 39A-B). Em geral, a elevada produção de exopolímeros foi conseguida juntamente com uma granulação robusta, sob condições de seleção para PAO.

Figura 39: Produção de exopolímeros em condições de enriquecimento de PAO em lodo granular. **(A)** Evolução da fração de massa dos exopolímeros em termos de sólidos totais e voláteis; **(B)** Evolução dos organismos heterotróficos de crescimento lento PAO (soma de “*Ca. Accumulibacter*, *Tetrasphaera* e *Dechloromonas*”) e GAO (soma de “*Ca. Competibacter*”, “*Ca. Contendobacter*”, e CPB_S60). **Área cinza escuro:** start-up antes da adaptação de C:P de 8 para 16 m/m do dia 30; **Área cinza claro:** primeiro platô de exopolímeros e período onde ocorreu a adaptação da razão Ca: Mg de 0,37 para 1 mol/mol. **Área branca:** Segundo platô de exopolímeros e estabilidade do sistema.



Foram identificadas fortes correlações (Tabela de Pearson no Apêndice C) entre as condições aplicadas, a seleção bacteriana e a produção de exopolímeros. O aumento progressivo da carga orgânica volumétrica de 0,3 a 2,0 g DQO_{Ac} d⁻¹ L_R⁻¹ e a adaptação da relação C:P de 8 a 16 g DQO_{Ac} g⁻¹ P (dia 30) contribuíram para a seleção de PAO e produção de exopolímero. O equilíbrio da razão Ca²⁺:Mg²⁺ de 0,37 para 1 mol Ca mol⁻¹ Mg no dia 42 sustentou o acúmulo de exopolímeros formadores de hidrogel, atingindo um segundo platô a 0,50 g ST_{ALE} g⁻¹ SV_{bm} a partir do dia 50 em diante. A matriz de exopolímero formada sob tais condições foi altamente resistente sendo que a maior produção de exopolímeros correlacionou-se fortemente com a crescente predominância de PAO.

Frações de massa de grânulos de duas estações Nereda[®], em Utrecht e Groningen (Países Baixos) foram analisadas neste estudo para ter base de comparação, resultando em 0,21±0,004 g ST_{ALE} g ST_{bm}⁻¹ e 0,2 ± 0,015 g ST_{ALE} g ST_{bm}⁻¹, respectivamente. Nestas ETE, a comunidade microbiana foi determinada por sequenciamento de *amplicon* de nova geração, identificando o gênero *Tetrasphaera* como o organismo predominante, tanto em Utrecht (28%), quanto em Groningen (12 %). No estudo de Seviour et al., (2011), o lodo granular enriquecido com “*Ca. Competibacter*” apresentou uma fração de massa de 0,20 g ST_{EPS,Granulan} g⁻¹ ST. Já o ALE extraído por Lin et al. (2010), de lodo granular de um reator piloto tratando esgoto municipal, apresentou uma fração de massa de 0,16 g TS_{ALE} g⁻¹ SV_{bm}. No estudo de 80 dias de Yang et al. (2014), com condições de enchimento rápido e longa fase de aeração, alcançou-se granulação selecionando organismos heterotróficos de crescimento rápido como *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Thauera* e *Arthrobacter*, com máxima fração de ALE em 0,15 g TS_{ALE} g⁻¹ SV_{bm}. Gubser (2015) obteve altas frações de ALE (0,37 g ST_{ALE} g⁻¹ ST_{bm}) de um lodo floculento altamente enriquecido com “*Ca. Accumulibacter*”. Portanto, ALE esteve presente tanto em lodo floculento tanto em granular nesses estudos. Porém a elevada fração de ALE (acima de 30% m/m) obtida no presente estudo (com 0,53 gTS_{ALE} g⁻¹ SV_{bm} nos dias 62 e 139) e por Gubser (2015) foram relatadas apenas em lodo enriquecidos com “*Ca. Accumulibacter*”. Do ponto de vista prático, o desempenho dos sistemas de lodo granular dependem da presença de PAO, como “*Ca. Accumulibacter*”, para a remoção (e possível recuperação) do fósforo. Os benefícios da alta produção de ALE por estes organismos podem estar relacionados com a maior estabilidade dos grânulos, além do potencial de recuperação de biopolímero com alto valor agregado.

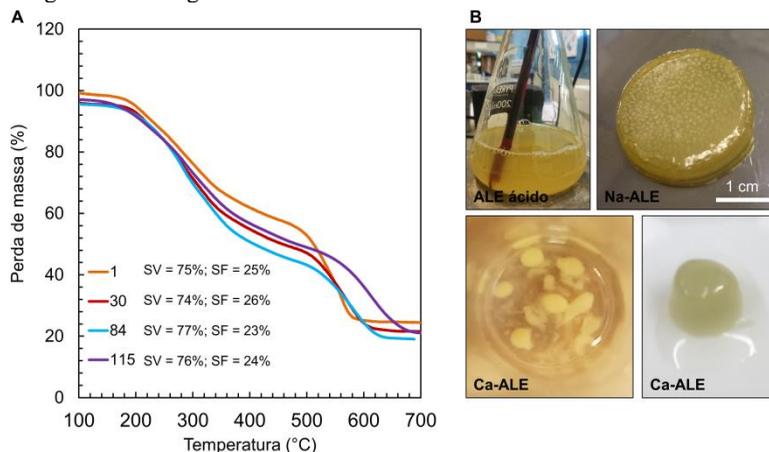
Características do ALE extraído do lodo granular enriquecido com “Ca. Accumulibacter”

A análise térmica do expolímero foi realizada por meio de termogravimetria (TGA), a qual mostrou a estabilidade térmica dos extratos de expolímeros e o mesmo perfil de degradação em todas as amostras analisadas (dias 1, 30, 84 e 115) (Figura 40A). Todas as condições durante as análises foram mantidas iguais para comparar o comportamento de degradação das amostras. Os biopolímeros apresentaram 3 processos de degradação térmicos, sendo o primeiro referente à volatilização da água e remoção de umidade na faixa de temperatura até os 100 °C. Os outros dois processos estão mostrados nos termogramas da Figura 40A. O segundo processo ocorreu na faixa de temperatura de aproximadamente 200 °C, sendo a perda de massa (30-50%) atribuída à decomposição do polímero pela desidratação dos anéis de sacarídeos, quebrando as ligações C-H e as ligações glicosídicas (C-O-C) da cadeia principal de polissacarídeos (SARKER et al., 2014). Nesta transição, a decomposição do suposto ácido alginico ocorreu e a perda de massa foi causada pela perda de CO₂ da cadeia polissacarídica (SOARES et al., 2004). Pela presença dos grupos COOH (ácidos carboxílicos) no suposto alginato, estes podem descarboxilar nesta faixa de temperatura. Este fenômeno resulta na terceira etapa de decomposição do material na faixa de temperatura de 500-600 °C (JABEEN et al., 2016) com perda de massa de 20 a 30%. Nesta transição, Na₂CO₃ é formado junto ao material carbonizado pela decomposição térmica do ácido alginico que se decompõe em N₂. A decomposição leva a formação de resíduos de Na₂CO₃ sob a atmosfera de ar, onde os resíduos carbonáceos são totalmente degradados em temperatura acima de 600 °C. As fases de decomposição do expolímero produzido no presente estudo teve alta similaridade com os termogramas de materiais puros de ácido alginico, como o sal comercial alginato de sódio originário de algas marrons (BEKIN et al., 2014; JABEEN et al., 2016; SARKER et al., 2014; SOARES et al., 2004; SWAMY; RAMARAJ, 2010). Portanto, o expolímero extraído no presente estudo demonstrou um comportamento de decomposição térmica do tipo alginato, durante todo o período experimental.

A propriedade de formação de gel dos expolímeros de grânulos enriquecidos em “Ca. Accumulibacter” foi confirmada qualitativamente, como mostrado na Figura 40B. Uma película em gel fina foi formada após secagem de alginato de sódio (Na-ALE). Além disso, típicas morfologias de grânulos (*beads*) de alginato de cálcio (Ca-ALE) foram formadas, expressando a característica de hidrogéis do

presente biopolímero. Esta forte capacidade de formação de gel, confere ao exopolímero formado o grande potencial para competir com o alginato comercial para aplicações específicas, nas quais uma composição pura não é necessária. Na indústria de papel, por exemplo, ALE são capazes de aumentar a resistência à água das fibras de papéis (LIN et al., 2015) e na indústria civil, ALE podem evitar o ressecamento de concretos (PICKEN; ZLOPASA; KOENDERS, 2014). Portanto, além do lodo granular oferecer perspectivas para atingir critérios rigorosos de qualidade de efluentes tratados, também apresenta alta prospecção para a biorrefinaria de exopolímeros, do tipo alginato.

Figura 40: Comportamento de alginato identificado no exopolímero produzido em lodo granular enriquecido em “*Ca. Accumulibacter*”. **(A)** Decomposição térmica dos extratos dos dias 1, 30, 84 e 115 e as porcentagens de material orgânico e inorgânico identificadas em cada dia. **(B)** Representação fotográfica do ácido algínico extraído e posterior formação do filme de alginato de sódio e dos grânulos de alginato de cálcio.



No contexto da biorrefinaria, o fator mais importante para a aplicabilidade de ALE está diretamente relacionado com a capacidade de formação de gel. No entanto, o conhecimento da composição química deste complexo exopolímero é interessante para a investigação dos mecanismos de biossíntese e de melhoramento da qualidade e produção destes exopolímeros. Basicamente, todos os compostos que se dissolvem em alto pH e temperatura fazem parte da complexa matriz de ALE. O teor de material inorgânico dos ALE de grânulos enriquecidos com “*Ca. Accumulibacter*” foi de 23 e 24 % (Figura 40 e Figura 41A). Esta fração

de cinzas é maior do que aquelas encontradas em alginato proveniente de algas (< 10%) (ROSS et al., 2011). Este elevado teor inorgânico pode estar relacionado às elevadas concentrações de fosfato e cálcio no afluyente do presente sistema, os quais, possivelmente, são incorporados na célula e na matriz de EPS-ALE.

Os polissacarídeos ou tipos de glicosídeos (por exemplo, proteoglicanas) foram considerados importantes macromoléculas na gelificação de EPS (Seviour et al., 2009). O exopolímero do presente estudo apresentou características de formação de gel, no entanto, a fração de polissacarídeo detectada foi muito abaixo do esperado. A quantidade de carboidratos totais através do método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi medida em uma amostra de ALE produzido em grânulo enriquecido com “*Ca. Accumulibacter*” resultando em uma média de 57 ± 14 mg $PS_{Glic,eq} g^{-1} ALE_{ST}$ (74 ± 18 mg $PS_{Glic,eq} g^{-1} ALE_{SV}$), o que equivale a 5,7 % ($m_{PS}/m_{ALE,ST}$). Lin et al. (2010), utilizando o alginato puro como padrão equivalente na análise, identificaram maiores quantidades de polissacarídeos (486 mg g_{ALE}^{-1} , 48,8 %) em ALE extraído de lodo granular de um reator piloto tratando esgoto municipal, definindo estes compostos como os mais importantes constituintes de ALE granular. Portanto, é possível que com a utilização apenas do método fenol-sulfúrico (glicose equivalente), alguns polissacarídeos sejam omitidos. Testes foram realizados no presente estudo para a detecção de uma solução padrão de glucosamina, a qual não foi identificada por este método. A glucosamina é um dos monossacarídeos mais abundantes e faz parte da estrutura de alguns polissacarídeos como a quitina e a quitosana. A verificação da presença de glucosamina nos extratos de ALE foi, então, confirmada pela análise cromatográfica HPAE-PAD, sendo detectada em um tempo de retenção de 7,9 min. A concentração média de glucosamina foi de $36 \pm 1,9$ $\mu mol L^{-1}$, resultando em aproximadamente 1% de ALE de grânulos enriquecidos com “*Ca. Accumulibacter*”. N-acetilglucosamina foi previamente detectada em lodo granular enriquecido em “*Ca. Accumulibacter*” pelo mesmo método (GUBSER, 2015) e também utilizando análise de fluorescência de ligação por lectina (WEISSBRODT et al., 2013a). Portanto, a glucosamina é apenas um exemplo de possíveis polissacarídeos que compõem a matriz de ALE, mas que não foram detectados pelo método de Dubois neste estudo. Deste modo, se faz necessária a otimização dos métodos de detecção de carboidratos inseridos em matrizes complexas.

A fração de proteína no ALE granular enriquecido por “*Ca. Accumulibacter*” foi quantificada pelo método Bradford, obtendo valor

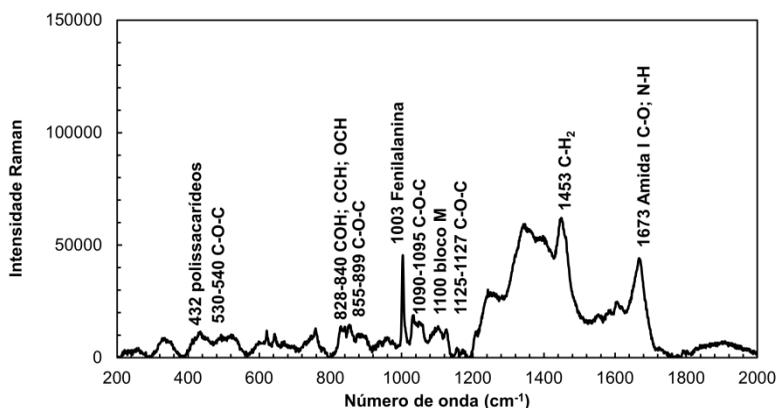
Recuperação de exopolímero do tipo alginato de lodo granular formado por PAO: “do lodo residual a um produto valorizado”

de 0,30 mg PN_{BSA-eq} mg ALE, com porcentagem de 30% de ALE total. Para confirmação desta fração, o teor de proteínas também foi verificado pelo método de BCA, encontrando um resultado próximo em 0,33 mg PN_{BSA-eq} mg ALE (33 %). A fração protéica de ALE esteve abaixo do limite de detecção na caracterização de ALE granular no estudo de Lin et al., (2010). Assim como polissacarídeos, as proteínas também são capazes de formar gel (HUANG et al., 2002). Porém, no estudo de Seviour et al. (2009), a resistência do gel EPS de grânulos foi independente do teor de proteína, e os polissacarídeos foram os responsáveis pela gelificação do EPS. Em produtos alimentícios, os compostos proteínas-polissacarídeos estão comumente envolvidos na formação de hidrogéis. Ligações covalente e não-covalentes cruzadas se formam entre as cadeias destes polímeros restringindo seus movimentos. Hidrogéis são tipos de géis capazes de, reversivelmente, absorver e exalar água ou fluidos biológicos (inchar e desinchar) (WEST et al., 2007). No presente estudo, foi utilizada a técnica SDS-PAGE para a detecção de proteínas de ALE granular enriquecido com “*Ca. Accumulibacter*” e os resultados foram bandas não definidas como manchas (*smear band*), sugerindo a presença de glicoproteínas (proteínas que contêm cadeias de oligossacarídeos covalentemente ligados às cadeias laterais de polipeptídeos), as quais não se dissociam no gradiente SDS. Portanto, com o alto teor de proteína encontrado no presente estudo, é possível que o ALE granular seja um hidrogel constituído pelas macromoléculas proteína-polissacarídeo ligadas entre si, como as glicoproteínas.

A espectroscopia de Raman foi uma ferramenta útil para identificar detalhes da estrutura química do ALE extraído de lodo granular enriquecido em “*Ca. Accumulibacter*”. O espectro de Raman está mostrado na Figura 41, e demonstrou vários picos típicos de polissacarídeos (432 cm^{-1}) e de ligações glicosídicas (C-O-C) ($530-540$, $855-899$, $1090-1095$, $1125-1227\text{ cm}^{-1}$) (MAQUELIN et al., 2002). Este resultado reforça a subestimação do teor de polissacarídeos encontrado pelo método fenol-sulfúrico discutido anteriormente. Os ácidos manurônicos (M) e gularônicos (G) são os monômeros que compõem as moléculas de alginato e seus resíduos podem ser identificados na espectroscopia de Raman nas bandas 1100 cm^{-1} (bloco M) e 1025 cm^{-1} (bloco G) (PEREIRA et al., 2003; SARTORI; FINCH; RALPH, 1997). No complexo exopolímero analisado neste trabalho o pico do bloco G não foi identificado, enquanto que do bloco M foi presente. A presença de proteínas pode ser demonstrada com o acentuado pico do aminoácido fenilalanina em 1003 cm^{-1} (MAQUELIN et al., 2002). Além disso, o

espectro de Raman mostra pico em 1672 cm^{-1} referente à amida I, o qual representa um modo vibracional das proteínas ou lipídeos (HAYASHI; MUKAMEL, 2008; OLIVEIRA et al., 2012). Lin et al. (2010) não detectaram picos de Raman referentes à proteínas em ALE de grânulos cultivados com esgoto municipal em um reator piloto. Os resultados fornecidos pela espectroscopia de Raman corroboram com as análises de proteínas discutidas acima e também sugerem a presença de ligações de glicoproteínas.

Figura 41: Composição química do ALE de lodo granular enriquecido com “*Ca. Accumulibacter*”. Espectrômetro de Raman com picos referentes aos polissacarídeos, incluindo o bloco M típico de alginato, e proteínas.

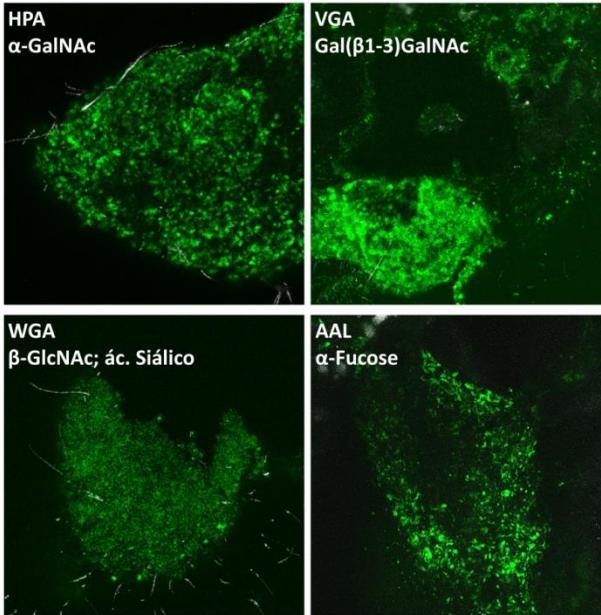


No presente estudo, análises de LFBA em fatias de grânulos enriquecidos com “*Ca. Accumulibacter*” detectou vários tipos de glicoconjugados, como α - e β -N-acetilgalactosamina (α - e β -GalNAc), β -N-acetilglucosamina (β -GlcNAc), ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) e α -fucose, evidenciando a presença das glicoproteínas (Figura 42). Os detalhes das lectinas com seus respectivos glicoconjugados estão especificados no Apêndice C. A presença de diferentes glicoconjugados também foi detectada por LFBA em grânulos predominadas por “*Ca. Accumuliacter*” no estudo de Weissbrodt et al. (2013a). No geral, a composição química detectada no presente ALE granular enriquecido com “*Ca. Accumulibacter*” demonstrou ser uma complexa matriz de polímeros com elevada presença de material inorgânico, proteínas e polissacarídeos em suas mais variadas estruturas e combinações (aminossacarídeos e glicoproteínas). A união e

Recuperação de exopolímero do tipo alginato de lodo granular formado por PAO: “do lodo residual a um produto valorizado”

harmonização destas macromoléculas conferiram ao presente exopolímero um comportamento típico de alginato, com características típicas de um hidrogel. Deste modo, a recuperação deste material a partir do esgoto insere as ETE na economia circular, transformando um resíduo em um produto valorizado para a sociedade.

Figura 42: Detecção de glicoconjugados em fatias de grânulos enriquecidos com “*Ca. Accumulibacter*”. As lectinas HPA e VGA revelaram a presença de α - e β -GalNAc, respectivamente. A lectina WGA detectou os glicoconjugados β -GlcNAc e ácido siálico. Lectina AAL demonstrou existência de α -fucose. Imagens em tamanho original com o tamanho de pixel sendo 0,3 μ m. As imagens digitais CLSM foram gravadas por Neu & Kuhlicke (UFZ Magdeburg, Alemanha).



4.4.4 Conclusões

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- 1) As condições de processo aplicadas (completo consumo anaeróbio do acetato, C:P = 8 g DQO g⁻¹ P) favoreceram uma granulação robusta (IVL₅ = 26,7 mL g⁻¹ SSV, D_{médio}=310 μ m) e produção de exopolímeros (0,30 g ST_{ALE} g⁻¹ SV_{bm}) sob a inicial predominância de GAO (23%).

- 2) Adaptações no sistema (C:P = 16 g DQO g⁻¹ P, Ca:Mg = 1 mol Ca mol⁻¹ Mg e carga orgânica específica ~200 mg DQO_{Acet} d⁻¹ g⁻¹ SSV) levaram à construção de uma substancial e resistente matriz de exopolímero (máximo de 0,53 g ST_{ALE} g⁻¹ SV_{bm}) em um lodo altamente enriquecido com PAO (80%) especialmente pelo gênero “*Ca. Accumulibacter*”.
- 3) Os exopolímeros produzidos neste estudo apresentaram comportamento de decomposição térmica e de formação de gel semelhante ao do alginato comercial. Além disso, a composição química predominada por proteínas, polissacarídeos e glicoconjugados confere ao exopolímero a característica de hidrogel, validando a natureza valiosa e sustentável do produto recuperado de lodo granular residual.

Em síntese, no presente estudo foram obtidos resultados que levam ao estabelecimento de biorrefinaria de exopolímeros agregada à tecnologia de lodo granular. Partindo da responsabilidade ambiental com a conversão da matéria orgânica poluente em biomassa, este trabalho traz suporte para o alcance da sustentabilidade, com transformação do lodo residual em um novo recurso com alto valor agregado.

5. DISCUSSÃO INTEGRADA

“Living sustainably means recognizing that we are an inseparable part of the web of life, of human and nonhuman communities, and that enhancing the dignity and sustainability of any one of them will enhance all the others.”
(Fritjof Capra, 2004)

Esta tese partiu de um estudo descritivo em um sistema piloto complexo que se aproxima às situações reais (SEI), em direção às correlações em sistema de bancada sob condições bem definidas e controladas (SEII), trazendo de volta à aplicação tecnológica o conhecimento elementar para a granulação, a remoção de nutrientes e a recuperação de exopolímeros no tratamento de esgoto sanitário.

Nos estudos realizados no reator em escala piloto (SEI), com esgoto sanitário de baixa carga ($0,6-1,0 \text{ g DQO}_{\text{solúvel}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), as condições operacionais foram direcionadas para a granulação e a remoção de nutrientes. Em uma primeira estratégia operacional (EO1), na qual o RBS foi operado com enchimento rápido (3 min), seguido de uma fase de repouso (10 min) e posteriormente um longo período aerado (211 min), a formação de grânulos ($d > 290 \mu\text{m}$) foi alcançada em 56 dias, a partir de inoculação com lodo ativado floculento. As concentrações efluente de DQO e amônia (55 mg DQO L^{-1} , $14 \text{ mg NH}_4^+-\text{N L}^{-1}$) obtidas neste sistema atingiram os padrões de lançamento nacional, porém notou-se um acúmulo substancial de nitrito ($16 \text{ mg NO}_2^--\text{N L}^{-1}$) e pouca formação de biomassa ($0,7 \text{ g SSV L}^{-1}$), além de baixa remoção de fósforo (33%). Para fins de comparação, em uma segunda estratégia operacional (EO2), na qual o RBS foi operado com enchimento prolongado (20 min), seguido de um longo período aerado (203 min), foram formados grânulos maiores ($d > 450 \mu\text{m}$) também em 56 dias. As concentrações efluente de DQO, amônia e fósforo (62 mg DQO L^{-1} , $17 \text{ mg NH}_4^+-\text{N L}^{-1}$, $2 \text{ mg P}_{\text{Total}} \text{ L}^{-1}$) atingiram os padrões de lançamento nacional e também os mais restritivos do estado de Santa Catarina ($\leq 60 \text{ mg DBO L}^{-1}$ e $\leq 4 \text{ mg P}_{\text{Total}} \text{ L}^{-1}$), porém o acúmulo de nitrito ($20 \text{ mg NO}_2^--\text{N L}^{-1}$) e a baixa concentração de biomassa ($1,5 \text{ g SSV L}^{-1}$) no sistema também foram observados. Portanto, com relação à eficiência de processo, em ambas as estratégias ocorreu a granulação e o efluente tratado atingiu os padrões de qualidade nacional e estadual. No

entanto, observou-se a desintegração dos grânulos após 274 dias do experimento (EO1), bem como no processo de remoção biológica de nutrientes observou-se a conversão incompleta das outras espécies de nitrogênio (NOx) e do fósforo.

Em um segundo momento, considerando a importância dos organismos acumuladores de fósforo (PAO) para a remoção biológica do fósforo e para uma granulação madura e compacta, um reator RBS de bancada foi operado para avaliar o potencial destes organismos na produção de exopolímeros. As condições de seleção de PAO permitiram um enriquecimento de 80% de abundância relativa destes microorganismos e alto potencial para a biorrefinaria de exopolímero do tipo alginato (>50% m/m) dos sistemas de lodo granular no tratamento de esgoto.

Uma vez que a tecnologia de grânulos traz consigo o princípio de alta retenção de biomassa e a intensificação de processo de remoção de nutrientes, o presente estudo traz à luz uma discussão, baseada principalmente na dinâmica microbiana, para elucidar os processos ocorrentes acoplados às suas limitações nas situações testadas. A seguir, são apresentadas as principais constatações do estudo.

Em termos de características dos grânulos:

O SEI, utilizando esgoto sanitário de baixa carga, demonstrou capacidade na formação de grânulos. O tempo de granulação de aproximadamente dois meses foi mais rápido que aqueles reportados em escala real e mais lento do que os estudos de laboratório. Grânulos maiores e mais densos foram obtidos em sistema de maior carga orgânica aplicada e enchimento prolongado, no entanto ainda foram grânulos considerados pequenos quando comparados com os estudos de bancada com esgoto sintético e com estudo em um Nereda® em escala real. Nos grânulos foram identificados protozoários, como consequência do material particulado afluente, coabitando com as bactérias, indicando a importância desta relação na estrutura granular em sistemas alimentados com esgoto sanitário. O sequenciamento de nova geração evidenciou a preferencial seleção dos organismos heterotróficos ordinários (OHO) em ambas EO no SEI. O fato de o consumo da DQO se estender durante a fase de aeração e a operação do reator ocorrer nesta fase com o nível de OD na saturação, contribuíram para a seleção preferencial de OHO. Estes são organismos de rápido crescimento, que podem facilmente superar os organismos de crescimento lento, como PAO e GAO. Além disso, a uma velocidade de crescimento

relativamente rápida, tal como a obtida com o crescimento aeróbio, o aparecimento de micro-organismos filamentosos e estruturas espalhadas (*finger type*) conduziu à formação de grânulos irregulares, levando à desestabilização do sistema.

Os fenômenos de granulação e desintegração foram observados no SEI, os quais foram acompanhados pela produção de polissacarídeo. Durante o período em que os grânulos foram mantidos no sistema, observou-se as maiores razões PS/PN, indicando forte participação dos polissacarídeos na sustentação da matriz do EPS granular. No entanto, a granulação conseguida nestas condições para remoção de C e N selecionou preferencialmente linhagens da família *Rhodocyclaceae*, principalmente do gênero *Thauera* e *Zoogloea*, organismos de crescimento rápido, os quais não foram suficiente para garantir um processo estável. Outras populações da mesma família de *Rhodocyclaceae*, porém de crescimento mais lento, como o gênero "*Ca. Accumulibacter*", proporcionaram uma melhor formação de bioagregados compactos e estáveis com alta produção de EPS (SEII). Portanto, *Rhodocyclaceae* é uma família de grande importância na produção de EPS nos sistemas granulares, mas os gêneros fazem a diferença na estabilidade dos bioagregados.

A coesão dos grânulos está ligada ainda ao fornecimento de substrato através da profundidade do biofilme. O rápido consumo de substrato nas camadas externas (aeróbias ou anóxicas) do biofilme por organismos de crescimento rápido, como os OHO, pode ter conduzido à limitação de substrato nos núcleos dos grânulos formados pelo SEI, tornando-os mais susceptíveis à desintegração. Por outro lado, a seleção preferencial para organismos de crescimento lento conduziu ao consumo mais lento e a uma penetração mais longa do substrato orgânico no interior de grânulos (SEII). Portanto, condições que selecionem os organismos de crescimento lento e previnem a proliferação das populações de crescimento rápido são cruciais para manter um forte estado de agregação. Embora a granulação tenha sido alcançada no tratamento de esgoto sanitário de baixa carga em clima subtropical para apenas remoção de C-N, atendendo às legislações ambientais, o biofilme granular não foi estável em uma operação em longo prazo. Dessa forma, condições operacionais que selecionem corretamente os organismos de crescimento lento (por exemplo, PAO, mas também GAO, nitrificantes, anammox) devem ser utilizadas na perspectiva de se conseguir a estabilidade do lodo granular. A concepção de uma operação anaeróbia-aeróbia é um importante fator para selecionar PAO como pré-requisito

para uma granulação robusta, enquanto também permite a BNR completa.

Em termos de remoção de nutrientes:

A estratificação microbiana confirmada nas análises FISH revelou as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) dominando a camada externa do grânulo formado em SEI (EO1), enquanto bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) e desnitrificantes estavam em baixas incidências nas camadas internas. A informação adquirida pela qPCR corroborou com a alta atividade das nitrificantes. A dominância de AOB sobre as NOB na camada externa é mais favorável para utilizar o oxigênio, o que pode ter resultado na repressão das NOB e no acúmulo de nitrito reportado no SEI. Fatores físico-químicos foram relacionados com tal falha repetitiva no presente sistema piloto, executado em um contexto de clima quente e costeiro, tendo como exemplo, a temperatura elevada e a concentração de amônia livre. As AOB efetivamente superaram as NOB nas condições mesofílicas experimentadas no SEI (18-30°C) e as concentrações de amônia livre se encontraram dentro da faixa de inibição das NOB.

A remoção completa do nitrogênio foi, claramente, limitada pelo processo de desnitrificação. Em lodos granulares, a nitrificação e a desnitrificação podem ocorrer simultaneamente (NDS) durante a aeração, dependendo da fração e do tamanho dos grânulos, da atividade microbiana e, portanto, da profundidade de penetração de OD e dos receptores de elétrons nitrogenados (NO_x). Porém, o tamanho reduzido dos grânulos formados durante as estratégias operacionais no SEI, resultaram em biovolumes quase que exclusivamente aerados dentro dos bioagregados. Assim, o OD fornecido em nível de saturação durante a aeração promoveu a nitrificação, mas definitivamente impediu a desnitrificação simultânea. A redução de NO_x ocorreu principalmente durante a fase de repouso em EO1 e na fase de enchimento em EO2. Os genes catabólicos detectados pela qPCR evidenciaram rotas metabólicas de desnitrificação via nitrito, desnitrificação autotrófica, desnitrificação completa e incompleta. Além disso, o sequenciamento de nova geração revelou altas abundâncias dos organismos heterotróficos desnitrificantes (DHO) no SEI, sendo os gêneros mais abundantes *Thauera* da família *Rhodocyclaceae* em OS1, e *Comamonas* da família *Comamonadaceae* em OS2. No entanto, os organismos heterotróficos desnitrificantes, por serem facultativos e de crescimento rápido, se sobressaem facilmente frente aos outros organismos, mas sua atuação na desnitrificação está

limitada ao carbono orgânico disponível e à condição de anoxia apropriada. Portanto, por mais que eles sejam predominantes, não contribuíram para maiores atividades desnitrificantes, uma vez que esses organismos também podem utilizar o oxigênio como receptor de elétrons.

A remoção de fósforo era esperada ser conseguida pelo consumo do carbono nas camadas anaeróbias dos grânulos obtidos na OS1. Porém, o rápido consumo pelos OHO aeróbios da pouca matéria orgânica fornecida, além dos pequenos grânulos formados não propiciarem condições anaeróbias no interior dos grânulos, dificultaram o desenvolvimento de PAO. Em OS2, com o enchimento anaeróbio prolongado, a remoção biológica de fósforo foi melhorada com a identificação de PAO por sequenciamento e FISH. Porém, a atividade de PAO ainda foi considerada baixa para um EBPR estável. A seleção de uma quantidade três vezes maior de PAO no sistema seria necessária para este fim. Esta situação seria melhorada a partir de uma concepção apropriada de um seletor anaeróbio no reator. Condições totalmente anaeróbias devem ser garantidas evitando o escape de qualquer receptor final de elétrons para a fase anaeróbia, o que não foi o caso nas estratégias operacionais do SEI, uma vez que o nitrito e/ou nitrato acumulou ao longo das fases de aeração. Outra limitação para o desenvolvimento de PAO no SEI, foi a limitada quantidade de acetato no esgoto afluente, e insuficiente tempo de contato anaeróbio para permitir a hidrólise da matéria particulada, seguida pela produção e absorção de AGV por PAO.

Em termos de condições operacionais:

A transferência da tecnologia de lodo granular requer considerações específicas das condições locais para que a engenharia de operação do RBS alcance eficiente granulação e BNR. Em geral, as falhas nos desempenhos dos processos BNR do lodo granular, cultivado em esgoto sanitário de baixa carga (SEI, EO1 e EO2), devem ser corrigidas pelo tempo das fases operacionais: enchimento, anaeróbia e de aeração; controle do nível de OD; e acréscimo de AGV durante o *start-up*, caso necessário. A utilização de um seletor anaeróbio é um pré-requisito para a seleção de PAO ou GAO, como agentes microbianos de agregação robusta e granulação (SEII). A hidrólise total, conversão e captação da matéria orgânica afluente em condições anaeróbias completas (isto é, ausência de qualquer receptor de elétrons) é uma prioridade para este fim. Um tempo de contato anaeróbio substancial

pode ser conseguido no reator por uma alimentação em fluxo ascendente lento através de uma cama de lodo concentrada ou pela operação de uma fase anaeróbia com mistura após a alimentação.

O controle da fase de aeração é necessário para promover a remoção de nitrogênio e fósforo com o crescimento de biomassa, evitando sua perda por respiração endógena prolongada. A duração da fase de aeração e o controle do nível de OD são fatores específicos a serem manipulados para estes fins, em função da condição de temperatura. O acúmulo de nitrito deve ser evitado por meio da prevenção da inibição das NOB por AL, com a prolongação da fase de aeração. O escape de qualquer receptor de elétrons (OD, nitrito e nitrato), da fase de aeração para a fase de enchimento anaeróbio, deve ser prevenido pelo controle do OD, seja para NDS ou para NDA e/ou pela inclusão de uma posterior fase anóxica para reduzir concentrações residuais de NO_x . Estimular o crescimento de anammox quimioautotróficas também pode ser uma solução.

A ecologia microbiana deve ser integrada para compreender as comunidades dos processos de lodo granular. As diferentes operações mostraram ter impacto nas composições bacterianas subjacentes. A gestão dos fatores de seleção é necessária para que as principais rotas metabólicas de interesse sejam projetadas. Além das comunidades principais, as comunidades paralelas, tais como micro-organismos hidrolisadores e fermentadores, que são importantes para o fornecimento de DQO prontamente biodegradável para PAO e GAO, a partir da matéria orgânica complexa do esgoto sanitário.

Em termos de biorrefinaria de exopolímeros:

Após a discussão dos processos de eficiência em engenharia com base na dinâmica microbiana, tem-se clara a importância dos organismos heterotróficos de crescimento lento, tais como os PAO, nos processos de granulação e de remoção de nutrientes em sistemas RBS de lodo granular. Uma vez que a agregação dos micro-organismos é facilitada e suportada pelos EPS, os PAO foram aqui pensados como fortes agentes produtores desta matriz. De fato, as condições aplicadas de seleção para organismos de crescimento lento (completo consumo anaeróbio do acetato) favoreceram uma granulação robusta e produção de exopolímeros ($0,30 \text{ g ST}_{\text{ALE}} \text{ g SV}_{\text{bm}}^{-1}$) sob a inicial predominância de GAO. O aumento do teor de cálcio, o qual pode ajudar nas ligações entre as cadeias poliméricas, levaram à construção de uma substancial e resistente matriz de exopolímero (máximo de $0,53 \text{ g ST}_{\text{ALE}} \text{ g SV}_{\text{bm}}^{-1}$) em

um lodo altamente enriquecido com PAO (80%), especialmente pelo gênero “*Ca. Accumulibacter*”. Os exopolímeros produzidos neste estudo apresentaram comportamento semelhante ao do alginato comercial. Além disso, a composição química predominada por proteínas, polissacarídeos e glicoconjugados conferiu ao exopolímero a característica de hidrogel, validando a natureza valiosa e sustentável do produto recuperado de lodo granular residual. Em síntese, no presente estudo foram obtidos resultados que levam ao estabelecimento de biorrefinaria de exopolímeros agregada à tecnologia de lodo granular. Partindo da responsabilidade ambiental com a conversão da matéria orgânica poluente em biomassa, este trabalho traz suporte para o alcance da sustentabilidade, com transformação do lodo residual em um novo recurso com alto valor agregado.

6. CONCLUSÕES

“Eu tô te explicando pra te confundir
Eu tô te confundindo pra te esclarecer
Tô iluminado pra poder cegar
Tô ficando cego pra poder guiar”

(Tom Zé, 1976)

Esta tese traz como primeira mensagem que “*a granulação e a remoção de nutrientes podem ser alcançadas em sistemas de tratamento de esgoto e que estão intimamente ligadas à ecologia microbiana resultante das condições operacionais do reator*”, respondendo a hipótese 1. Buscou-se na elucidação microbiológica acoplada aos processos de conversões de nutrientes e de produção de EPS para chegar à principal conclusão de que é possível obter granulação robusta do lodo e remoção completa de nutrientes, porém medidas operacionais devem ser tomadas a fim de controlar o crescimento de organismos indesejáveis e fornecer ótimas condições aos organismos desejáveis.

A segunda mensagem está na potencialidade de “*recuperação de exopolímeros do tipo alginato de lodo granular*”, respondendo a hipótese 2. Esta pesquisa deu os primeiros passos na demonstração da recuperação de exopolímeros valorizados a partir do lodo granular de estações de tratamento de esgoto, trazendo o conceito da economia circular e biorrefinaria para o saneamento. Esta conclusão geral foi adquirida em função das seguintes conclusões específicas deste trabalho:

- 1) A granulação ($d > 200 \mu\text{m}$) foi obtida no RBS alimentado com esgoto sanitário de baixa concentração ($\text{DQO} < 200 \text{ mg DQO}_{\text{solúvel}} \text{ L}^{-1}$). Os grânulos apresentaram a coabitação de protozoários e bactérias, indicando a importância desta relação nos grânulos. As condições aplicadas (ciclo de 4 h, alimentação rápida e aeração prolongada) permitiram a remoção de DQO e de nitrogênio amoniacal através da nitrificação parcial com acúmulo considerável de nitrito (média de $16,5 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$) e emissão de N_2O (2,8% da carga total de nitrogênio). A dominância de AOB nas camadas externas do grânulo acoplada à presença de amônia livre no meio resultaram na repressão de NOB e conseqüentemente no acúmulo de nitrito. Os genes catabólicos das conversões de nitrogênio

mostraram evidências das seguintes rotas metabólicas: nitrificação parcial, desnitrificação via nitrito, desnitrificação autotrófica, desnitrificação completa e incompleta. *Firmicutes* e *Bacteroidetes* se mostraram envolvidos na via de desnitrificação completa até N_2 .

- 2) Diferenças operacionais demonstraram melhoras quanto às características de sedimentabilidade dos grânulos, ao acúmulo de biomassa no sistema e à remoção de fósforo quando se aplica enchimento lento (EO2- 20 min) no lugar de enchimento em um único pulso rápido (EO1- 3 min). Baixo acúmulo de biomassa em ambas as EO foi observado, como resultado da respiração endógena, insuficiente hidrólise do material particulado e alta pressão de seleção hidráulica. Em ambas EO, o consumo da DQO foi em grande parte aeróbio, o que selecionou preferencialmente os organismos heterotróficos ordinários (OHO) de crescimento rápido. Esse baixo acúmulo de biomassa, devido à perda de OHO, pode estar associado ao fenômeno da respiração endógena, como consequência dos longos períodos de fome (*famine*) em regime de aeração com concentração de OD próxima ao nível de saturação. Os altos níveis de OD também prejudicaram o processo de desnitrificação. O tempo de contato entre a biomassa e o afluente, ligeiramente mais longo fornecido pelo regime de alimentação mais lento em EO2 (2 min), foi propenso para aumentar a hidrólise da matéria orgânica particulada, porém ainda insuficiente para a completa hidrólise do material particulado em matéria orgânica biodegradável e posterior fermentação desta em ácidos graxos voláteis. Desta forma, notou-se uma inicial seleção de PAO e de remoção de fósforo neste sistema, mas sendo ainda um terço da remoção necessária para o estabelecimento de EBPR.
- 3) Medidas de operação que selecionem heterotróficas PAO ou GAO no lugar de OHO são essenciais para uma granulação estável com completa remoção de nutrientes. A utilização de um seletor anaeróbio, durante o qual ocorra a hidrólise total, conversão e captação da matéria orgânica afluente, é um pré-requisito para este fim. Um tempo de contato anaeróbio substancial pode ser conseguido por uma alimentação de fluxo ascendente lento através de uma cama de lodo concentrada ou pela operação de uma fase anaeróbia com mistura após a alimentação. O controle da duração da fase de aeração e o controle do nível de OD é necessário para promover a remoção de nitrogênio e fósforo com o crescimento de

biomassa, evitando a perda de biomassa por respiração endógena prolongada. O escape de qualquer receptor de elétrons (OD, nitrito e nitrato), da fase de aeração para a fase de enchimento anaeróbio, deve ser prevenido pelo controle do OD, seja para nitrificação-desnitrificação simultâneas (NDS) ou para nitrificação-desnitrificação alternadas (NDA) e/ou pela inclusão de uma posterior fase anóxica para reduzir concentrações residuais de NOx. Estimular o crescimento de anammox quimioautotróficas também pode ser uma solução. A gestão dos fatores de seleção dos microorganismos é necessária para que as principais rotas metabólicas de interesse sejam projetadas.

- 4) Alta correlação dos fenômenos de granulação-desintegração com a produção de EPS demonstraram o fundamental papel destas substâncias na estrutura granular. Grânulos formados em RBS com ciclos predominantemente aeróbios, alimentado com esgoto sanitário para remoção de carbono e nitrogênio, não foram suficientemente fortes para uma operação em longo prazo e se desintegraram após 274 dias. Os grânulos fofos formados predominantemente por OHO/DHO da família *Rhodocyclaceae* (gêneros *Thauera* e *Zoogloea*) demonstraram substancial relação com a produção da matriz EPS, mas que não trouxe estabilidade suficiente ao biofilme granular. No entanto, grânulos formados em RBS operando em ciclos com fases anaeróbio-aeróbias, proporcionando condições para o enriquecimento de PAO, foram compactos, robustos e duradouros, formados predominantemente pelo gênero “*Ca. Accumulibacter*”. O lento consumo do substrato por esses organismos, proporcionando maior penetração no interior do grânulo, pode explicar a qualidade do grânulo formado. Portanto, os processos robustos de lodo granular devem ser direcionados para condições de seleção de PAO, independentemente se o tratamento objetiva somente a remoção de C-N.
- 5) As condições de processo com completo consumo anaeróbio do acetato e C:P igual a 8 $\text{g}_{\text{DQO}} \text{g}_{\text{P}}^{-1}$ favoreceram uma granulação robusta e produção de exopolímeros (0,30 $\text{g ST}_{\text{ALE}} \text{g}^{-1} \text{SV}_{\text{bm}}$) sob a inicial predominância de GAO (23%). Adaptações no sistema com C:P de 16 $\text{g DQO g}^{-1} \text{P}$ e Ca:Mg igual a 1 $\text{mol Ca mol}^{-1} \text{Mg}$ e carga orgânica específica de aproximadamente 200 $\text{mg DQO}_{\text{Acet}} \text{d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{SSV}$ levaram à construção de uma substancial e resistente matriz de exopolímero (máximo de 0,53 $\text{g ST}_{\text{ALE}} \text{g}^{-1} \text{SV}_{\text{bm}}$) em um lodo

altamente enriquecido com PAO (80%) especialmente pelo gênero “*Ca. Accumulibacter*”.

- 6) Os exopolímeros recuperados de lodo granular enriquecido em PAO apresentaram comportamento de decomposição térmica e de formação de gel semelhante ao do alginato comercial. Além disso, a composição química predominada por proteínas, polissacarídeos e glicoconjugados confere ao exopolímero a característica de hidrogel, validando a natureza de alto valor agregado ao produto recuperado de lodo granular residual. Como principal resultado para a ciência e prática de sistemas de lodo granular e biorrefinaria, este trabalho enfatiza como a seleção para PAO de crescimento lento promove múltiplos benefícios. As vantagens estão desde a intensificação do processo por meio da estabilização do lodo granular e remoção de fósforo (e sua possível recuperação), até à captura de carbono com a valorização dos exopolímeros.

7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

“É necessário fazer outras perguntas, ir atrás das indagações que produzem o novo saber, observar com outros olhares através da história pessoal e coletiva, evitando a empáfia daqueles e daquelas que supõem já estar de posse do conhecimento e da certeza.”

(Mario Sérgio Cortella, 2009)

A partir do trabalho realizado, esta tese deixa as seguintes recomendações para as futuras pesquisas com lodo granular:

Em termos de operação do reator piloto:

Estudar adaptações na configuração do ciclo RBS, quanto ao enchimento, aeração e sedimentação a fim de reduzir o tempo de *start up* da granulação, melhorar a estabilidade dos grânulos e a remoção completa de nutrientes. Verificar as rotas de emissões de N_2O , utilizando regimes NDS e NDA nos ciclos operacionais. Realizar a gestão operacional do reator em função da variabilidade sazonal de cargas aplicadas e temperaturas.

Em termos das análises realizadas:

Melhorar o método fenol-sulfúrico de análises de polissacarídeos utilizando outros padrões além da glicose. Uma importante tarefa consiste também em ter um método forte e preciso para medir com precisão as composições PS e PN do EPS, incluindo aminoácidos e glicoproteínas. As amostras de FISH devem ser também preservadas para a detecção de bactérias gram-positivas. O sequenciamento de nova geração deve também ser realizado para a região v4 do gene 16S rRNA para a verificação de bactérias anammox. Além do sequenciamento se baseando no DNA, análises com base no RNA são de grande importância para afirmar atividades e funções metabólicas. Análises de metagenômica e metaproteômica podem ser realizadas a fim de aprofundar o conhecimento do ecossistema microbiano de lodo granular.

Em termos da recuperação de exopolímero:

Avaliar a produção de exopolímeros do tipo alginato pelo lodo granular de um reator alimentado com esgoto sanitário. Testar condições operacionais em bancada, como limitação de nutrientes, para aumentar a produção de exopolímeros. Verificar as características físico-químicas deste biopolímero extraído do lodo granular e buscar aplicações tecnológicas para o mesmo. Além do alginato, a verificação da recuperação dos EPS intracelulares como os PHA seria interessante, uma vez que estes biopolímeros são alternativos aos plásticos polipropileno e poliestireno derivados do petróleo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAV, S. S. et al. Aerobic granular sludge: Recent advances.

Biotechnology Advances, v. 26, n. 5, p. 411–423, 2008.

ADAV, S. S.; LEE, D.-J.; LAI, J.-Y. Proteolytic activity in stored aerobic granular sludge and structural integrity. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 68–73, 2009.

ADAV, S. S.; LEE, D. J.; LAI, J. Y. Microbial community of acetate utilizing denitrifiers in aerobic granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 753–762, 2010.

ADAV, S. S.; LEE, D. J.; TAY, J. H. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. **Water Research**, v. 42, n. 6–7, p. 1644–1650, 2008.

AGUADO, D. et al. Relating ions concentration variations to conductivity variations in a sequencing batch reactor operated for enhanced biological phosphorus removal. **Environmental Modelling and Software**, v. 21, n. 6, p. 845–851, 2006.

AKABOCI, T. R. V. **Tratamento De Esgoto Sanitário Em Reator Em Bateladas Sequenciais Com Grânulos Aeróbios: Desempenho Do Processo E Modelagem Matemática**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

ALBERTSEN, M. et al. Back to basics - The influence of DNA extraction and primer choice on phylogenetic analysis of activated sludge communities. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2015.

ALBERTSEN, M. et al. “Candidatus Propionivibrio aalborgensis”: A Novel Glycogen Accumulating Organism Abundant in Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1033, 4 jul. 2016.

ALLEN, M. S. et al. Analysis and glycosyl composition of the exopolysaccharide isolated from the floc-forming wastewater bacterium *Thauera* sp. MZ1T. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 780–790, ago. 2004.

AMANN, R. et al. rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for the Identification of Genuine and Former Pseudomonads. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 501–509, dez. 1996.

AMANN, R. I. et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1919–1925, 1990.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–69, mar. 1995.

ANA, A. N. DE Á. **Conjuntura dos Recursos hídricos no Brasil - Informe 2016**. [s.l.: s.n.].

ANDERSON, I. C. et al. A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3525–3533, 1993.

ANGENENT, L. T.; SUNG, S. Development of anaerobic migrating blanket reactor (AMBR), a novel anaerobic treatment system. **Water Research**, v. 35, n. 7, p. 1739–1747, 2001.

ANGNES, G. et al. Correlating denitrifying catabolic genes with N₂O and N₂ emissions from swine slurry composting. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 368–375, 2013.

ANTHONISEN, A. C. et al. Inhibition of nitrification and nitrous acid compounds. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 48, n. 5, p. 835–852, 1976.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. [s.l.: s.n.].

APHA. **Standard methods for the examination for water and wastewater**. 22nd. ed. Washington, DC: American Water Works Association, 2012.

ARAÚJO, J. M. P. et al. **Formation of aerobic granules in sequencing batch reactors applied for diluted domestic wastewater**. The Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. **Anais...**Buenos Aires, Argentina: 2016

ARDERN, E.; LOCKETT, W. Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 33, n. 10, p. 523–539, 1914.

AWWA, A. W. W. A.; APHA, A. P. W. A.; WEF, W. E. F. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington: AWWA, American Water Works Association APHA, American Public Works Association WEF, Water Environment Federation, 2012.

BARNARD, J. L.; ABRAHAM, K. Key features of successful BNR operation. **Water Science & Technology**, v. 53, n. 12, p. 1–9, 2006.

BARR, J. J.; COOK, A. E.; BOND, P. L. Granule formation mechanisms

- within an aerobic wastewater system for phosphorus removal. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 22, p. 7588–7597, 2010.
- BASSIN, J. P. et al. Simultaneous nitrogen and phosphate removal in aerobic granular sludge reactors operated at different temperatures. **Water Research**, v. 46, n. 12, p. 3805–3816, 2012.
- BASSIN, J. P. Remoção biológica de nutrientes em sistemas compactos e estudo da diversidade microbiana por técnicas de biologia molecular. p. 230, 2012.
- BATHE, S. et al. **Aerobic Granular Sludge**. Munique: IWA Publishing, 2005.
- BEARDSLEY, T. M. Peak Phosphorus. **BioScience**, v. 61, n. 2, p. 91–91, 2011.
- BEKIN, S. et al. Dielectric, thermal, and swelling properties of calcium ion-crosslinked sodium alginate film. **Polymer Engineering & Science**, v. 54, n. 6, p. 1372–1382, maio 2014.
- BEUN, J. J. et al. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 33, n. 10, p. 2283–2290, 1999.
- BEUN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. **Water Research**, v. 36, n. 3, p. 702–712, 2002.
- BIN, Z. et al. Dynamic and distribution of ammonia-oxidizing bacteria communities during sludge granulation in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 45, n. 18, p. 6207–6216, 2011.
- BRACCINI, I.; GRASSO, R. P.; PÉREZ, S. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: A molecular modeling investigation. **Carbohydrate Research**, v. 317, n. 1–4, p. 119–130, 1999.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K.-P. Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (`{nirK}` and `{nirS}`) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3769–3775, 1998.
- BRAKER, G.; TIEDJE, J. M. Nitric Oxide Reductase (`norB`) Genes from Pure Cultures and Environmental Samples Nitric Oxide Reductase (`norB`) Genes from Pure Cultures and Environmental Samples. **Applied and**

environmental microbiology, v. 69, n. 6, p. 3476–3483, 2003.

CASCIOTTI, K. L.; WARD, B. B. Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria.

FEMS Microbiology Ecology, v. 52, n. 2, p. 197–205, 2005.

CHEN, X. et al. Cultivation of aerobic granular sludge in a conventional, continuous flow, completely mixed activated sludge system. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, p. 1–10, 2013.

CHEN, Z. et al. Partial nitrification and denitrification of mature landfill leachate using a pilot-scale continuous activated sludge process at low dissolved oxygen. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 580–588, 2016.

CHON, K. et al. Abundance of denitrifying genes coding for nitrate (narG), nitrite (nirS), and nitrous oxide (nosZ) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fed constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 1, p. 64–69, 2011.

COMA, M. et al. Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 101–108, 2012.

CONAMA, C. N. DO M. A. Resolução CONAMA 430/2011. **Diário Oficial da União**, p. 8, 2011.

CONSEMA-SC. **Lei nº 14.675, de 13.04.2009 - Institui o Código Estadual do Meio Ambiente e estabelece outras providências**. Brasil, 2009. Disponível em: <<http://www.fatma.sc.gov.br/conteudo/legislacao>>

COROMINAS, L. et al. New framework for standardized notation in wastewater treatment modelling. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 4, p. 841–857, 2010.

CROCETTI, G. R. et al. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 3, p. 1175–1182, 2000a.

CROCETTI, G. R. et al. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16SrRNA-directed probes for their detection and quantitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1175–1182, 2000b.

CROCETTI, G. R. et al. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes b. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3353–3364, 1 nov. 2002.

CUEVAS-RODRÍGUEZ, G.; TEJERO-MONZÓN, I. Sedimentation and prefermentation of domestic wastewater in a fixed bed biofilm reactor.

Water science and technology : a journal of the International

- Association on Water Pollution Research**, v. 48, n. 3, p. 47–55, 2003.
- CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; WOJNOWSKA-BARYŁA, I. Nitrogen-converting communities in aerobic granules at different hydraulic retention times (HRTs) and operational modes. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 75–83, 2015.
- CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; WOJNOWSKA-BARYŁA, I. Nitrifying granules cultivation in a sequencing batch reactor at a low organics-to-total nitrogen ratio in wastewater. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 3, p. 201–208, 2011.
- DAIGGER, G. T. New Approaches and Technologies for Wastewater Management. **Fall**, p. 38–45, 2008.
- DAIGGER, G. T. Changing paradigms: From wastewater treatment to resource recovery. **In proceedings of the Water Environment Federation, Energy and Water 2011: Efficiency, generation, management and climate impacts**, p. 942–957, 2011.
- DAIMS, H. et al. The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all Bacteria: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 434–444, 1999.
- DAIMS, H. et al. Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. **Water Science & Technology**, v. 41, n. 4–5, p. 85–90, 2000.
- DAIMS, H. et al. In Situ Characterization of Nitrospira -Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5273–5284, 2001a.
- DAIMS, H. et al. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5273–84, nov. 2001b.
- DAIMS, H. et al. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504–509, 2015.
- DAUDT, G. C. **Desempenho e emissões de óxido nitroso de reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios para tratamento de esgoto sanitário**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.
- DAUM, M. et al. Physiological and Molecular Biological Characterization of Ammonia Oxidation of the Heterotrophic Nitrifier Pseudomonas putida. **Currentmicrobiology**, v. 37, p. 281–288, 1998.
- DE BRUIN, L. M. M. et al. Aerobic granular sludge technology: an alternative to activated sludge? **Water science and technology**, v. 49, n.

11–12, p. 1–7, 2004.

DE KREUK, M. K. **Aerobic granular sludge : scaling up a new technology**. Delft: TU Delft, 2006.

DE KREUK, M. K. et al. Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. **Water Research**, v. 44, n. 20, p. 5929–5938, 2010.

DE KREUK, M. K.; DE BRUIN, L. M. M. **Aerobic Granule Reactor Technology**. [s.l.: s.n.].

DE KREUK, M. K.; DE BRUIN, L. M. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Aerobic Granular Sludge - From Idea to Pilot Plant. In: **Aerobic Granular Sludge**. Munique, Alemanha: IWA Publishing, 2005. p. 169.

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**, v. 90, n. 6, p. 761–769, 2005.

DE KREUK, M. K.; KISHIDA, N.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Aerobic granular sludge - State of the art. **Water Science and Technology**, v. 55, n. 8–9, p. 75–81, 2007.

DE KREUK, M. K.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Formation of Aerobic Granules with Domestic Sewage. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, n. 6, 2006.

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**, v. 49, n. 11–12, p. 9–17, 2004.

DE WIT, R.; BOUVIER, T. “Everything is everywhere, but, the environment selects”; what did Baas Becking and Beijerinck really say? **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 755–758, 2006.

DEPONT, E. **Act now for the future: the circular economy**. Disponível em: <<http://www.deyrollepouurlavenir.com/index.php?lang=fr>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

DERLON, N. et al. Formation of aerobic granules for the treatment of real and low-strength municipal wastewater using a sequencing batch reactor operated at constant volume. **Water Research**, v. 105, p. 341–350, 2016.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DULEKGURGEN, E. et al. How does shear affect aggregation in granular sludge sequencing batch reactors? Relations between shear, hydrophobicity, and extracellular polymeric substances. **Water Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 267–276, 2008.

DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. Singapore: Springer, 2006.

EBRAHIMI, S. et al. Performance and microbial community composition dynamics of aerobic granular sludge from sequencing batch bubble column reactors operated at 20 °C, 30 °C, and 35 °C. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1555–1568, 2010.

EEC COUNCIL. 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban wastewater treatment. **EEC Council Directive**, n. L, p. 10, 1991.

EMF. **Towards the circular economy**. [s.l.: s.n.].

FELZ, S. et al. Extraction of structural extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge. **Journal of Visualized Experiments**, v. (accepted), n. September, p. 1–8, 2016.

FERNANDES, H. **Estrutura da comunidade microbiana e sua influência no desempenho de reatores em bateladas sequenciais em escala real**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 340–346, 1996.

FIGUEROA, M. et al. Nitrogen removal in aerobic granular systems. In: **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution**. Londres: IWA Publishing, 2009. p. 373–401.

FIGUEROLA, E. L. M.; ERIJMAN, L. Bacterial taxa abundance pattern in an industrial wastewater treatment system determined by the full rRNA cycle approach. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 1780–1789, jul. 2007.

FLOWERS, J. J. et al. Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different “Candidatus Accumulibacter” clades. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 6, p. 583–588, 2009a.

FLOWERS, J. J. et al. Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different “Candidatus Accumulibacter” clades. **Environmental microbiology reports**, v. 1, n. 6, p. 583–588, dez. 2009b.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800–1806, 2008.

GEISSDOERFER, M. et al. The Circular Economy – a new sustainability paradigm? **Journal of Cleaner Production**, n. under review, 2016.

GERARDI, M. H. **Troubleshooting the sequencing batch reactor**. New Jersey: [s.n.].

GIESEN, A. et al. Aerobic Granular Biomass Technology: further innovation, system development and design optimisation. **Proceedings of the Water Environment Federation**, v. 2015, n. 16, p. 1897–1917, 1 jan. 2015.

GIESEN, A.; NIERMANS, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Aerobic granular biomass: the new standard for domestic and industrial wastewater treatment? **Water** **21**, v. 4, p. 28–30, 2012.

GIESEN, A.; THOMPSON, A. **Aerobic granular biomass for cost-effective , energy efficient and sustainable wastewater treatment**. 7th European Waste Water Management Conference. **Anais...**2013

GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **Febs Letters**, v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.

GUBSER, N. **Production of alginate-like exopolysaccharides during granular biofilm formation by enriching for Accumulibacter**. [s.l.] Swiss Federal Institute of Technology Zürich., 2015.

GUIMARÃES, L. B. et al. **Exopolysaccharides biorefining from used water: an enterprise in the microbiome of granular sludge**. The 13 Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies. **Anais...**2016

GUIMARÃES, L. B. et al. Microbial pathways of nitrogen removal in aerobic granular sludge treating domestic wastewater. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2017.

GUJER, W. et al. **Activated sludge model No. 3** **Water science and technology**, 1999.

HAN, D. W.; CHANG, J. S.; KIM, D. J. Nitrifying microbial community analysis of nitrite accumulating biofilm reactor by fluorescence in situ hybridization. **Water science and technology**, v. 47, n. 1, p. 97–104, 2003.

HAYASHI, T.; MUKAMEL, S. Two-dimensional vibrational lineshapes of amide III, II, I and A bands in a helical peptide. **Journal of Molecular Liquids**, v. 141, n. 3, p. 149–154, 2008.

HE, S.; XUE, G.; WANG, B. Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 2–3, p. 704–710, 2009.

HEIJNEN, J. J.; KLEEREBEZEM, R. Bioenergetics of Microbial Growth. In: **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**. Hoboken, NJ, USA: John

Wiley & Sons, Inc., 2009.

HELLINGA, C. et al. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 9, p. 135–142, 1998.

HENRY, S. et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, n. 3, p. 327–335, 2004.

HENZE, M. et al. Activated Sludge Model No.2d, ASM2d. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 165–182, 1999.

HENZE, M. et al. **Biological Wastewater Treatment Online Course: Principles, Modeling and Design**. [s.l.] IWA Publishing, 2008.

HUANG, L. et al. Gelation behavior of native and acetylated konjac glucomannan. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 6, p. 1296–1303, 2002.

HUNIK, J. H. Engineering aspects of nitrification with immobilized cells. v. 1, p. 139, 1993.

IPCC. C LIMATE C HANGE 2001 : The Scietific Basis. p. 1–94, 2001.

ISANTA, E. et al. Long term operation of a granular sequencing batch reactor at pilot scale treating a low-strength wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 198–199, p. 163–170, 2012.

JABARI, L. et al. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 2522–2527, 2012.

JABEEN, S. et al. Crosslinking of alginic acid/chitosan matrices using bis phenol-F-diglycidyl ether: mechanical, thermal and water absorption investigation. **International Journal of Plastics Technology**, v. 20, n. 1, p. 159–174, 2016.

JENKINS, D.; TANDOI, V. The applied microbiology of enhanced biological phosphate removal-- Accomplishments and needs. **Water Research**, v. 25, n. 12, p. 1471–1478, 1991.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de esgoto domésticos**. Rio de Janeiro: [s.n.].

JUNG, J. et al. Primers for amplification of nitrous oxide reductase genes associated with firmicutes and bacteroidetes in organic-compound-rich soils. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. 2, p. 307–315, 2013.

JUNGLES, M. K. et al. Start up of a pilot scale aerobic granular reactor for organic matter and nitrogen removal. **Journal of Chemical Technology &**

Biotechnology, v. 86, n. January, p. 763–768, 2011.

JUNGLES, M. K.; CAMPOS, J. L.; COSTA, R. H. R. Sequencing batch reactor operation for treating wastewater with aerobic granular sludge.

Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 31, n. 1, p. 27–33, 2014.

KAMPSCHREUR, M. J. et al. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. **Water Research**, v. 43, n. 17, p. 4093–4103, 2009.

KANEHISA, M. et al. OUP accepted manuscript. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 1–15, 2017.

KARST, S. M. et al. Molecular methods. In: **Experimental Methods in Wastewater Treatment**. London: IWA Publishing, 2016. p. 285–323.

KARTAL, B. et al. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 428–461, 2013.

KERN-JESPERSEN, J.; HENZE, M. Biological Phosphorus Uptake Under Anoxic and Aerobic Conditions. **Water Research**, v. 27, n. 4, p. 617–624, 1993.

KIRCHMAN, D. L. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, n. 2, p. 91–100, fev. 2006.

KOCH, G.; KUHNI, M.; SIEGRIST, H. Calibration and validation of an ASM3-based steady-state model for activated sludge systems-part I: Prediction of nitrogen removal and sludge production. **Water Research**, v. 35, n. 9, p. 2235–2245, 2001.

KONG, Y. et al. Structure and function of the microbial community in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 4061–4073, 2007.

KONG, Y.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H. Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4076–4085, 2005.

KÖNNEKE, M. et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 543–6, 2005.

KRISTIANSEN, R. et al. A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal. **The ISME journal**, v. 7, n. 3, p. 543–554, 2013.

KUBA, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. **Water Research**, v. 30, n. 7, p. 1702–1710, 1996.

LAJOIE, C. A. et al. Zoogeal clusters and sludge dewatering potential in an industrial activated-sludge wastewater treatment plant. **Water Environment Research**, v. 72, p. 56–64, 2000.

LAMEGO NETO, L. G.; COSTA, R. H. R. DA. Tratamento de esgoto sanitário em reator híbrido em bateladas sequenciais: eficiência e estabilidade na remoção de matéria orgânica e nutrientes (N, P). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 4, p. 411–420, 2011.

LAW, Y. et al. Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1593, p. 1265–77, 2012.

LEE, D. J. et al. Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 919–934, 2010.

LEITE, W. R. **Digestão anaeróbia em temperaturas mesofílica e termofílica de lodo de ETE usando reatores de estágio único e dois estágios**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

LEMAIRE, R.; WEBB, R. I.; YUAN, Z. Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater. **The ISME journal**, v. 2, n. 5, p. 528–41, 2008.

LETTINGA, G.; VELSEN, A. F. M. V. A. N.; HOBMA, S. W. Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) Reactor Concept for Biological Wastewater Treatment , Especially for Anaerobic Treatment. v. XXII, p. 699–734, 1980.

LI, A. J. et al. Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3552–3560, 2008.

LI, C. et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 18–25, 2015.

LI, J. et al. Morphological and structural characteristics of aerobic granulation Jiuyi. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p. 823–830, 2006.

LI, J. et al. Aerobic sludge granulation in a full-scale sequencing batch reactor. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LIAU, K. F. et al. Kinetic and stoichiometric characterization for efficient enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process at high temperatures. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 4, p. 729–737, 2015.

LIN, Y. et al. Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated

from aerobic granular sludge in pilot-plant. **Water Research**, v. 44, n. 11, p. 3355–3364, 2010.

LIN, Y.-M.; LIU, Y.; TAY, J.-H. Development and characteristics of phosphorus-accumulating microbial granules in sequencing batch reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 4, p. 430–435, 2003.

LIN, Y. M. et al. Bacterial Alginate Role in Aerobic Granular Bio-particles Formation and Settleability Improvement. **Separation Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1642–1652, 2008.

LIN, Y. M. et al. Sustainable polysaccharide-based biomaterial recovered from waste aerobic granular sludge as a surface coating material. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 4, p. 24–29, 2015.

LIN, Y. M.; SHARMA, P. K.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The chemical and mechanical differences between alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic flocculent sludge and aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 47, n. 1, p. 57–65, 2013.

LIU, Y. et al. Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 26–32, 2005.

LIU, Y.; LIU, Q. S. Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 115–127, 2006.

LIU, Y. Q. et al. 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**, v. 46, n. 6, p. 520–525, 2010.

LIU, Y. Q. et al. Enhancement of start-up of pilot-scale granular SBR fed with real wastewater. **Separation and Purification Technology**, v. 82, n. 1, p. 190–196, 2011.

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**, v. 41, n. 4, p. 516–522, 2007.

LIU, Y.; TAY, J. The essential role of hydrodynamic shear force in the. **Water Research**, v. 36, p. 1653–1665, 2002.

LIU, Y.; TAY, J. H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 7, p. 533–563, 2004.

LIU, Y.; WANG, Z.-W.; TAY, J.-H. A unified theory for upscaling aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **Biotechnology Advances**, v. 23,

n. 5, p. 335–344, 2005.

LOCHMATTER, S.; GONZALEZ-GIL, G.; HOLLIGER, C. Optimized aeration strategies for nitrogen and phosphorus removal with aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 47, n. 16, p. 6187–6197, 2013.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J. C. et al. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 3, p. 399–407, 2004.

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

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LOY, A. et al. probeBase--an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Database issue, p. D800-4, jan. 2007.

LUO, J. et al. Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 62, p. 127–135, 2014.

MAÑAS, A.; BISCANS, B.; SPÉRANDIO, M. Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process. **Water Research**, v. 45, n. 12, p. 3776–3786, 2011.

MAQUELIN, K. et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, n. 3, p. 255–271, 2002.

MASCARENHAS, T.; MIKKELSEN, L. H.; NIELSEN, P. H. Effects of chlorination on the adhesion strength and deflocculation of activated sludge flocs. **Water environment research**, v. 76, n. 4, p. 327–33, 2004.

MASZENAN, A. M. et al. Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. no. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 593–603, 2000.

MATSUMOTO, S. et al. Microbial community structure in autotrophic nitrifying granules characterized by experimental and simulation analyses. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 192–206, 2010.

MAURER, M.; GUJER, W. Monitoring of microbial phosphorus release in batch experiments using electric conductivity. **Water Research**, v. 29, n. 11, p. 2613–2617, 1995.

MCILROY, S. J. et al. MiDAS: The field guide to the microbes of activated sludge. **Database**, v. 2015, n. 2, p. 1–8, 2015a.

MCILROY, S. J. et al. Re-appraisal of the phylogeny and fluorescence in situ hybridization probes for the analysis of the *Campetibacteraceae* in wastewater treatment systems. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 2, p. 166–174, 2015b.

MCILROY, S. J. et al. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 50–64, jan. 2016.

MCCMAHON, K. D.; HE, S.; OEHMEN, A. The microbiology of phosphorus removal. In: SEVIOUR, R. J.; NIELSEN, P. H. (Eds.). . **Microbial Ecology of Activated Sludge**. [s.l.] IWA Publishing, 2010. p. 688.

MCSWAIN, B. S. et al. Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1051–1057, 1 fev. 2005.

MCSWAIN STURM, B. S.; IRVINE, R. L. Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. **Water Science and Technology**, v. 58, n. 4, p. 781–787, 2008.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: treatment and reuse**. [s.l.: s.n.].

MEZZARI, M. P. et al. Assessment of N₂O emission from a photobioreactor treating ammonia-rich swine wastewater digestate. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 327–332, 2013.

MINO, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Review paper - Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. **Wat. Res.**, v. 11, n. 32, p. 3193–3207, 1998.

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**, v. 23, n. 4–6, p. 981–990, 1991.

MOBARRY, B. K. et al. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2156–62, jun. 1996.

MONTOYA, T. et al. Detection and Prevention of Enhanced Biological Phosphorus Removal Deterioration Caused By Zoogloea Overabundance. **Environmental Technology**, v. 29, n. 1, p. 35–42, 2008.

MORGAN-SAGASTUME, F.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H.

Substrate-dependent denitrification of abundant probe-defined denitrifying bacteria in activated sludge. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 2, p. 447–461, 2008.

MORGENROTH, E. et al. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 31, n. 12, p. 3191–3194, 1997.

MORSE, G. K. et al. Phosphorus removal and recovery technologies. **The Science of the Total Environment**, v. 212, p. 69–81, 1998.

MOSERENGELER, R. et al. Products from primary sludge fermentation and their suitability for nutrient removal. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 265–273, 1998.

MOSQUERA-CORRAL, A. et al. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. **Water Research**, v. 39, n. 12, p. 2676–2686, 2005.

MOZUMDER, M. S. I. et al. Effect of heterotrophic growth on autotrophic nitrogen removal in a granular sludge reactor. **Environmental Technology**, v. 35, n. 8, p. 1027–1037, 2014.

MULDER, J. W. et al. Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. **Water Science & Technology**, v. 43, n. 11, p. 127–134, 2001.

NEEF, A. et al. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4329–39, dez. 1996.

NGUYEN, H. T. et al. High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 76, n. 2, p. 256–267, 2011a.

NGUYEN, H. T. T. et al. High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 256–267, 2011b.

NI, B. J. et al. Granulation of activated sludge in a pilot-scale sequencing batch reactor for the treatment of low-strength municipal wastewater. **Water Research**, v. 43, n. 3, p. 751–761, 2009.

NIELSEN, J. L. et al. **FISH Handbook for biological wastewater treatment**. [s.l.: s.n.].

NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H. Enumeration of acetate-consuming bacteria by microautoradiography under oxygen and nitrate respiring conditions in activated sludge. **Water Research**, v. 36, n. 2, p. 421–428,

2002.

NIELSEN, J. L.; SEVIOUR, R. J.; NIELSEN, P. H. Microscopy. In: **Experimental Methods in Wastewater Treatment**. London: IWA Publishing, 2016. p. 263–282.

NIELSEN, P. H. et al. A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. **Water Research**, v. 44, n. 17, p. 5070–5088, 2010.

NIELSEN, P. H. et al. Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater—a model system in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 452–459, jun. 2012.

NIELSEN, P. H.; KEIDING, K. Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide. **Water Research**, v. 32, n. 2, p. 313–320, fev. 1998.

OLIVEIRA, P. K. et al. Análise da composição bioquímica da pele por espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, v. 28, n. 3, p. 278–287, 2012.

OLIVER, B.; THOMPSON, A. **Nereda: a pathway to sustainable wastewater treatment in the UK**. Disponível em: <www.WaterProjectsOnline.com>. Acesso em: 25 abr. 2017.

PATUREAU, D. et al. Denitrification under various aeration conditions in *Comomonas* sp., strain SGLY2. **FEMS microbiology letters**, v. 14, p. 71–78, 1994.

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**, v. 31, n. 6, p. 1363–1370, 1997.

PENG, Y.; ZHU, G. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 15–26, 2006.

PEREIRA, L. et al. Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 223–228, 2003.

PHILIPS, S.; LAANBROEK, H. J.; VERSTRAETE, W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 115–141, 2002.

PINCKEN, S.; ZLOPASA, J.; KOENDERS, E. Stone-hard concrete. **Delft Outlook**, v. 31, n. 2, p. 8–9, 2014.

- POOT, V. et al. Effects of the residual ammonium concentration on NOB repression during partial nitrification with granular sludge. **submitted to Water Research**, v. 106, p. 518–530, 2016.
- PRONK, M. et al. Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment. **Water Research**, v. 84, p. 207–217, 2015.
- PUIG, S. et al. Biological nutrient removal by applying SBR technology in small wastewater treatment plants: Carbon source and C/N/P ratio effects. **Water Science and Technology**, v. 55, n. 7, p. 135–141, 2007.
- QIN, L.; LIU, Y.; TAY, J. H. Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 1, p. 47–52, 2004.
- RIEGER, L. et al. The EAWAG Bio-P module for activated sludge model No. 3. **Water Research**, v. 35, n. 16, p. 3887–3903, 2001.
- ROSS, A. B. et al. Influence of cation on the pyrolysis and oxidation of alginates. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 91, n. 2, p. 344–351, 2011.
- ROTHAUWE, J. H.; WITZEL, K. P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4704–4712, 1997.
- SANGUIN, H. et al. Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for Alphaproteobacteria. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 289–307, 2006.
- SARKER, B. et al. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 11, p. 1470, 2014.
- SARMA, S. J.; TAY, J. H.; CHU, A. Finding Knowledge Gaps in Aerobic Granulation Technology. **Trends in Biotechnology**, v. xx, p. 1–13, 2016.
- SARMA, S. J.; TAY, J. H.; CHU, A. Finding Knowledge Gaps in Aerobic Granulation Technology. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 66–78, 2017.
- SARTORI, C.; FINCH, D. S.; RALPH, B. D e t e r m i n a t i o n of the cation content of alginate thin films by. v. 38, n. 1, p. 43–51, 1997.
- SAUNDERS, A. M. et al. The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. **The ISME Journal**, v. 10, n. 1, p. 11–20, 2016.
- SCHMID, M. et al. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in

situ detection. **Environmental microbiology**, v. 3, n. 7, p. 450–9, jul. 2001.

SCHRAMM, A. et al. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3480–3485, 1998.

SCHULER, A. J.; JENKINS, D. Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewater by Biomass with Different Phosphorus Contents, Part I: Experimental Results and Comparison with Metabolic Models. **Water Environment Research**, v. 75, n. 6, p. 485–498, 1 nov. 2003a.

SCHULER, A. J.; JENKINS, D. Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewater by Biomass with Different Phosphorus Contents, Part I: Experimental Results and Comparison with Metabolic Models. **Water Environment Research**, v. 75, n. 6, p. 485–498, 1 nov. 2003b.

SCHWARZENBECK, N.; ERLEY, R.; WILDERER, P. A. Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. **Water Science & Technology**, v. 49, n. 11–12, p. 41–46, 2004.

SEVIOUR, T. et al. Gel-forming exopolysaccharides explain basic differences between structures of aerobic sludge granules and floccular sludges. **Water Research**, v. 43, n. 18, p. 4469–4478, 2009a.

SEVIOUR, T. et al. Understanding the properties of aerobic sludge granules as hydrogels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1483–1493, 2009b.

SEVIOUR, T. et al. Purification and conformational analysis of a key exopolysaccharide component of mixed culture aerobic sludge granules. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 12, p. 4729–4734, 2010a.

SEVIOUR, T. et al. Structural determination of a key exopolysaccharide in mixed culture aerobic sludge granules using NMR spectroscopy. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 23, p. 8964–8970, 2010b.

SEVIOUR, T. et al. Aerobic sludge granulation: A tale of two polysaccharides? **Water Research**, v. 46, n. 15, p. 4803–4813, 2012.

SEVIOUR, T. W. et al. Selectively inducing the synthesis of a key structural exopolysaccharide in aerobic granules by enriching for *Candidatus “competibacter phosphatis”*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1297–1305, 2011.

SGHIR, A. et al. Quantification of Bacterial Groups within Human Fecal Flora by Oligonucleotide Probe Hybridization Quantification of Bacterial Groups within Human Fecal Flora by Oligonucleotide Probe Hybridization.

Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 5, p. 2263–2266, 2000.

SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; TAY, J. H. Aerobic granulation: Advances and challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 6, p. 1622–1640, 2012.

SMOLDERS, G. J. et al. Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, n. 7, p. 837–848, 1994.

SNIS, S. N. DE I. SOBRE S. **Diagnóstico dos Serviços de água e esgotos - 2015**. [s.l: s.n.].

SNIS, S. N. DE S. A. **Diagnóstico dos serviços de Água e esgoto - 2014**. Brasília: [s.n.].

SOARES, J. P. et al. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Ecl Quim**, v. 29, n. 2, p. 53, 2004.

STAUDT, C. et al. Screening of lectins for staining lectin-specific glycoconjugates in the EPS of biofilms. In: P. LENS et al. (Eds.). . **Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology**. Londres: IWA publishing, 2003. p. 308–326.

SWAMY, T. M. M.; RAMARAJ, B. Sodium Alginate and Poly(ethylene glycol) Blends: Thermal and Morphological Behaviors. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 47, n. 9, p. 877–881, 2010.

TALLEC, G. et al. Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: Effect of oxygenation level. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2972–2980, 2006.

TAMIS, J. **Resource recovery from organic waste streams by microbial enrichment cultures**. [s.l.] Universidade Técnica de Delft, 2015.

TAY, J. H.; LIU, Q. S.; LIU, Y. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1–2, p. 227–233, 2001a.

TAY, J. H.; LIU, Q. S.; LIU, Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 222–226, 2001b.

TRATA BRASIL, S. E SAÚDE. **Estudo mostra que diarreia, dengue e leptospirose crescem em cidades com saneamento básico precário**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/ranking-do-saneamento-das-100-maiores-cidades-2017>>.

USEPA. Wastewater Technology Fact Sheet Dechlorination. **Environmental Protection Agency**, p. 1–7, 2000.

USEPA, U. S. E. P. A. **Nutrient control design manual**. Watertown: EPA, 2010.

VAIOPOULOU, A. E.; AIVASIDIS, B. A. A Modified UCT Method for Enhanced Biological Phosphorus Removal. **Proceedings of European Congress of Chemical Engineering; Copenhagen; Sept. 2007**, n. September, p. 16–20, 2007.

VAN DER ROEST, H. et al. Recovery and reuse of alginate from granular Nereda sludge. **Water21 magazine**, v. 21, p. 48, 2015.

VAN DER ROEST, H. F. et al. Towards sustainable waste water treatment with Dutch Nereda® technology. **Water Practice and Technology**, v. 6, n. 3, 2011.

VAN KESSEL, M. A. H. J. et al. Europe PMC Funders Group Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555–559, 2016.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M. et al. Biological phosphate removal processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 289–296, 1997.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; BRDJANOVIC, D. Anticipating the next century of wastewater treatment. **Science**, v. 344, n. 6191, p. 1452–1453, 2014.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; DE KREUK, M. K. **Method for the treatment of wastewater with sludge granules**, 2004.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; LIN, Y.; LOTTI, T. **Extracellular polymers from granular sludge as sizing agents** Holanda, 2013.

VELHO, V. F. et al. Reduction of excess sludge production in an activated sludge system based on lysis-cryptic growth, uncoupling metabolism and folic acid addition. v. 33, n. 1, p. 47–57, 2016.

VILLASEÑOR, J. C. et al. Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. n. April, p. 323–330, 2016.

VOLTOLINI, C. A. **Avaliação da biodesfocatação e da coprecipitação com Fe e Al em reator em bateladas sequenciais (RBS)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

WAGNER, J. et al. Aerobic granular sludge technology and nitrogen removal for domestic wastewater treatment. **Water Science & Technology**, v. 71, n. 7, p. 1040, 2015a.

WAGNER, J. **Processo de granulação aeróbia em reatores em bateladas sequenciais em condições de baixa carga orgânica**. [s.l.] Universidade

Federal de Santa Catarina, 2015.

WAGNER, J. et al. Effect of particulate organic substrate on aerobic granulation and operating conditions of sequencing batch reactors. **Water Research**, v. 85, p. 158–166, 2015b.

WAGNER, J. et al. Effect of particulate organic substrate on aerobic granulation and operating conditions of sequencing batch reactors. **Water Research**, v. 85, p. 158–166, 2015c.

WAGNER, J.; COSTA, R. H. R. Aerobic Granulation in a Sequencing Batch Reactor Using Real Domestic Wastewater. **Journal of Environmental Engineering**, v. 139, n. 11, p. 1391–1396, 2013.

WAGNER, J.; COSTA, R. H. R. DA. Reator em bateladas sequenciais de grânulos aeróbios: estudo da formação dos grânulos e do efeito da duração do ciclo na remoção de carbono, nitrogênio e fósforo de esgoto doméstico. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, p. 269–278, 2015.

WAGNER, M. et al. In situ Identification of Ammonia-oxidizing Bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 251–264, 1995.

WAGNER, M. et al. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 1–2, p. 237–244, 1996.

WAN, C. et al. Disintegration of aerobic granules: Role of second messenger cyclic di-GMP. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 330–335, 2013.

WANG, F. et al. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers in start-up of aerobic granular sludge reactor. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 8, p. 996–1002, 2007.

WANG, Z. et al. Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors. **Chemosphere**, v. 63, n. 10, p. 1728–1735, 2006.

WANG, Z. W.; LIU, Y.; TAY, J. H. Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 469–473, 2005.

WARD, B. B.; ARP, D. J.; KLOTZ, M. G. **Nitrification**. Washington: IWA Publishing, 2011.

WEBER, S. D. et al. Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6233–6240, 2007.

WEF. **Moving toward resource recovery facilities**. [s.l.: s.n.].

WEISSBRODT, D. G. et al. Bacterial Selection during the Formation of

Early-Stage Aerobic Granules in Wastewater Treatment Systems Operated Under Wash-Out Dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. September, p. 1–22, 2012.

WEISSBRODT, D. G. **Bacterial Resource Management for Nutrient Removal in Aerobic Granular Sludge Wastewater Treatment Systems**. [s.l.] ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE, 2012.

WEISSBRODT, D. G. et al. Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. July, p. 1–18, 2013a.

WEISSBRODT, D. G. et al. Identification of trigger factors selecting for polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **Water Research**, v. 47, n. 19, p. 7006–7018, 2013b.

WEISSBRODT, D. G. et al. Multilevel correlations in the biological phosphorus removal process: From bacterial enrichment to conductivity-based metabolic batch tests and polyphosphatase assays. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 12, p. 2421–2435, 2014.

WEISSBRODT, D. G. et al. **A process engineering vista in the ecogenomics of aerobic-anaerobic ammonium oxidation**. Proceedings of the IWA Nutrient Removal and Recovery Conference: Moving Innovation into Practice. **Anais...**Gdansk, Poland: IWA Publishing, 2015

WEISSBRODT, D. G.; SHANI, N.; HOLLIGER, C. Linking bacterial population dynamics and nutrient removal in the granular sludge biofilm ecosystem engineered for wastewater treatment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, n. 3, p. 579–595, 2014.

WENTZEL, M. C. et al. Kinetics of Biological Phosphorus Release. **Water Science and Technology**, v. 17, n. 11–12, p. 57–71, 1985.

WEST, E. R. et al. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. **Biomaterials**, v. 28, n. 30, p. 4439–4448, 2007.

WHO; UNICEF. **Countries ranked by Improved sanitation facilities (% of population with access)**. Disponível em:

<<http://www.indexmundi.com/facts/indicators/SH.STA.ACSN/rankings>>.

Acesso em: 20 fev. 2017.

WILÉN, B.-M. et al. Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 18, n. 2, p. 145–156, 2000.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In: **Microbial Extracellular**

Polymeric Substances. [s.l.: s.n.]. p. 1–19.

WINKLER, M. K. H. et al. Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1657–1666, 2012a.

WINKLER, M. K. H. et al. Evaluating the solid retention time of bacteria in flocculent and granular sludge. **Water Research**, v. 46, n. 16, p. 4973–4980, 2012b.

WINKLER, M. K. H. et al. Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7447–7458, 2013.

WWC. **A pact for water security.** Marseille: [s.n.].

XAVIER, J. A. **Granulação natural da biomassa em reator operado em bateladas sequenciais para tratamento de esgoto sanitário.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

YAN, L. et al. Simultaneous nitrification and denitrification by EPSs in aerobic granular sludge enhanced nitrogen removal of ammonium-nitrogen-rich wastewater. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 101–106, 2016.

YAN, Y. et al. Structural and functional analysis of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 48, n. 6, p. 585, 2005.

YANG, S. et al. Effects of step-feed on long-term performances and N₂O emissions of partial nitrifying granules. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 682–685, 2013.

YANG, Y. C. et al. Accelerated aerobic granulation using alternating feed loadings: Alginate-like exopolysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 360–366, 2014.

ZHANG, L. et al. Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 551–557, 2007.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D.-J. Aerobic granular processes: Current research trends. **Bioresource Technology**, v. 210, n. January, p. 1–7, 2016.

ZHANG, Z. et al. Complete Monosaccharide Analysis by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. **Analytical Chemistry**, p. 120324151549005, 2012.

ZHENG, Y. M. et al. Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. **Chemosphere**, v. 63, n. 10, p. 1791–1800, 2006.

ZHENG, Y. M.; YU, H. Q. Determination of the pore size distribution and

porosity of aerobic granules using size-exclusion chromatography. **Water Research**, v. 41, n. 1, p. 39–46, 2007.

ZHU, L. et al. Specific component comparison of extracellular polymeric substances (EPS) in flocs and granular sludge using EEM and SDS-PAGE. **Chemosphere**, v. 121, p. 26–32, 2015.

ZIELIŃSKA, M. et al. Community dynamics of denitrifying bacteria in full-scale wastewater treatment plants. **Environmental Technology**, v. 3330, n. May, p. 1–10, 2016.

ZIPPEL, B.; NEU, T. R. Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence lectin-binding analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 505–516, 2011.

ZLOPASA, J. et al. Origin of highly ordered sodium alginate/montmorillonite bionanocomposites. **Macromolecules**, v. 48, n. 4, p. 1204–1209, 2015.

ZLOPASA, J.; KOENDERS, E. A. B.; PICKEN, S. J. **Using bio-based polymers for curing cement-based materials**. AMS 14 Proceedings of the Int. Conference on Ageing of Materials & Structures. **Anais...Delft**: 2014

LISTA DE PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES

ARTIGOS PUBLICADOS

1. **Guimarães, L. B.**; Mezzari, M. P.; Daudt, G. C.; da Costa, R. H. R. Microbial pathways of nitrogen removal in aerobic granular sludge treating domestic wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. (2017). DOI 10.1002/jctb.5176
2. 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*, v. 71, p. 1040, (2015).
3. Leite, W. R. M.; Maffazzioli, E. W.; **Guimarães, L. B.**; Dal Mago, A.; Belli Filho, P. Análise comparativa dos efeitos da carga orgânica e do tempo de detenção hidráulico na digestão anaeróbia mesofílica de lodo adensado de estação de tratamento de esgoto. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.20, n.4, p.581-588, (2015)
4. **Guimarães, L. B.**; Santos, V. Z. R.; Covizzi, L. G.; Garcia-Cruz, C. H. Influência de Diferentes Fontes de Nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Brazilian Journal of Food Technology (Preprint Series)*, v. 12, p. 94-99, (2009).

ARTIGO SUBMETIDO

1. Leite, W. R.; Magnus, B. S.; Gottardo, M.; **Guimarães, L. B.**; Belli Filho, P. Feasibility of thermophilic anaerobic process to treat waste activated sludge under low HRT and intermittent mixing. *Journal of Environmental Management*.

ARTIGOS EM PREPARAÇÃO

(‡ Igual contribuição)

1. **Guimarães, L. B.**‡; Wagner, J.; Akaboci, T. R. V.; Daudt, G. C.; Nielsen, P. H.; van Loosdrecht, M. C. M.; Weissbrodt, D. G.‡; Costa, R. H. R. From failures to successful granular sludge process: Hints for real wastewater treatment under coastal warm climate.
2. Weissbrodt, D. G.‡; **Guimarães, L. B.**‡; Gubser, N. R.; Albertsen, M.; Costa, R. H. R.; van Loosdrecht, M. C. M.; Nielsen P. H.. Intensification and exopolymers biorefining in water resource recovery processes: an enterprise from the microbiome of nutrient-removing granular sludge biofilms.

3. **Guimarães, L. B.‡**; Gubser, N.; Lin, Y.; Zlópasa, J.; Albertsen, M. R.; Costa, H. R.; Nielsen, P. H.; van Loosdrecht, M. C. M.; Weissbrodt, D. G.‡ Alginate-like exopolymer recovery from granular sludge biofilm reactor under conditions selecting for slow-growing PAOs.

TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

(‡ Igual contribuição)

1. **Guimarães, L. B.‡**; Gubser, N. R.; Lin, Y.; Zlópasa, J.; Albertsen, M.; Costa, R. H. R.; Nielsen, P. H.; van Loosdrecht, M. C. M.; Weissbrodt, D. G.‡ Alginate-Like Exopolymer Recovery from Granular Sludge Biofilm Reactor under Conditions Selecting for Slow-Growing PAOs.
In: 10th International Conference on Biofilm Reactors, (apresentação oral) Dublin, Irlanda (2017).
2. **Guimarães, L. B.‡**; Wagner, J.; Akaboci, T. R. V.; Daudt, G. C.; Nielsen, P. H.; van Loosdrecht M. C. M.; Weissbrodt, D. G.‡; da Costa, R. H. R.. From failures to successful granular sludge process: Hints for real wastewater treatment under coastal warm climate.
In: 14th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies. (apresentação *fusion keynote* Guimarães & Weissbrodt), Florianópolis, Brasil (2017).
3. **Guimarães, L. B.‡**; Gubser, N. R. Lin, Y.; Welles, L.; Albertsen, M.; Daudt, G. C.; M. Geleijnse; Costa, R. H. R.; Nielsen, P. H.; van Loosdrecht, M. C. M.; Weissbrodt, D. G.‡ Exopolysaccharides biorefining from used water: an enterprise in the microbiome of granular sludge.
In: 13th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies (apresentação *fusion keynote* Guimarães & Weissbrodt), Jerez de la Frontera, Espanha (2016).
4. **Guimarães, L. B.‡**; Gubser, N. R.; Lin, Y.; Welles, L.; Albertsen, M.; van Loosdrecht, M. C. M.; Nielsen, P. H.; Weissbrodt, D. G.‡ Community systems microbiology of exopolysaccharides biosynthesis and biorefining from used water streams.
In: Danish microbiological Society Annual Congress (apresentação poster), Copenhagen, Dinamarca (2015).
5. **Guimarães, L. B.‡**; Gubser, N. R.; Lin, Y.; Welles, L.; Albertsen, M.; Nielsen, P. H.; van Loosdrecht, M. C. M.; Weissbrodt, D. G.‡ Community systems microbiology of exopolysaccharides biosynthesis and biorefining from used water streams
In: 6 Swiss Microbial Ecology Meeting, Monte Verita (apresentação oral), Ascona, Suíça (2015).

6. **Guimarães, L. B.**; Gubser, N. R.; Daudt, G. C.; Costa, R. H. R.; Lin, Y.; Pronk, M.; Pavissich, J. P.; Zlopasa, J.; Albertsen, M.; Nielsen, P. H.; van Loosdrecht, M. C. M.; Weissbrodt, D. G. Systems microbiology of alginate-like exopolysaccharides biosynthesis in granular sludge biofilms: a pilot and full-scale study with domestic wastewater.
In: 6th Congress of European Microbiologists (apresentação poster), Maastricht, Países Baixos (2015).
7. **Guimarães, L.B.**; Daudt, G. C.; Raspini, J. P.; Strossi, M.; R. H. R. Costa. Estratégias de aeração para remoção de nutrientes de esgoto doméstico em reator aeróbio com biomassa granular.
In: 28 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (apresentação oral) Rio de Janeiro, RJ, Brasil, (2015).
8. Daudt, G. C.; **Guimarães, L. B.**; R. H. R. Costa. Nitrous oxide emission by a pilot scale granular sequencing batch reactor (GSBR).
In: 12th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies. Hong Kong, China (2015).
9. **Guimarães, L. B.**; Daudt, G. C.; Guimarães, A. C.; R. H. R. Costa. Performance de reator com lodo granular aeróbio no tratamento de esgoto sanitário e sua relação com a comunidade microbiana.
In: XXXIV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS) (apresentação oral), Monterrey, México, (2014).
10. Daudt, G. C.; **Guimarães, L. B.**; Neves, A. C. C.; Costa, R. H. R. Monitoramento da emissão de óxido nitroso por um reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios (RBSG) operado em escala piloto.
In: IX International Symposium of Wate Quality (IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental), Porto Alegre, RGS, Brasil (2014).
11. **Guimarães, L. B.**; Wagner, J.; Akaboci, T. R. V.; Jesus, M.; Costa, R. H. R. Microbiological study of nitrogen removal in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor.
In: 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Florianópolis, SC, Brasil (2013).
12. Wagner, J.; Akaboci, T. R. V.; Medeiros, A. F.; **Guimarães, L. B.**; Costa, R. H. R. Processo de granulação aeróbia no tratamento de esgoto sanitário em reator operado em bateladas sequenciais.
In: XV Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, (apresentação oral), Belo Horizonte, MG, Brasil (2012).

13. Akaboci, T. R. V.; Wagner, J.; Demartino, N. M.; **Guimarães, L. B.**; Costa, R. H. R. Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos e partida de reator em bateladas sequenciais de grânulos aeróbios.
In: XXXIII Congresso AIDIS, Salvador, BA, Brasil (2012).
14. **Guimarães, L. B.**; Chiaranda, H. S.; Mezzari, M. P.; Da Silva, M. L. B.; Corseuil, H. X. Uso de ferramenta de biologia molecular na investigação de áreas impactadas por derivados de petróleo.
In: XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVII Encontro Nacional de Perfuradores de poços, (apresentação oral), São Luis, MA, Brasil (2010).
15. Ramos, D. T.; Chiaranda, H. S.; **Guimarães, L. B.**; Da Silva, M. L. B.; Corseuil, H. X. Influência do biodiesel sobre comunidades microbianas em derramamentos subsuperficiais.
In: XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVII Encontro Nacional de Perfuradores de poços, São Luis, MA, Brasil (2010).
16. **Guimarães, L. B.**; Santos, V. Z. R.; Covizzi, L. G; Garcia-Cruz, C. H. Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*.
In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), Brazilian Journal of Food Technology, São Carlos, SP, Brasil (2009).

APÊNDICE A

Material complementar ao Item 3 que corresponde aos materiais e métodos.

Tabela 10: Composição do esgoto sintético e as adaptações realizadas. Composição baseada em Weissbrodt et al. (2013b).

Composto	Fórmula molecular	Unidades	Concentração afluyente		
			Inicial	Dia 30-42	Dia 42-140
Fonte de carbono					
Acetato de sódio	$C_2H_3O_2Na.3H_2O$	$mg_{DQO} L^{-1}$ $mmol_{Ac} L^{-1}$	1000 15,63		
Sulfato de magnésio	$MgSO_4.7H_2O$	$mmol L^{-1}$	0,93		
Cloreto de cálcio	$CaCl_2.2H_2O$	$mmol L^{-1}$	0,25		0,93
Fonte de nutrientes					
Razão C:P		$g_{DQO} gP^{-1}$	8	16	
Fosfato dihidrogenado de potássio	KH_2PO_4	$mg_P L^{-1}$	125	62,5	
Razão C:N		$mmol_P L^{-1}$ $g_{DQO} gN^{-1}$	2,02 20		
Cloreto de amônia	NH_4Cl	$mg_N L^{-1}$ $mol_N L^{-1}$	50 3,57		
Aliltiureia	$C_4H_8N_2S$	$mg L^{-1}$	5,0		
Extrato de levedura		$mg L^{-1}$	2,0		
Peptona		$mg L^{-1}$	2,0		
Caseína		$mg L^{-1}$	2,0		
Solução de elementos traços ^a		$mL L^{-1}$	0,76		

^a (LOPEZ-VAZQUEZ et al., 2009)

A metodologia de FISH pode ser dividida nas seguintes etapas (Figura 43):

1) Coleta e fixação das amostras: a amostra coletada do licor misto foi estocada por no máximo 24 horas em geladeira até ser fixada. A mesma foi lavada em 200 $mmol L^{-1}$ de tampão fosfato de sódio (pH 7,2) e fixada para detecção de bactérias gram negativas através da adição de paraformaldeído (PFA) 4% (3 volume de PFA:1 volume de suspensão de biomassa) e em seguida de etanol (EtOH) 99,9% (1 volume EtOH : 1 volume de suspensão de biomassa). Para a fixação das bactérias gram positivas, não há a adição de PFA, apenas de EtOH na

mesma proporção citada acima. As amostras fixadas foram conservadas e armazenadas em congelador (-20 °C).

2) Corte transversal de grânulos: Após os grânulos serem fixados foram submetidos a corte transversal para a análise da comunidade microbiana nas camadas do grânulo. Preparou-se então fatias de grânulos de 40 µm de espessura a partir de amostra de grânulos fixados, congelados e incorporados em Tissue-Tek® O.C.T. Utilizou-se um criostato (CM 1850, Leica, Alemanha) a -40°C pertencente ao Laboratório Multiusuário de estudos em biologia (LAMEB) da UFSC.

3) Preparação das lâminas e desidratação das células: As fatias dos grânulos foram colocadas em lâminas microscópicas recobertas com Poli-L-Lisina, enquanto as amostras de licor misto homogeneizadas foram dispostas em lâminas recobertas com gelatina (0,1%). As células foram desidratadas em banho de etanol (50%, 80% e 100%).

4) Hibridização das células com as sondas fluorescentes: após desidratadas, as células foram expostas à diferentes concentrações de soluções de formamida (de acordo com o recomendado para cada sonda⁶). Em seguida, foi adicionada a sonda contendo o marcador Cy3 na posição 5' do RNA. Para sondas com sequências similares (menos de três bases diferentes) foram utilizadas sondas competidoras evitando resultado falso-positivo. A hibridização ocorreu em um recipiente fechado e protegido da luz, onde a lâmina foi então incubada por 1,5 a 4 horas a 46°C. Após a incubação, adicionou-se o 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) em uma concentração de 10 µg mL⁻¹ sendo a lâmina posteriormente incubada por mais 20 min a 46°C.

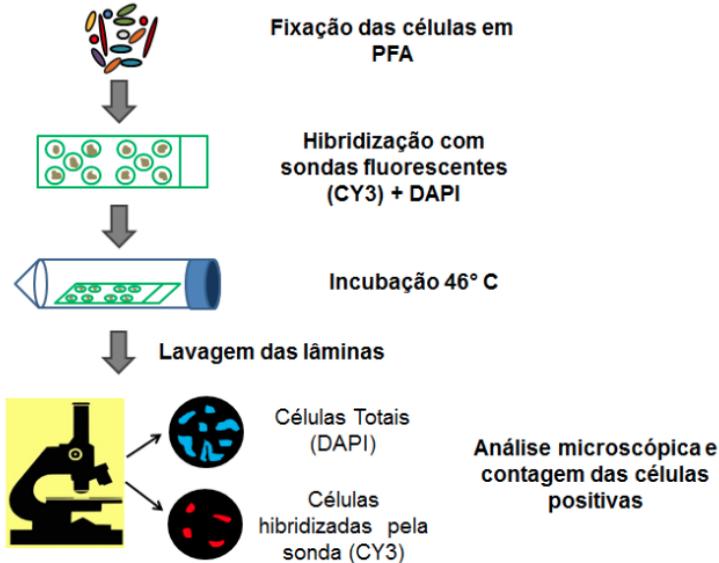
5) Lavagem das lâminas para otimização da estringência: após hibridização, as células foram lavadas para retirada do excesso da solução de formamida e de sonda. Para tanto, foram adicionados 10 µL da solução de lavagem com concentração específica (de acordo com a porcentagem de formamida utilizado na hibridização) para cada sonda e as lâminas foram incubadas por 20 min a 48°C. O tampão de lavagem foi removido com água destilada a 4°C e as lâminas foram secas em local desprovido de iluminação e em temperatura ambiente.

6) Adição de anti “fading” (CitiFluor): algumas gotas da solução de anti “fading” foram adicionadas sobre a amostra a fim de evitar que houvesse perda da fluorescência e posteriormente, coberta com a lamínula.

⁶ Site consultado para obter informações sobre as sondas específicas:
<http://probase.csb.univie.ac.at/>

7) Observação das lâminas em microscópio: a ligação da sonda (com fluorocromo do tipo Cy3) com a sequência complementar no rRNA é detectada por microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus modelo BX-41). Na estimativa de abundância de células hibridizadas com a sequência complementar do rRNA, 10 campos foram escolhidos aleatoriamente e consideradas as células coradas com DAPI como representante de 100% do total de micro-organismos. O processamento das imagens foi realizado utilizando o software ImageJ software (versão 1.50i, USA).

Figura 43: Representação esquemática simplificada da técnica de FISH.



Fonte: Fernandes (2013)

APÊNDICE B

Material complementar ao Item 4, subitem 4.2

ESCLARECENDO FALHAS NO DESEMPENHO DO LODO GRANULAR NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO SOB CONDIÇÕES DE CLIMA SUBTROPICAL

Figura 44: Monitoramento das eficiências de remoção de DQO solúvel e total, nitrogênio amoniaco (NH_4) e fósforo total (P total) no reator RBS com LGA nas duas estratégias operacionais EO1 e EO2.

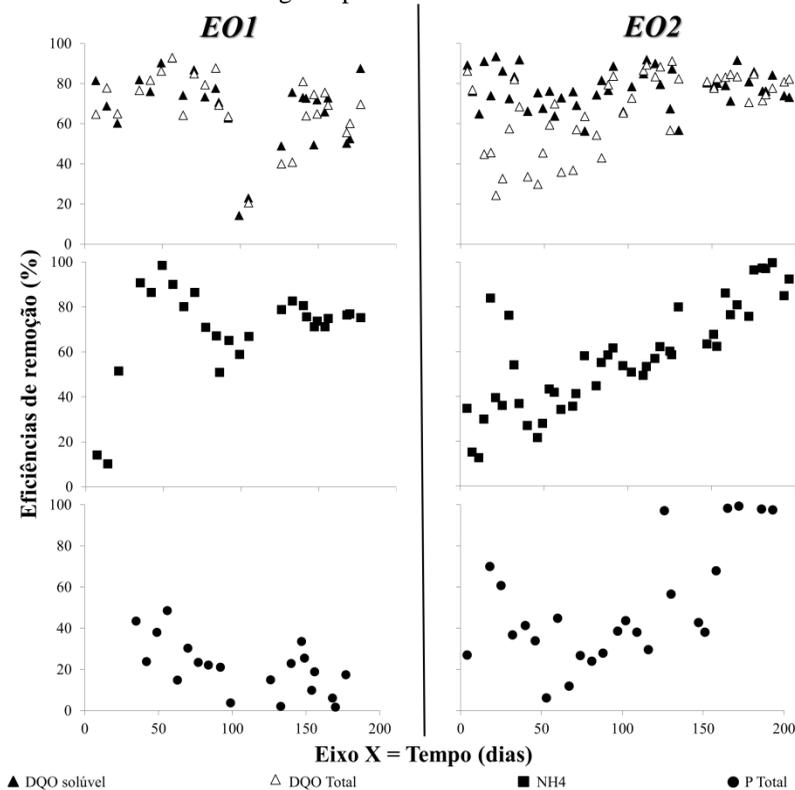


Figura 45: Velocidades volumétricas de consumo de DQO, nitrogênio amoniacal e fósforo ao longo do tempo em cada EO.

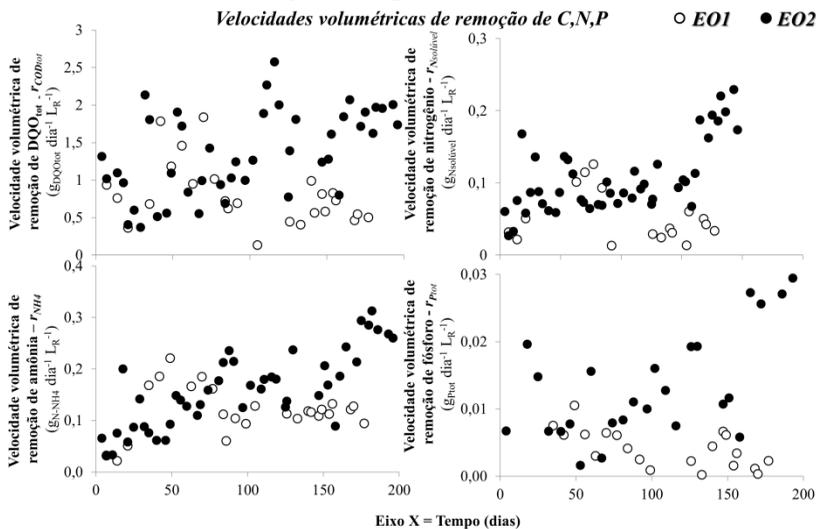


Figura 46: Velocidades específica de consumo de DQO, nitrogênio amoniacal e fósforo ao longo do tempo em cada EO.

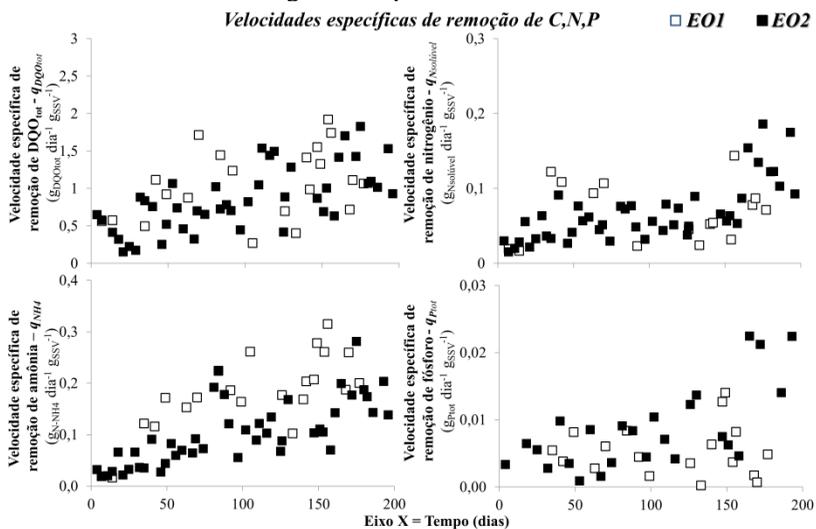


Figura 47: Perfil da temperatura ao longo dos 200 dias operados em cada esta estratégia operacional avaliada.

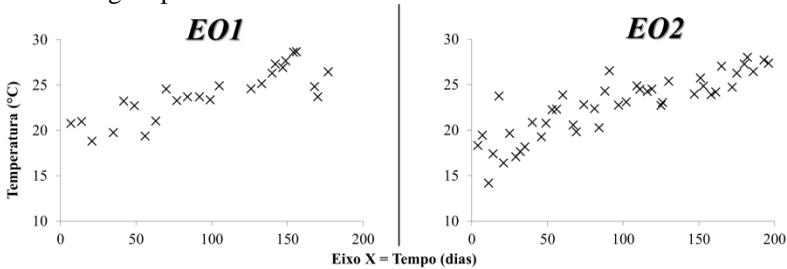


Figura 48: Perfil da carga orgânica volumétrica e específica nas duas EO ao longo de 200 dias. A carga orgânica específica é também conhecida como relação Alimento/Micro-organismo (A/M)

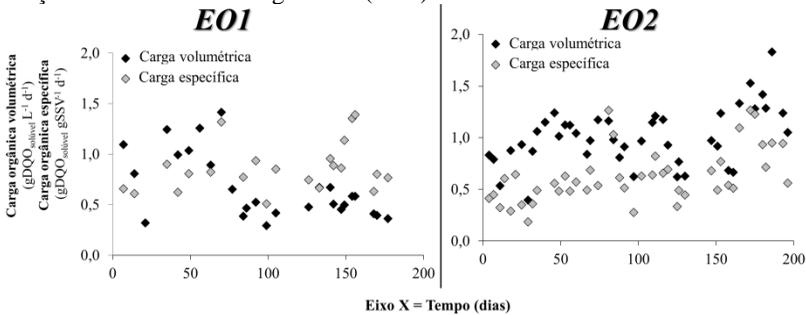


Figura 49: Células bacterianas hibridizadas com as sondas de FISH descritas em cada foto. Imagens de FISH dão suporte aos resultados físico-químicos encontrados e principalmente atua como uma ferramenta auxiliar à técnica de sequenciamento de amplicon.

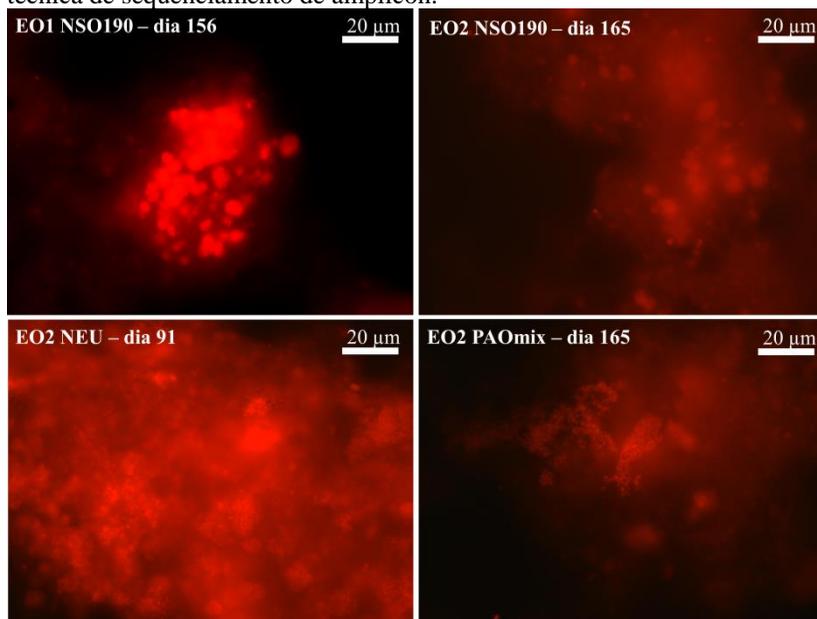
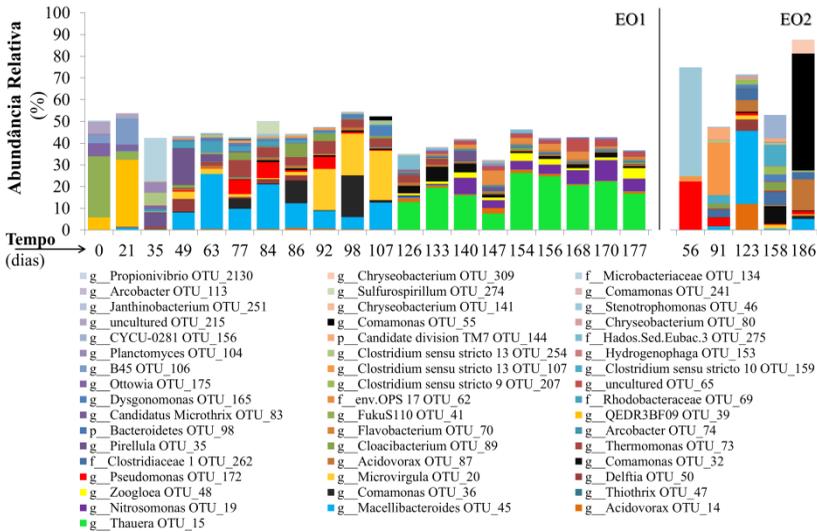


Figura 50: Resultados do sequenciamento de amplicons das amostras coletadas durante EO1 e EO2. OTU com abundância relativa menor que 0,03% não foram inseridos neste gráfico.



APÊNDICE C

Material complementar ao Item 4, subitem 4.4

RECUPERAÇÃO DE EXOPOLÍMERO DO TIPO ALGINATO DE LODO GRANULAR FORMADO POR PAO: “DO LODO RESIDUAL A UM PRODUTO VALORIZADO”

Tabela 11: Coeficiente de Pearson das correlações entre a produção de ALE e as variáveis carga orgânica volumétrica, razão C:P e Ca:Mg, e abundância relativa de PAO e GAO. (n=29)

	Carga $\text{mg}_{\text{Ac}} \text{d}^{-1} \text{L}_{\text{R}}^{-1}$	C:P $\text{mg}_{\text{Ac}} \text{d}^{-1} \text{L}_{\text{R}}^{-1}$	Ca:Mg $\text{mol}_{\text{Ca}} \text{mol}_{\text{Mg}}^{-1}$	ALE $\text{g}_{\text{T.S.ALE}} \text{g}_{\text{V.S.bm}}^{-1}$	PAO (%)	GAO (%)
Carga	1,0	0,9	0,7	0,7	0,7	-0,2
C:P	0,9	1,0	0,8	0,7	0,7	-0,4
Ca:Mg	0,7	0,8	1,0	0,8	0,8	-0,5
ALE	0,7	0,7	0,8	1,0	0,6	-0,3
PAO	0,7	0,7	0,8	0,6	1,0	-0,7
GAO	-0,2	-0,4	-0,5	-0,3	-0,7	1,0

Tabela 12: Lectinas com sinal positivo nas amostras de grânulos enriquecidos com “*Ca. Accumulibacter*”.

Lectinas detectadas	Abreviatura	Especificidade da lectina (Tipo de ligação)
FITC¹		
<i>Musa paradisiaca</i>	Ban	
<i>Helix Pomatia</i>	HPA	α -GalNAc
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LEA	β -GlcNAc, GlcNAc(β 1-4)GlcNAc
<i>Morniga G</i>	MNA-G	Galactose
<i>Vicia graminea</i>	VGA	Gal(β 1-3)GalNAc(α -0-clustered)
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	GlcNAc(β 1-4)GlcNAc, ácido siálico
Alexa488¹		
<i>Aleuria aurantia lectin</i>	AAL	α -Fucose Fuc(α 1-6)GlcNAc, Fuc(α 1-3)GalNAc; Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3/4)]Gal(β 1-4)GlcNAc
<i>Cancer antennarius crude</i>	CCA	Ácido siálico 9-O-Ac-NeuAc>4-O-Ac-NeuAc

¹-Todas as lectinas foram marcadas com corante fluorescente verde, chamadas isotiocianato fluoresceína (FITC) e Alexa Fluor 488. Alexa Fluor 488 é mais fotoestável que FITC.