

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

Bruna Scandolaro Magnus

**EFEITO DA CONFIGURAÇÃO DE CICLO E ROTAS
METABÓLICAS NA PRODUÇÃO E EMISSÃO DE ÓXIDO
NITROSO EM REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM
LODO GRANULAR**

Florianópolis
2019

Bruna Scandolaro Magnus

**EFEITO DA CONFIGURAÇÃO DE CICLO E ROTAS
METABÓLICAS NA PRODUÇÃO E EMISSÃO DE ÓXIDO
NITROSO EM REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM
LODO GRANULAR**

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

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

Florianópolis
2019

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

Magnus, Bruna Scandolara
EFEITO DA CONFIGURAÇÃO DE CICLO E ROTAS
METABÓLICAS NA PRODUÇÃO E EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO EM
REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM LODO GRANULAR /
Bruna Scandolara Magnus ; orientadora, Rejane
Helena Ribeiro da Costa , 2019.
162 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Lodo granular
aeróbio. 3. Emissões de N₂O. 4. Nitrificação e
desnitrificação alternadas. 5. Rotas metabólicas. I.
Ribeiro da Costa , Rejane Helena . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Ambiental. III. Título.



TERMO DE APROVAÇÃO

“Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nítrico em reator em bateladas sequenciais com lodo granular”

BRUNA SCANDOLARA MAGNUS

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 grau de

DOUTOR(A) EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Aprovado por:

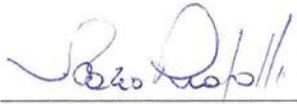


Prof.ª Dr.ª Rejane Helena Ribeiro da Costa
(Orientadora)



Prof. Dr. Paulo Belli Filho

*Prof.ª Alexandra Rodrigues Finotti
Departamento de Engenharia
Sanitária e Ambiental/CTC/UFSC*



Prof. Dr. Flavio Rubens Lapolli



Prof.ª Dr.ª Delmira Beatriz
(videoconferência)

*Prof.ª Alexandra Rodrigues Finotti
Departamento de Engenharia
Sanitária e Ambiental/CTC/UFSC*



Prof.ª Dr.ª Maria Eliza Nagel Hassel
(Coordenadora)

*Prof.ª Alexandra Rodrigues Finotti
Departamento de Engenharia
Sanitária e Ambiental/CTC/UFSC*

Este trabalho é dedicado aos meus pais, José Paulo e Antônia (*in memoriam*), minha segunda mãe, Édna, aos meus queridos avós, Geny e Luiz e ao meu amado noivo, Wanderli, que sempre incentivaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram presentes nesta etapa da minha vida e contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho. Em especial:

À Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU), os quais proporcionaram minha formação acadêmica.

Às instituições financiadoras CNPq, FAPESC e FINEP, que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Aos laboratórios da UFSC que contribuíram com esta pesquisa: LIMA, pela infraestrutura disponibilizada para as análises físico-químicas; GESAD, pelo auxílio no monitoramento do LETA e limpezas realizadas no poço de visita; LARA, pelo empréstimo de uma bomba peristáltica para a realização dos experimentos em escala de bancada; LAMEB e LCME, pela infraestrutura disponibilizada para análises microscópicas; e Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia, pelo suporte na liofilização das amostras para análise de PHB.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), aos professores Mário Kato, Lourdinha Florêncio, Sávia Gavazza e Wanderli Leite, e aos técnicos Ronaldo Fonseca, Danúbia Freitas e Luiz Galdino, por toda a infraestrutura, apoio prestado, gentileza e disponibilidade em me ajudar na realização das análises de íons e PHB. Serei eternamente grata a toda gentileza que recebi desses profissionais e dessa Universidade.

À EMBRAPA, ao Eng. Paulo Armando e ao Eng. Matias Marchesan, pela disponibilidade em emprestar uma sonda excelente para medir N_2O durante um período deste trabalho. Sou muito grata pela sua gentileza e disponibilidade em me ajudar.

Agradeço aos membros da banca e professores Delmira Wolff, Flávio Lapolli e Paulo Belli, pela leitura e contribuições para esta tese.

À minha querida professora Maria Eliza Nagel, que contribuiu muito para minha formação acadêmica. Serei eternamente grata por todo o seu esforço em me ajudar, pela confiança depositada em mim, apoio e torcida durante mestrado e doutorado. Obrigada por ser esta professora e coordenadora sempre disposta auxiliar os alunos.

À minha querida orientadora Rejane Costa, pela excelente orientação, por compartilhar seu valioso conhecimento e por me orientar em diferentes momentos da minha vida e na minha caminhada acadêmica. Sou muito grata por sua dedicação ao meu trabalho, por todo o carinho e amizade que construímos e que levarei para minha vida. Muito obrigada por ser esta supermãe científica (abelha rainha), sempre muito presente e dedicada aos seus orientandos.

À equipe de grânulos do LABEFLU, por toda a parceria e conhecimentos compartilhados. Às minhas grandes amigas Jéssica e Lorena, meus grânulos de ouro, muito obrigada pela paciência e entusiasmo em explicar

tudo sobre processo de granulação, transformações nos ciclos de N, C e P, ensinamentos sobre o reator, atividades em laboratório, apresentações em congressos vividas intensamente, biologia molecular intermináveis, e compartilhamento infinito de artigos novos relacionados à nossa pesquisa. Muito obrigada pelo apoio incondicional e pelas doses diárias de incentivo que vocês me deram. Agradeço ao meu amigo Cássio, por dividir a responsabilidade de cuidar do reator, pelas alegrias, a cada bom resultado obtido ou fotos lindas da microscopia com grânulos, e tristezas, a cada problema no reator (inclusive, finais de semanas, domingo de páscoa e períodos em que eu estava viajando). Foram muitas risadas e conversas construtivas sobre os grânulos, vida profissional e pessoal durante as coletas, que deixaram este período mais alegre e leve na sua companhia. À Viviane por todo o conhecimento compartilhado, pela disponibilidade em me auxiliar nas dúvidas relacionadas ao N_2O , pelo auxílio nos longos experimentos em bancada e, também, pelos ótimos conselhos na vida acadêmica. À minha amiga Dayane, que entrou nas atividades do reator na segunda estratégia, apenas para aprender como trabalhar no bob, e me ajudou muito nas coletas de ciclos semanais. Foram longos ciclos, nos quais tivemos muitos bolinhos, pão de queijo, conversas descontraídas e também muito sérias, que faziam aquelas seis horas de coleta passarem mais rápidas. Ao Gilberto por compartilhar seu conhecimento, e sempre estar disponível para ajudar em minhas dúvidas sobre os cálculos e monitoramento de N_2O . Meu grande agradecimento vai também às melhores bolsistas de iniciação científica e voluntárias: Bianca, Tainara, Júlia, Victoria, Elenita, Camila e Evelin. Serei eternamente grata a vocês, minhas meninas, que tanto se doaram por esta pesquisa, por dividirem comigo e com o Cássio os cuidados com o reator, as análises intermináveis em dias de ciclos ou monitoramento de N_2O , por toda a dedicação, comprometimento e por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido. E ao nosso querido Seu Hélio, pela manutenção e assistência prestada ao nosso reator. Graças aos seus conhecimentos, experiência e disponibilidade, a equipe dos grânulos e o Bob sempre estiveram bem amparados. Muito obrigada meus queridos amigos da equipe de grânulos pela parceria e amizade que construímos! Sem vocês esta tese não seria possível.

À família LABEFLU, que é minha base e apoio desde a graduação, pelos momentos de descontração, cafezinhos após o almoço, pela amizade construída e pelos bons momentos de convivência. À Claudinha, Jorge e Rodrigo, por todo o conhecimento compartilhado, conversas e conselhos divididos sobre a vida acadêmica e pessoal.

Aos queridos amigos Débora Ramos e Marco Gottardo, pela disponibilidade e gentileza em ajudar nos assuntos relacionados aos cálculos estequiométricos e de termodinâmica que foram tão importantes para esta pesquisa.

As minhas amigas de infância, Luiza e Paula, por terem sido um porto seguro aqui em Florianópolis, onde construímos mais memórias da nossa sólida

amizade. Obrigada por toda a cumplicidade, união e amor nestes 20 anos de amizade.

Às minhas grandes amigas da graduação, Jaqueline, Laura, Maria Gabriela, Patrícia, Priscila e Priscilla, pelos momentos de descontração, pelas jantãs venenosas e pela amizade desde 2009.2.

Às amizades que conquistei e fortaleci no PPGEA: Carol, Cássio, Catiane, Dayane, Debora, Franciele, Henrique, Hugo, Isabela, Jamile, Jéssica, Jorge, Juliana, Karina, Katiane, Lorena, Maria Joana, Mayara, Natan, Nelson, Patrícia e Sebastian. Muito obrigada a todos amigos do PPGEA pelos vários momentos de descontração, amizade e pela troca de conhecimentos.

Meus agradecimentos à minha querida amiga Isabela, por todas as sessões de terapia, conselhos compartilhados sobre vida pessoal e profissional, companhia na UFSC nos finais, momentos divertidos e pela amizade.

Às minhas famílias Scandolaro, Magnus e Schefer, pelos momentos de alegria que estão guardados na memória e que fazem a saudade diminuir nos momentos difíceis em que não estamos juntos. Um agradecimento especial à Dona Edyr, por todas as velinhas que acendeu para mim, desde as minhas dificuldades nas recuperações na graduação até os dias de hoje. Muito obrigada também à torcida dos meus tios queridos que eu amo tanto: Erian, Viviane, Eraldo, Eliza, Tiago, Vanuza, Bidi, Fernanda, Jady, Filipe, Iédi e Alexandre.

Ao meu pai e minha boadrasta Édna, minhas irmãs Débora e Laura, meus avós Geny e Luiz, e à mulher da minha vida, minha mãe Antonina, que não está mais entre nós, mas tenho certeza que está sempre comigo, me dando força e me protegendo. Vocês são responsáveis pelas minhas conquistas e pela formação do meu caráter. Agradeço por terem me dado a vida, pelo amor incondicional, por serem meus maiores incentivadores e por não terem medido esforços para oferecer todo o suporte necessário à realização dos meus sonhos. Sempre com muito carinho e dedicação, me ensinaram que o estudo é a melhor herança que a família pode deixar para os filhos. Qualquer palavra de agradecimento é pouco para expressar o quanto sou grata aos meus pais, avós e irmãs.

Ao meu noivo, Wanderli, por ser um dos maiores incentivadores dos meus sonhos e minha maior fonte de força. Você plantou a semente da pesquisa em mim lá na 3ª fase da graduação. E sempre me incentivou a dar o meu melhor e a correr atrás dos meus objetivos. Você é meu exemplo de aluno, pesquisador e professor. Eu serei eternamente grata por tudo que você fez por mim! Por ser este homem de ferro que não me deixou cair em nenhum momento em que eu desanimei. Por me fazer enxergar uma força que eu nem sabia que era capaz de ter. Obrigada por ter vivido tão intensamente todas as etapas da minha formação acadêmica até aqui. Por toda a dedicação a esta tese, por ter virado noites e noites comigo para escrever, mesmo que através do FaceTime. Fizemos da distância algo que nem era percebido nas nossas dificuldades, pois o nosso objetivo final era o mesmo, ficarmos juntos. A nossa história é tão pura e inspiradora que vale os anos de espera, os quilômetros de distância, as lágrimas de saudade, as felizes esperas no aeroporto, e as tristes

despedidas também. E agora, felizmente, estas despedidas tão dolorosas no aeroporto, chegaram ao fim. Obrigada por todo o seu companheirismo e por acreditar que tudo ia dar certo. E com esta pessoa maravilhosa ao meu lado desde 2012, ganhei uma nova família, a Moreira Leite, a qual sou muito grata por todo o carinho, apoio e torcida que recebo. Ao Seu Guilherme e Dona Niza, Nivea e Elias, Augusto e Tatiana, e aos meus queridos sobrinhos, Gabriel, Anabella, João Guilherme e Tales, meu muito obrigada a todo o apoio recebido nesta caminhada. A energia de vocês me deu força e motivação para passar pelos momentos mais desafiadores.

Por fim quero agradecer a uma equipe especial de anjos da guarda que estão aqui na Terra comigo, disfarçados de melhores amigas, amor da minha vida e irmã. São eles: Paula, minha irmã gêmea de coração, que lê meu pensamento em uma troca de olhares; Jéssica, que ora é uma irmã mais nova, a qual tenho que puxar a orelha, ora é uma vó, a qual tem um coração enorme e não deixa me faltar nada (e também porque já têm muitas dores nas juntas-kkk); Maria Joana, que é uma mãezona e psicóloga nas horas vagas, que me dá muita segurança e equilíbrio emocional; Lorena, que ora é minha cunhada, ora é minha irmã mais velha, que consegue, dentro de sua agenda super lotada e dos quilômetros de distância, se doar como uma irmã pela felicidade das amigas; Wanderli, que é meu noivo e melhor amigo, que mergulhou de cabeça comigo desde 2012, no planejamento, construção e realização dos nossos sonhos. Sempre me dando apoio incondicional na graduação, TCC, dissertação, concurso e doutorado; e Débora, que é minha irmã mais nova, a qual tive que puxar orelha, mas que cuida de mim como uma mãe. Vocês foram responsáveis por não me deixarem desistir neste momento final da tese, que foi muito desafiador para mim. Se entregaram de corpo e alma, com esforço físico e mental e com muito apoio psicológico. Vocês me mostraram que, na corrida contra o tempo, eu tinha pessoas maravilhosas não só torcendo, mas me impulsionando o tempo todo para que eu conseguisse atingir o objetivo final. Me faltam palavras (e ar) para expressar minha gratidão a vocês. Cada um me ajudou de uma forma diferente, mas que se completavam perfeitamente nas dificuldades que eu encontrava. Muito obrigada, meus anjos! Vocês são seres humanos muito iluminados e é um prazer imenso poder contar com pessoas tão especiais! Eu amo muito vocês!

*“A kind of magic
One dream, one soul, one prize
One goal, one golden glance of what should be ...*

*...It's a kind of magic
The waiting seems eternity
The day will dawn of sanity*

*Is this a kind of magic?
There can be only one
This rage that lasts a thousand years
Will soon be done”*

(Queen, 1986)

RESUMO

A tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) tem se destacado nas últimas décadas pelo seu ótimo desempenho na remoção simultânea de nitrogênio, carbono e fósforo, em tratamento de efluentes diversos. No entanto, tem-se observado que nos processos de tratamento que têm como objetivo a remoção biológica de nitrogênio, verifica-se a emissão de óxido nitroso (N_2O), que é um importante gás de efeito estufa (GEE). A emissão de N_2O pode estar associada a variáveis operacionais como: baixas concentrações de oxigênio dissolvido (OD); acúmulo de nitrito ou ácido nitroso e variações nas concentrações de nitrogênio amoniacal nas fases aeradas; limitação de fonte de carbono (baixa C:N); fases anóxicas/aeróbias alternadas; e mudanças abruptas no sistema (cargas de nitrogênio, níveis de OD e $N-NO_2^-$). Ademais, estes parâmetros podem provocar alterações na comunidade microbiana e conseqüente variação nos fatores de emissão (FE) de N_2O . Neste sentido, o objetivo desta tese de doutorado foi investigar a produção e a emissão de N_2O , em reator em bateladas sequenciais (RBS) com LGA, operado em regime de nitrificação e desnitrificação alternadas (NDA), no tratamento de esgoto sanitário, por meio de: (1) aplicação de diferentes configurações de ciclo; (2) estudo de rotas metabólicas; e (3) verificação dos efeitos da razão C:N (em termos de $DQO_5:NH_4$). Os efeitos das configurações do ciclo foram avaliados em RBS piloto (110 L): (i) com enchimento único e aeração contínua (NDA_U) e (ii) com enchimento escalonado e aeração intermitente (NDA_E). As rotas metabólicas e os efeitos da razão C:N foram avaliados em ensaios em batelada, usando um reator de bancada (1L), com LGA retirado do RBS piloto. Foram obtidas maiores remoções de nitrogênio total (N_T) e de $N-NH_4^+$ em regime NDA_E (54 e 95%, respectivamente), estando relacionadas à alimentação escalonada e à aeração intermitente, que promoveram a separação temporal da nitrificação e desnitrificação. Porém, esta configuração apresentou maior FE ($157-480 \text{ g N-N}_2\text{O pessoa}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), relacionado à presença de OD na fase anóxica. Verificou-se que gêneros como *Thauera*, que são desnitrificantes heterotróficos, estiveram presentes com abundância relativa de 3,8% (dia 556, NDA_E). Em NDA_U , os maiores FE ($227,5 \pm 41,9 \text{ g N-N}_2\text{O pessoa}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) e conversão de NT a N_2O

(5,9±2,0%) foram associados à atividade de desnitrificação autotrófica por *Nitrosomonas sp.*, no período de temperaturas amenas (20°C). Enquanto a desnitrificação heterotrófica foi a principal via de emissão no período de temperaturas elevadas (25°C) e pode ser associada à presença de *Acidovorax* e *Thermomonas*. Igualmente, organismos de crescimento lento, capazes de desnitrificar e também de remover o fósforo, como *Defluvicoccus* e *Tetrasphaera*, estiveram presentes nessa condição. Nos experimentos em bateladas alimentados com menores relações C:N foram obtidas as maiores emissões de N₂O (conversão de 19 e 18% do NT afluente a N₂O, para DQO:NH₄ = 0 e 1, respectivamente). Do ponto de vista estequiométrico, a relação DQO:NH₄ do substrato que alimentava o RBS piloto não apresentou déficit de elétrons para realização da desnitrificação heterotrófica via N-NO₃⁻. Em conclusão, os reatores em bateladas sequenciais com LGA, em regime de nitrificação e desnitrificação alternadas, emitem uma grande quantidade de N₂O durante o tratamento de esgoto sanitário. O controle das emissões deste GEE inclui a gestão das configurações operacionais do reator, assim como o monitoramento de fatores externos (razão C:N e temperatura), com o propósito de otimizar o tratamento do efluente líquido e minimizar a geração de subprodutos gasosos.

Palavras-chave: Lodo granular aeróbio; Emissões de N₂O; Nitrificação e desnitrificação alternadas; Rotas metabólicas; Relação C:N.

ABSTRACT

Aerobic Granular Sludge (AGS) has recently received growing attention due to its outstanding ability on simultaneously remove nitrogen, carbon and phosphorus from wastewaters. However, a significant greenhouse gas (GEE) production – nitrous oxide (N_2O) has been reported from AGS systems regarding the nitrogen removal. N_2O emissions are related to some operational conditions set in biological reactors, such as: low concentration of dissolved oxygen (DO), nitrite or nitrous acid accumulation or even ammonia nitrogen during aerobic phases, limited carbon source (e.g. low C: N ratio), alternating anoxic/aerated phases and sudden system changes (nitrogen loads, DO or NO_2^- -N concentrations). Besides, such parameters may provide changes on the microbial ecology and deviation on the nitrous oxide emission factor (EF). Considering the aforementioned points, this study aimed to analyze the production and emission of N_2O using sequencing batch reactor (SBR) with AGS and alternating nitrification denitrification (AND) process for nitrogen removal from real sanitary wastewater, considering: (1) different cycle configurations; (2) the study of metabolic pathways; and (3) analyze the effect of C/N ratios (expressed as DQOs: NH_4) in the substrate. The influence of cycle configuration on nitrogen removal was performed in a pilot-scale 110L SBR, taking into account (i) single feeding and continuous aeration (AND_S) and (ii) step-feeding and intermittent aeration (AND_I). Metabolic pathways and C: N ratios were evaluated in batch tests using a 1L bench-scale reactor and AGS as inoculum collected in the pilot-scale RBS. Higher removal efficiencies of total (TN) and ammonia nitrogen (NH_4^+ -N) were achieved in the AND_I strategy (54 and 95%, respectively), being were addressed to the step-feeding and intermittent aeration which detached the nitrification from the denitrification phase. However, this configuration presented higher EF ($157\text{-}480 \text{ g N}_2\text{O-N person}^{-1} \text{ year}^{-1}$), related to the presence of OD in anoxic phase. It was found that genera such as *Thauera*, which are heterotrophic denitrifiers, were present with a relative abundance of 3.8% (day 556, AND_I). In AND_S , the highest EF ($227.5 \pm 41.9 \text{ g N}_2\text{O-N person}^{-1} \text{ year}^{-1}$) and NT to N_2O conversion ($5.9 \pm 2.0\%$) were associated with autotrophic denitrification by *Nitrosomonas sp.* in the period of low temperatures (20°C). While heterotrophic denitrification was the main N_2O emission pathway in the warmer temperature period (25°C) and may be associated with the presence of *Acidovorax* and *Thermomonas*. Likewise, slow-growing organisms

capable of denitrification and also of removing phosphorus, such as *Defluvicoccus* and *Tetrasphaera*, were present in this condition. In the batch experiments fed with lower C:N ratios the highest N₂O emissions were obtained (conversion of 19 and 18% of the tributary NT to N₂O, for COD: NH₄ = 0 and 1, respectively). Nitrous oxide emissions were higher in lab-scale sequencing batch reactors fed with low C:N substrates (around 19 and 18% of TN converted into N₂O, considering COD:NH₄ ratios of 0 and 1, respectively). From a stoichiometry perspective the substrate COD:NH₄ ratio fed in the pilot-scale reactor did not present electron-deficiency to support the heterotrophic denitrification via NO₃⁻-N. This research, therefore, showed that sequencing batch reactors with AGS emit large amounts of nitrous oxide across the sewage treatment. Controlling this GHG emission includes the management of operational configurations of the reactor, as well as the monitoring of external factors (such as C:N ratio and temperature), in order to optimize the treatment of the liquid effluent and minimize the production of gaseous by-products.

Key-words: Aerobic granular sludge; N₂O emissions; Alternating nitrification denitrification; Metabolic pathways; C:N ratio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Roadmap das pesquisas do grupo LABEFLU com LGA e emissões de N_2O e da presente pesquisa.	32
Figura 2 - Representação esquemática do processo de formação de grânulos aeróbios em reatores em bateladas sequenciais.	36
Figura 3 - Conversões biológicas do nitrogênio.	39
Figura 4 - Modelo conceitual dos principais processos biológicos na remoção de carbono e nitrogênio (NDS) em lodo granular.	43
Figura 5 - Vias metabólicas dos microrganismos responsáveis pelas transformações no ciclo do nitrogênio (N). Os compostos são posicionados de acordo com o estado de oxidação de N. As linhas sólidas coloridas indicam as vias microbianas, e o genes que codificam as respectivas enzimas que participam de cada processo.	52
Figura 6 - Vias relevantes de produção de N_2O no tratamento biológico de águas residuárias. A) N_2O produzido através de oxidação da NH_2OH (1) e desnitrificação autotrófica (2); B) N_2O é um intermediário obrigatório na desnitrificação heterotrófica (3).	54
Figura 7 - Fluxograma do delineamento experimental.	59
Figura 8- Esquema do sistema experimental utilizado.	60
Figura 9 - Dimensões do reator piloto RBS com lodo granular utilizado nesta pesquisa.	61
Figura 10- Configurações operacionais NDA_U e NDA_E	63
Figura 11 - Esquema ilustrativo dos experimentos realizados em escala de bancada.	64
Figura 12 - Diagrama das transformações de nitrogênio esperadas com os experimentos em condições anóxicas. (A) com ATU; (B) com ATU e $NaClO_3$	66
Figura 13 - Diagrama das transformações de nitrogênio esperadas com os experimentos em condições aeróbias. (A) sem adição de inibidores; (B) com adição de $NaClO_3$; (C) com adição de ATU e $NaClO_3$	68
Figura 14- Fotos do RBS piloto (A) aparato experimental em bancada (B) e das sondas utilizadas para medir o óxido nítrico dissolvido (C) e gasoso (D).	71
Figura 15 - Comportamento genérico da variação da concentração de N_2O ao longo do tempo e área hachurada do gráfico utilizada no cálculo da emissão de N_2O em um ciclo operacional.	78
Figura 16- Concentração da biomassa no reator e temperatura do esgoto afluyente (A); e sedimentabilidade do lodo (IVL) durante a NDA_U e a NDA_E	85

Figura 17- <i>Aelosoma hemprichi</i> na biomassa durante a configuração NDA _U antes do controle da idade do lodo.....	86
Figura 18 - Evolução da distribuição do tamanho da partícula (A) e desenvolvimento de grânulos aeróbios ao longo do período de estudo (B).	88
Figura 19 - Séries temporais afluentes e efluentes e eficiências de remoção de: DQO _S e bDQO _S (A, B); P _T (C); e N-NH ₄ ⁺ (D) para ambas as configurações operacionais.....	91
Figura 20 - Perfis de OD, PO ₄ ³⁻ -P, DQO _S e teor de PHB na biomassa, durante um ciclo operacional padrão em regime NDA _U (A) e NDA _E (B).	93
Figura 21 - Velocidades de liberação de fósforo (qP liberação) e de absorção (qP absorção) calculadas nas configurações operacionais.	94
Figura 22 - Velocidade específica produção e consumo de NOx-N em ambas configurações.	98
Figura 23- Perfil operacional dos compostos nitrogenados e amônia livre (A, C) e balanço de massa para cada configuração operacional (B, D). 99	
Figura 24 - Fator de emissão e NT afluente emitido como N-N ₂ O (A, B), emissão e produção de N-N ₂ O (C, D) e N-N ₂ O acumulado (E, F) durante os ciclos em ambas as configurações.	102
Figura 25 - Dinâmica da comunidade bacteriana nas configurações testadas. OTUs com abundância relativa menor que 2% foram incluídos em “outros”.	104
Figura 26- Fração de lodo granular no RBS piloto.	109
Figura 27- Variação dos fatores de emissão de óxido nitroso, conversão de nitrogênio total afluente a óxido nitroso e temperatura ao longo do tempo.	111
Figura 28- Perfil das emissões de N ₂ O, concentrações de N ₂ O dissolvido na fração líquida (A, C) e concentrações de N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₂ ⁻ e N-NO ₃ ⁻ (B, D) ao longo de um ciclo operacional do RBS para os períodos de inverno e verão.....	114
Figura 29-Rotas metabólicas na produção de N ₂ O durante os experimentos anóxicos.....	116
Figura 30 - Produção e emissão de N ₂ O nos experimentos aeróbios em bateladas para o período do inverno.....	118
Figura 31 - Produção e emissão de N ₂ O nos experimentos aeróbios em bateladas para o período do verão.	118
Figura 32- Células bacterianas hibridizadas com a sonda NEU (à esquerda) e DAPI (à direita) no ciclo operacional realizado no inverno.	121

Figura 33-Perfil do ciclo operacional no RBS piloto com LGA: DQO _s e OD (A); N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₂ e N-NO ₃ ⁻ (B); e produção e emissão de N ₂ O (C).	126
Figura 34-Comportamento das concentrações de N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₂ ⁻ , N-NO ₃ ⁻ , e produção e emissão de N ₂ O nos experimentos em bateladas simulando um ciclo de RBS sob as diferentes razões DQO:NH ₄ . A e B DQO:NH ₄ = 3 (A, B); DQO:NH ₄ = 5 (C, D); DQO:NH ₄ = 1 (E, F); DQO:NH ₄ = 0 (G, H).....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Emissões de N ₂ O em escala laboratorial e real.	49
Tabela 2 - Visão geral dos principais fatores que intensificam as emissões de N ₂ O no tratamento de esgoto sanitário.....	57
Tabela 3- Características do esgoto sanitário durante as duas configurações operacionais aplicadas.	62
Tabela 4 - Métodos e frequência das análises físico-químicas realizadas.	69
Tabela 5 - Eficiências de remoção, valores médios efluente, velocidade de remoção volumétrica e específica de carbono e fósforo nas duas configurações.	90
Tabela 6 - Eficiências de remoção, valores médios efluentes, velocidade de remoção volumétrica e específica dos compostos nitrogenados nitrogênio nas duas configurações operacionais estudadas.	97
Tabela 7-Eficiências de remoção das principais variáveis físico-químicas de monitoramento do RBS piloto.	108
Tabela 8- Valores médios dos parâmetros de emissão de óxido nitroso no RBS ao longo do período operacional.....	110
Tabela 9-Abundância relativa dos microrganismos observados a nível de gênero durante o período de inverno e verão(acima de 2%).	120
Tabela 10-Características do esgoto sanitário, concentrações efluentes e eficiências de remoção para os principais parâmetros no RBS piloto.	124
Tabela 11-Razões DQO:NH ₄ utilizadas nos experimentos em batelada.	128
Tabela 12-Valores dos parâmetros de emissão de óxido nitroso nos experimentos em bateladas com diferentes razões DQO:NH ₄	131
Tabela 13- Cálculos estequiométricos de demanda por elétrons para desnitrificação heterotrófica utilizando o carbono orgânico do esgoto.	132
Tabela 14 - Síntese dos principais resultados obtidos durante: as configurações NDA _U e NDA _E (<i>capítulo 1</i>); os experimentos em escala de bancada para identificação das rotas metabólicas (<i>capítulo 2</i>) e avaliação do efeito das diferentes razões C:N (<i>capítulo 3</i>) na produção e emissão de N ₂ O.	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL – Amônia Livre
AN – Amonificação do Nitrato
CV – Carga Volumétrica Aplicada
COP – Conferência das Partes
CLP – Controlador Lógico Programável
DA – Desnitrificação autotrófica
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
DBO_{5,20} - Demanda Bioquímica de Oxigênio referente a5 dias a 20° C
DQO_S - Demanda Química de Oxigênio solúvel
DQO_T - Demanda Química de Oxigênio total
DH – Desnitrificação heterotrófica
ENS - Departamento de Engenharia Sanitária eAmbiental da UFSC
EPS - Substância Polimérica Extracelular
ETE - Estação de Tratamento de Efluentes
FE - Fator de Emissão
FEBV - Fator de Emissão Baseado na Vazão
FL - Fator de Lançamento
FLBV - Fator de Lançamento Baseado na Vazão
GEE - Gases de Efeito Estufa
IPCC - Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas
IVL - Índice Volumétrico de Lodo
LA – Lodos ativados
LABEFLU - Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos
LGA - Lodo Granular Aeróbio
LSA- Laboratório de saneamento ambiental
LIMA - Laboratório Integrado de Meio Ambiente
MOP – Reunião das Partes no Protocolo de Quioto
NDA - Nitrificação e Desnitrificação Alternadas
NDA_E - Nitrificação e Desnitrificação Alternadas com enchimento escalonado
NDA_U- Nitrificação e Desnitrificação Alternadas com enchimento único
NDS - Nitrificação e Desnitrificação Simultâneas
NT - Nitrogênio Total
OD - Oxigênio Dissolvido
pH - Potencial hidrogeniônico
PPM - Partes por milhão
Ppmv - Partes por milhão, em volume
RAN – Razão de acúmulo de nitrito

RBN - Remoção Biológica de Nitrogênio
RBS - Reator em Bateladas Sequenciais
SST - Sólidos Suspensos Totais
SSV - Sólidos Suspensos Voláteis
TRS – Tempo de retenção de sólidos (TRS)
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
UNFCCC – Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre a Mudança do
Clima
USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	29
1.1 HIPÓTESES.....	33
1.2 QUESTÕES DA PESQUISA.....	33
1.3 OBJETIVOS	34
1.3.1 Objetivo geral	34
1.3.2 Objetivos específicos	34
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	35
2.1 TECNOLOGIA DE LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA) PARA O TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO	35
2.1.1 Fatores que influenciam a granulação aeróbia.....	37
2.2 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	38
2.2.1 Nitrificação e desnitrificação.....	38
2.2.2 Nitrificação – desnitrificação via nitrito.....	41
2.3 REMOÇÃO SIMULTÂNEA DE NITROGÊNIO, CARBONO E FÓSFORO EM LGA	42
2.4 EMISSÕES DE GEE NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO	45
2.5 EMISSÕES DE N ₂ O NO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ESGOTO SANITÁRIO	46
2.6 ROTAS METABÓLICAS DE PRODUÇÃO DE N ₂ O.....	51
2.7 FATORES QUE INTENSIFICAM AS EMISSÕES DE N ₂ O ...	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1 SISTEMA EXPERIMENTAL	59
3.1.1 Características gerais.....	59
3.1.1.1 Operação do reator	62
3.1.2 Experimentos em bateladas – escala de bancada	64
3.1.2.1 Experimento em batelada I – Identificação das rotas metabólicas de produção e emissão de N ₂ O nos processos de nitrificação e desnitrificação	65
3.1.2.2 Experimento em batelada II –Efeito da razão carbono nitrogênio na produção e emissão de N ₂ O.....	68
3.2 MONITORAMENTO DO SISTEMA EXPERIMENTAL	69
3.2.1 Parâmetros Físico-Químicos	69
3.2.2 Índice Volumétrico de Lodo (IVL)	71
3.2.3 Granulometria	72
3.2.4 Análise microbiológica.....	73
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
3.4 CÁLCULOS.....	74
3.4.1 Carga volumétrica aplicada (CV).....	74
3.4.2 Tempo de retenção de sólidos (TRS)	74

3.4.3	Amônia livre (AL)	74
3.4.4	Velocidade de remoção volumétrica de substrato ($rDQO$, rNH_4 , rP_T)	75
3.4.5	Velocidade de remoção específica de substrato ($rDQO$, rNH_4 , rP_T)	75
3.4.6	Cálculos referentes ao óxido nitroso	76
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	83
4.1	AVALIAÇÃO DE CONFIGURAÇÕES OPERACIONAIS NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO EM UM REATOR COM LGA, COM FOCO NA PRODUÇÃO E EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO	83
4.1.1	Caraterização do lodo granular	84
4.1.2	Desempenho do reator no tratamento de esgoto sanitário para carbono e fósforo ao longo das configurações NDA_U e NDA_E	90
4.1.2.1	Remoção de DQO	90
4.1.2.2	Remoção de Fósforo.....	92
4.1.2.3	Remoção de nitrogênio, produção e emissão de N_2O	96
4.1.3	Comunidade bacteriana.....	103
4.1.4	Conclusões.....	106
4.2	PRODUÇÃO/EMISSÃO DE N_2O E ROTAS METABÓLICAS EM REATOR DE LODO GRANULAR AERÓBIO TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO.....	107
4.2.1	Desempenho do reator e características da biomassa granular	108
4.2.2	Características de emissões de N_2O ao longo da configuração operacional NDA_U	109
4.2.3	Experimentos em bateladas – identificação das rotas metabólicas envolvidas nas emissões de N_2O no LGA	113
4.2.4	Comunidade microbiana	119
4.2.5	Conclusões.....	122
4.3	EFEITO DA RAZÃO CARBONO NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO E EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO EM REATOR COM LODO GRANULAR AERÓBIO.....	123
4.3.1	Desempenho do reator e produção/emissão de N_2O	124
4.3.2	Experimentos em bateladas – avaliação do efeito de diferentes razões $DQO:NH_4$ na produção e emissão de N_2O	128
4.3.3	Estimativa da DQO consumida pela desnitrificação heterotrófica.....	132
4.3.4	Conclusões.....	134
5	DISCUSSÃO INTEGRADA	135
6	CONCLUSÕES	141
7	RECOMENDAÇÕES	143
	REFERÊNCIAS	145

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O processo de lodos ativados (LA) tem sido uma das tecnologias mais aplicadas nos sistemas de tratamento biológico de esgoto sanitário, por ser capaz de obter remoções de matéria orgânica, e em condições específicas, nitrogênio e fósforo. No entanto, para que ocorra a remoção biológica de nutrientes, são exigidos diferentes ambientes reacionais, onde são aplicadas condições anaeróbias, anóxicas e aeróbias. Além disso, essa tecnologia apresenta como principais inconvenientes: (i) problemas na sedimentação da biomassa, os quais comprometem a qualidade do efluente final; e (ii) exigência de grandes áreas para dispor os decantadores secundários (SARMA; TAY; CHU, 2017).

A tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) tem se destacado nas últimas décadas pelo seu ótimo desempenho na remoção simultânea de nitrogênio, carbono e fósforo, em tratamento de efluentes domésticos e industriais (WINKLER *et al.*, 2018). Ela é aplicada preferencialmente em reatores em bateladas sequenciais (RBS), os quais dispensam o uso de decantadores secundários, reduzindo a demanda por área de implantação, quando comparados a sistemas de tratamentos com lodos ativados convencionais (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005).

Apesar de ser uma tecnologia estudada desde a década de 90, muitos desafios ainda envolvem o LGA, para que se tenha um bom desempenho no tratamento de esgoto sanitário. Uma combinação de condições operacionais, que controlem a formação de grânulos, deve ser aplicada para garantir a estabilidade e o alto desempenho do sistema. Dados como o tempo de sedimentação e a duração de fases de reações específicas, aplicadas para remoções de carbono e nutrientes, precisam de adaptações ao projeto do reator. As estratégias de operação devem considerar ainda a composição do esgoto sanitário, cargas aplicadas e condições climáticas locais (QIN; LIU; TAY, 2004; WINKLER *et al.*, 2018).

A respeito da remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo, ainda pode-se considerar incipiente o conhecimento sobre o controle dos fatores principais, que regulam a ocorrência e o desempenho dos microrganismos envolvidos em cada processo. Vale destacar que remover os nutrientes de uma fase e transferi-los para outra, pode ocasionar impactos maiores no meio ambiente. Na remoção biológica de nitrogênio (RBN), pode-se ter, por exemplo, como consequência negativa, a transferência de contaminantes da fase líquida

para a fase gasosa, como a geração de óxido nitroso (N_2O) (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009).

O N_2O é o terceiro gás de efeito estufa mais abundante na atmosfera, e também tem o maior potencial de destruição da camada de ozônio (RAVISHANKARA; DANIEL; PORTMANN, 2009). Nos últimos anos, as estações de tratamento de efluentes (ETE) receberam atenção por serem consideradas fontes antropogênicas de emissão de óxido nitroso (LAW *et al.*, 2012). As emissões de N_2O provenientes dos processos de tratamento de esgoto sanitário aumentaram 44%, entre 1990 e 2014 (VASILAKI *et al.*, 2019). Pesquisas têm mostrado que tais emissões, durante os processos biológicos de tratamento de esgoto sanitário, podem aumentar a pegada de carbono entre 78 e 83% (DAELMAN *et al.*, 2013; DESLOOVER *et al.*, 2012). Nesse sentido, as preocupações ambientais relacionadas às emissões de gases de efeito estufa (GEE) nas estações de tratamento de efluentes têm atraído a atenção mundial (VASILAKI *et al.*, 2019; MANNINA *et al.*, 2016; MASSARA *et al.*, 2017).

No tratamento de efluentes, o óxido nitroso é produzido através de várias reações microbiológicas durante os processos autotróficos e heterotróficos, os quais requerem condições aeróbias ou anóxicas (VASILAKI *et al.*, 2019). Três principais rotas de produção e emissão de N_2O foram identificadas nos sistemas RBN, as quais resultam da oxidação incompleta de hidroxilamina (NH_2OH) pelas bactérias oxidadoras de amônia (AOB, do inglês, *ammonium-oxidizing bacteria*), ou por desnitrificação autotrófica realizada pelas AOB, ou desnitrificação heterotrófica (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009).

Com base no conhecimento das rotas de emissão de N_2O , estudos recentes sugerem que as principais variáveis operacionais responsáveis pela emissão desse gás nos sistemas de tratamento de efluentes são: (i) baixa concentração de oxigênio dissolvido (OD), acúmulo de nitrito ($N-NO_2^-$) ou ácido nitroso (HNO_2) e variações nas concentrações de nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$) nas zonas nitrificantes, (ii) limitação do substrato orgânico (baixa relação C/N), (iii) fases anóxicas/aeróbias alternadas, e (iv) mudanças abruptas no sistema (cargas de nitrogênio, níveis de OD e $N-NO_2^-$) (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009; MASSARA *et al.*, 2017; DUAN *et al.*, 2017).

Os primeiros estudos focaram em efeitos operacionais que influenciam as emissões de N_2O em ETE, como por exemplo, concentração de OD, concentração de nitrito e pH. Kampschreur *et al.* (2008) reportaram que a baixa concentração de OD aumenta as emissões de N_2O em sistemas de nitrificação e desnitrificação, no entanto, esses

autores observaram também que, em um sistema de remoção de nitrogênio, via processo de nitrificação parcial, como Anammox, a baixa concentração de OD reduz as emissões de N_2O (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Lochmatter *et al.* (2013), estratégias de aeração para promover a nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) e alternadas (NDA) foram adotadas no tratamento de esgoto sintético com LGA, para avaliar o melhor desempenho do reator e as emissões de N_2O . Os autores concluíram que a estratégia NDA foi significativamente mais eficiente na remoção de nitrogênio e apresentou menores emissões de N_2O .

Resultados contraditórios foram encontrados para emissões de N_2O quando avaliados em relação à concentração de nitrito. Segundo Peng *et al.* (2015a), altas concentrações de $N-NO_2^- (> 10 \text{ mg L}^{-1})$ aumentaram a produção e emissão de N_2O em um RBS em escala laboratorial, alimentado com esgoto sintético, para obter um lodo enriquecido com AOB e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB). Em contrapartida, Law *et al.* (2012) mostraram que altas concentrações de $N-NO_2^- (500-600 \text{ mg L}^{-1})$ não resultaram em maior a emissão de N_2O em reatores com processos de nitrificação parcial.

Não há uma clara convergência de ideias no entendimento e na tomada de decisão para mitigar a emissão de N_2O em ETE, por isso, para entender melhor os efeitos das condições operacionais, é necessário o conhecimento das rotas metabólicas da produção e da emissão de N_2O em reatores biológicos.

A disponibilidade limitada de fonte de carbono biodegradável pode aumentar a emissão de N_2O durante a desnitrificação (CHUNG; CHUNG, 2000). Segundo Hanaki, Hong e Matsuo (1992), as emissões de N_2O em sistemas de tratamento de esgoto alimentados com baixa razão C:N podem aumentar até 10%. Com uma baixa disponibilidade de fonte de carbono externa, os microrganismos podem utilizar uma fonte de carbono interna, que está armazenada na forma de polihidroxialcanoato (PHA), para promover a desnitrificação. Os PHA por sua vez, possuem uma degradabilidade lenta, o que ocasiona um aumento na produção e emissão de N_2O (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2012).

Verifica-se que muitos estudos têm sido realizados sobre as emissões de N_2O a partir do tratamento de esgoto sanitário, no entanto, a maioria das pesquisas se concentra em sistemas de tratamento com LA, enquanto as emissões de N_2O em LGA no tratamento de esgoto sanitário real recebem menos atenção. Os processos de emissões de N_2O em

sistemas com biofilme ocorrem de forma mais complexa, sendo necessário considerar a difusão de substrato e a competição dos microrganismos nos processos de transformação do nitrogênio (TODT; DÖRSCH, 2016). Desta forma, diante da enorme variação de fatores operacionais, climáticos e microbiológicos, é crescente a busca por um melhor entendimento dos fatores que controlam a produção e a emissão de N_2O em LGA.

No Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental do Centro Tecnológico, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), alguns trabalhos referentes à tecnologia de biomassa granular aeróbia vêm sendo realizados desde 2011 (Figura 1).

Figura 1 - Roadmap das pesquisas do grupo LABEFLU com LGA e emissões de N_2O e da presente pesquisa.



Fonte: O Autor.

Os primeiros trabalhos avaliaram a granulação para diferentes tipos de substrato e condições operacionais (JUNGLES, 2011; WAGNER, 2011). Além desses, foram explorados também a modelagem matemática (AKABOCI, 2013), a remoção de nitrogênio por assimilação e o efeito do material particulado na granulação (WAGNER, 2015) e, mais recentemente, Daudt (2015), Magnus (2017) e Daudt (2019) realizaram estudos sobre as emissões de N_2O em reator com LGA. Em paralelo, Xavier (2017), Guimarães (2017) e Domingos (2019) estudaram a granulação natural da biomassa; a caracterização microbiológica do LGA e potencial de recuperação de exopolímeros; e efeitos de aditivos para acelerar a granulação, respectivamente.

Diante do exposto, as emissões N_2O podem ocorrer através de diferentes rotas metabólicas e serem influenciadas por vários fatores operacionais de uma ETE. As pesquisas para melhor elucidar as rotas metabólicas e entender como estes fatores influenciam nas emissões de

N_2O a partir de LGA, tratando esgoto sanitário real em condições de clima tropical, são muito recentes. Este cenário ressalta a relevância da busca por conhecimento adicional sobre processos microbianos e fatores operacionais envolvidos nas emissões de N_2O .

Assim, no presente estudo, pretende-se avançar no conhecimento referente ao efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular aeróbio.

1.1 HIPÓTESES

Nesta pesquisa de tese, sobre emissões de N_2O por lodo granular em reator em bateladas sequenciais, tratando esgoto sanitário, foram estabelecidas as seguintes hipóteses:

Hipótese 1: A configuração do ciclo operacional do reator tem influência no processo de granulação e na composição da biomassa do lodo, refletindo-se no seu desempenho no tratamento do esgoto e na produção e emissão de N_2O .

Hipótese 2: A produção e a emissão de óxido nitroso pelo lodo granular seguem rotas metabólicas em função da composição da biomassa do lodo e do processo de tratamento.

1.2 QUESTÕES DA PESQUISA

Para testar as hipóteses, as seguintes questões foram levantadas:

- 1) Variações no ciclo operacional do reator, como o regime de enchimento e aeração, interferem na granulação e composição da biomassa, na eficiência do tratamento de esgoto sanitário e nas emissões de N_2O ?
- 2) Quais rotas metabólicas da produção e da emissão de óxido nitroso são predominantes em LGA cultivado em RBS piloto, tratando esgoto sanitário?
- 3) A relação C:N do esgoto sanitário influencia na produção e na emissão de óxido nitroso?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos das configurações de ciclo e as rotas metabólicas na produção e emissão de N_2O , em reator em bateladas sequenciais com lodo granular aeróbio, no tratamento de esgoto sanitário.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar como condições operacionais do ciclo que favorecem os processos de nitrificação e desnitrificação alternadas (NDA) influenciam na granulação e composição da biomassa, na eficiência de tratamento de esgoto sanitário e na produção e emissão de N_2O .
- Investigar as rotas metabólicas predominantes na produção e na emissão de N_2O em reator com LGA, tratando esgoto sanitário em regime NDA.
- Avaliar como a relação C:N ($DQO:NH_4$) do esgoto bruto influencia na produção e na emissão de N_2O

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TECNOLOGIA DE LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA) PARA O TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO

Grânulos aeróbios são agregados compostos por densos consórcios de microrganismos incorporados em uma matriz polimérica extracelular (EPS) com compostos inorgânicos e vários minerais (ADAV *et al.*, 2008; LIU; TAY, 2004). Eles possuem uma estrutura densa de biofilme, o que lhes confere uma ótima propriedade de sedimentação.

O lodo granular foi descrito pela primeira vez para sistemas anaeróbios em 1980 (LETTINGA *et al.*, 1980), e somente na década de 90 foram relatadas a formação e a aplicação de grânulos em um reator aeróbio de fluxo ascendente contínuo (MISHIMA; NAKAMURA, 1991). Ainda na década de 90, a formação e a aplicação da granulação aeróbia foram relatadas em reatores em bateladas sequenciais (MORGENROTH *et al.*, 1997). A primeira patente foi concedida para Heijnen e Van Loosdrecht (1998), e desde então, a tecnologia LGA tem sido estudada e aplicada em reatores em bateladas sequenciais.

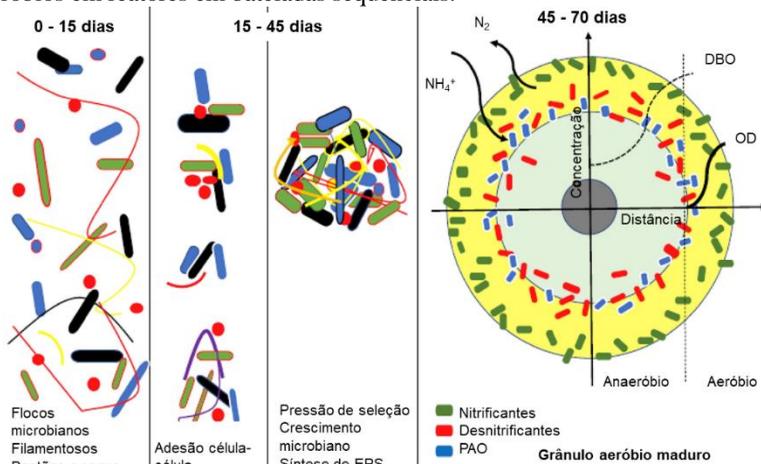
Em 1999, uma equipe liderada pelo Professor Mark van Loosdrecht, da Universidade de Tecnologia de Delft, juntamente com uma empresa de consultoria em engenharia, Royal Haskoning DHV, estabeleceram parceria para promover o *scale-up* do LGA (GIESEN *et al.*, 2013). A tecnologia baseada em biomassa granular aeróbia para tratamento de esgoto foi nomeada de Nereda®, e existem mais de 30 plantas dotadas com esse processo biológico em operação ou em construção nos cinco continentes.

Na tecnologia LGA, o desenvolvimento de grânulos é considerado como a etapa fundamental do processo. A granulação aeróbia é um processo de evolução progressiva da biomassa microbiana (normalmente iniciado a partir da massa de microrganismos advindos do inóculo de lodo ativado), que vai de flocos esparsos para grânulos densos por meio de cargas e operações controladas (SHOW; LEE; TAY, 2012). Em síntese, trata-se de um processo de múltiplas etapas, que envolve interações entre o meio biótico (célula), o meio abiótico (forças físico-químicas) e as condicionantes operacionais estabelecidas no funcionamento de um reator (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007).

De acordo com Liu e Tay (2002), a granulação aeróbia pode ser descrita em um processo que envolve quatro etapas. Na *Etapa 1*, tem-se o envolvimento das forças hidrodinâmicas, de difusão e de gravidade, que favorecem o choque entre os microrganismos no interior do reator. Na *Etapa 2*, verificam-se as forças de atração para manter o contato multicelular, as quais são: forças físicas, forças de Van der Waals e forças de atração por cargas opostas. Além disso, o surgimento de organismos filamentosos promove a formação de um conjunto multicelular maior, pois beneficia o crescimento aderido de bactérias. Na *Etapa 3*, verifica-se a maturação dos agregados microbianos através da produção de polímero extracelular, como os exopolissacarídeos (EPS); e também são observadas mudanças metabólicas e alterações genéticas induzidas pelo ambiente, que facilitam e fortalecem ainda mais a interação célula-célula e resultam na alta densidade das células aderentes. Na *Etapa 4*, a estrutura de agregados microbianos atinge o estado maduro, moldada por forças de cisalhamento hidrodinâmicas.

Recentes estudos confirmaram o mecanismo de formação de grânulos evidenciando também a relação existente entre organismos produtores de EPS e células com superfícies hidrofóbicas na granulação (SARMA; TAY; CHU, 2017; SENGAR *et al.*, 2018). Uma visão geral esquemática é mostrada na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática do processo de formação de grânulos aeróbios em reatores em bateladas sequenciais.



Fonte: Sengar *et al.* (2018).

2.1.1 Fatores que influenciam a granulação aeróbia

Para que organismos ativos se agreguem e ocorra a evolução progressiva de flocos para grânulos densos, uma série de condições deve ser satisfeita (WINKLER *et al.*, 2018). Liu e Tay (2004) afirmam que a granulação é influenciada por uma variedade de fatores, incluindo a partida do reator e condições operacionais como: inóculo utilizado, carga orgânica aplicada, força de cisalhamento hidrodinâmico, tempos de sedimentação e de retenção, limitação do substrato, concentração do oxigênio dissolvido, pH e temperatura, regime de enchimento, configuração do reator e presença de inibidores como amônia livre (DE KREUK; DE BRUIN; VAN LOOSDRECHT, 2005).

A velocidade de sedimentação é um parâmetro físico que determina a eficiência da separação sólido-líquido; e foi destacado, entre os fatores que aceleram a granulação, pela forte pressão de seleção para iniciar a granulação. Os grânulos apresentam velocidade que variam entre 25 e 70 mh^{-1} , bem maior do que aquela típica de lodo floculento (7 a 10 m h^{-1}) (LIU; TAY, 2004). Devido ao fato do LGA apresentar alta velocidade de sedimentação, observa-se uma retenção maior de biomassa, o que proporciona boa eficiência de degradação da matéria orgânica e estabilidade do sistema (MORGENROTH *et al.*, 1997). Assim como a velocidade de sedimentação, a troca volumétrica do reator pode ser um fator de pressão de seleção que influencia a granulação ao selecionar apenas os grânulos com maiores velocidades de sedimentação e promover o *wash-out* da biomassa floculenta, com menor velocidade de sedimentação (LIU; TAY, 2007; LEE *et al.*, 2010).

Outro aspecto importante na granulação é a força de cisalhamento aplicada, ocasionada pelas elevadas taxas de aeração, que favorece a formação e a estabilidade dos grânulos (BEUN *et al.*, 1999). Densidade, resistência e produção de polissacarídeos extracelulares também estão relacionadas com a força de cisalhamento aplicada no sistema, visto que eles desempenham a função de coesão e adesão entre as células, e consequentemente, na manutenção estrutural dos grânulos (WINKLER *et al.*, 2012a).

Igualmente, a velocidade de crescimento dos organismos dentro do grânulo também tem influência significativa na sua estabilidade. Segundo De Kreuk e van Loosdrecht (2004), uma estável granulação pode ser alcançada quando os organismos presentes no grânulo crescem em velocidade baixa, em baixas concentrações de oxigênio. Uma maneira de alcançar o desenvolvimento de microrganismos de

crescimento lento é submeter o reator de grânulos aeróbios ao regime *feast-famine* (com disponibilidade de substrato e com substrato completamente consumido, respectivamente) (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004). A aplicação de regime *feast-famine* pode ocorrer por meio da configuração de enchimento lento e anóxico e/ou anaeróbio (WINKLER *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Pronk *et al.* (2015) mostrou que a seleção de microrganismos de crescimento lento, com captação anaeróbia de substrato facilmente biodegradável antes da reação aeróbia, alcançou uma granulação estável.

2.2 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um nutriente essencial para plantas e animais, visto que ele representa elemento fundamental da composição das proteínas e dos ácidos nucléicos das células (USEPA, 2010).

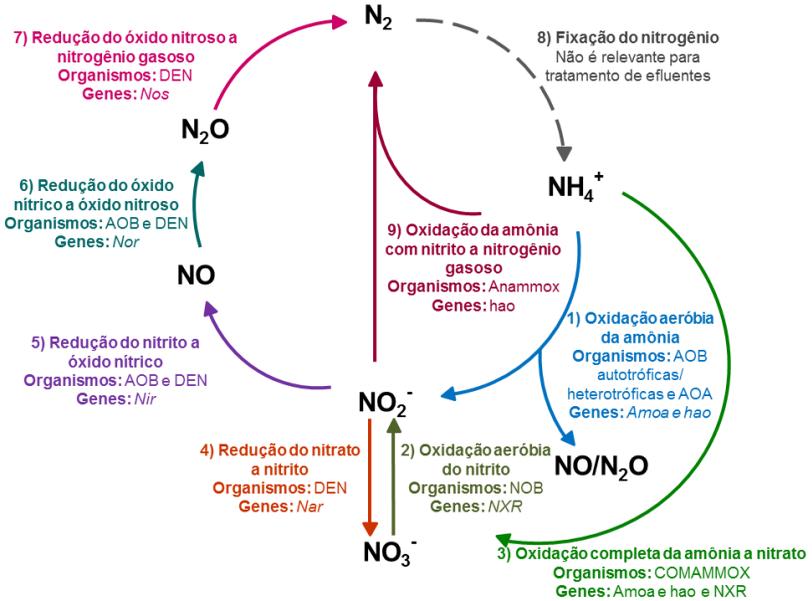
A remoção biológica de nitrogênio no tratamento de esgoto sanitário é feita através dos seguintes mecanismos: 1) síntese da biomassa (assimilação do nitrogênio) e descarte do lodo; e 2) nitrificação e desnitrificação biológica (USEPA, 2010). Os processos de nitrificação e desnitrificação, que podem ocorrer de forma sequencial, parcial ou simultânea, serão abordados de forma detalhada nos próximos itens.

2.2.1 Nitrificação e desnitrificação

A nitrificação é um processo de conversão biológica de nitrogênio, onde ocorre a oxidação biológica da amônia a nitrato, utilizando-se o CO₂ como fonte de carbono e o oxigênio como receptor final de elétrons (METCALF; EDDY, 2016).

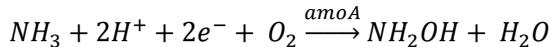
Por muito tempo, a nitrificação foi considerada um processo realizado por três diferentes grupos de microrganismos (Figura 3): bactérias oxidadoras de amônia (AOB, do inglês, *ammonium-oxidizing bacteria*) e arqueas oxidadoras de amônia (AOA, do inglês, *ammonium-oxidizing archaea*), as quais convertem amônia em nitrito (Etapa 1, Figura 3); e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB, do inglês, *nitrite-oxidizing bacteria*), as quais convertem nitrito em nitrato (Etapa 2, Figura 3). No entanto, recentemente foi descoberta a bactéria capaz de oxidar amônia diretamente a nitrato (Comammox, do inglês, *complete ammonia oxidizer*), incluindo então uma nova rota metabólica no ciclo do nitrogênio (Etapa 3, Figura 3) (DAIMS, 2015; VAN KESSEL *et al.*, 2015).

Figura 3 - Conversões biológicas do nitrogênio.

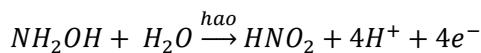


Fonte: Guimarães (2017).

Nas estações de tratamento de esgoto (ETE), a nitrificação é realizada, principalmente, pelos organismos autotróficos AOB e os NOB. A reação de transformação da amônia em nitrito (nitratação) realizada pelas AOB (gênero *Nitrosomonas* e *Nitrosospira*) é catalisada pelas enzimas amônia monooxigenase (*amoA*) e hidroxilamina oxidoreductase ou hidroxilamina desidrogenase (*hao*) (Equação 1 e 2, respectivamente). Já a reação de oxidação de nitrito a nitrato (nitratação) realizada pelas NOB (gênero *Nitrobacter* e *Nitrospira*) é catalisada pela enzima nitrito oxidoreductase (*nxr*) (Equação 3).



Equação 1



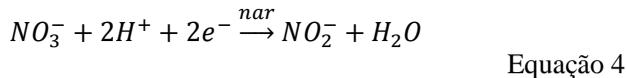
Equação 2



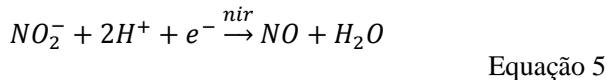
As bactérias Comammox possuem em seu genoma os genes *amoA*, *hao* e *nxr*, por isso podem realizar a nitrificação completa de amônia a nitrato (DAIMS, 2015; VAN KESSEL *et al.*, 2015).

Os produtos da nitrificação (nitrato e/ou nitrito) são utilizados como receptores finais de elétrons para oxidação do carbono orgânico presente no esgoto doméstico, dessa forma, são reduzidos a óxido nítrico, óxido nitroso e nitrogênio gasoso em condições anóxicas (desnitrificação, etapas 4, 5, 6 e 7 da Figura 3) (METCALF; EDDY, 2016). Cada etapa da desnitrificação é catalisada por uma enzima redutase específica, a qual é sintetizada quando as condições ambientais se tornam anóxicas. As enzimas envolvidas nessas etapas são: nitrato redutase (*nar*) (Equação 4), nitrito redutase (*nir*) (Equação 5), óxido nítrico redutase (*nor*) (Equação 6) e óxido nitroso redutase (*nos*) (Equação 7) (CUERVO-LÓPEZ *et al.*, 2009).

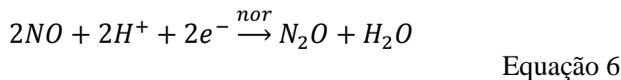
Redução do nitrato a nitrito



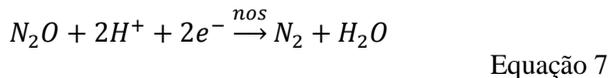
Redução do nitrito a óxido nítrico



Redução do óxido nítrico a óxido nitroso



Redução do óxido nitroso a nitrogênio gasoso



Cada etapa na desnitrificação pode ser inibida por diversos fatores condicionais no sistema de tratamento de águas residuárias,

fazendo com que produtos intermediários possam ser lançados no corpo receptor ou emitidos para a atmosfera (METCALF; EDDY, 2016). Dentre estes intermediários, o óxido nitroso é o que causa maior preocupação devido ao fato de ser um dos mais importantes gases de efeito estufa, com um potencial de aquecimento global 300 vezes maior que o do dióxido de carbono (CO₂) (IPCC, 2014).

A desnitrificação pode ser efetuada por diferentes organismos heterotróficos, tipicamente encontrados nos processos convencionais de tratamento biológico de esgotos, mesmo aqueles desprovidos de processos de remoção de nitrogênio. Os microrganismos que promovem a desnitrificação, mais comuns em condições anóxicas no tratamento de águas residuárias, pertencem às famílias *Comamonadaceae* (gêneros *Curvibacter* e *Acidovorax*) e *Rhodocyclaceae* (gêneros *Azoarcus*, *Thauera* e *Zoogleae*). Bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*, *Rhodopseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* são também comuns em ETE (NIELSEN *et al.*, 2009).

2.2.2 Nitrificação – desnitrificação via nitrito

A nitrificação - desnitrificação via nitrito é conhecida como um *atalho* do ciclo do nitrogênio com base no processo de oxidação da amônia a nitrito, e na redução deste a nitrogênio gasoso. Nesse processo, o nitrito é um intermediário em ambas as etapas de nitrificação e desnitrificação (METCALF; EDDY, 2016).

O pré-requisito para a ocorrência da nitrificação-desnitrificação via nitrito é a interrupção da oxidação da amônia em nitrito, evitando a ação das NOB e permitindo apenas a ação das AOB. As AOB e NOB são dois grupos caracterizados por diferentes velocidades de crescimento, afetadas de maneira diferenciada por parâmetros como pH, OD, temperatura, idade do lodo e concentração de amônia livre (AL) (VÁZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2010).

Comparadas com as AOB, as NOB exigem uma maior concentração de OD, assim, baixas concentrações de OD (< 1,5 mg L⁻¹) podem inibir o crescimento das NOB, o que resulta no acúmulo de nitrito e na ocorrência de nitrificação e desnitrificação parcial via nitrito. Além disso, este processo resulta em redução dos gastos com aeração do sistema. No entanto, a baixa concentração de OD pode causar baixa taxa de nitrificação, *bulking* do lodo e aumento na produção de N₂O (BLACKBURNE *et al.*, 2007).

A seleção das NOB ou a lavagem (*wash-out*) destes organismos do sistema também pode ser alcançada em altas temperaturas. As AOB superam as NOB quando a temperatura do meio reacional se encontra acima dos 20°C, enquanto que as NOB são dominantes em temperaturas inferiores a 15°C. Assim, além de promoverem o crescimento das AOB, altas temperaturas também aumentam a diferença da taxa de crescimento entre AOB e NOB (BOUGARD *et al.*, 2006; VÁZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2010).

A inibição por AL também é um método utilizado para alcançar a nitrificação parcial. Segundo Anthonisen *et al.* (1976), concentrações de NH₃-N acima de 10 mg L⁻¹ favorecem a inibição das AOB, enquanto as NOB são inibidas com menores concentrações (0,1-1,0 mg L⁻¹ de NH₃-N).

Quando comparada com processos de nitrificação e desnitrificação completa, a nitrificação-desnitrificação via nitrito apresenta vantagens como: redução no consumo de oxigênio na fase aeróbia em aproximadamente 25%; redução de até 40% nos requisitos de doadores de elétrons na fase anóxica; e a taxa de desnitrificação via nitrito é de 1,5 a 2 vezes maior do que a taxa de desnitrificação via nitrato (VÁZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2010).

2.3 REMOÇÃO SIMULTÂNEA DE NITROGÊNIO, CARBONO E FÓSFORO EM LGA

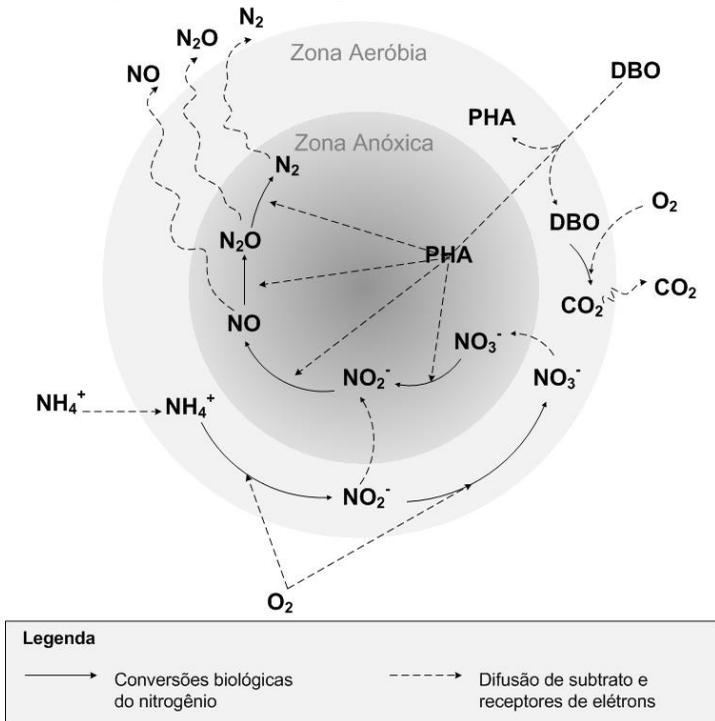
Dependendo da espessura do floco ou do biofilme formado pela biomassa, zonas com diferentes condições ambientais (aeróbias, anóxicas e até anaeróbias) podem ser formadas. Esta diferenciação viabiliza os processos de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) além do processo de remoção de matéria orgânica (Figura 4) (MUNCH; LANT; KELLER, 1996).

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). Devido ao metabolismo aeróbio estrito das AOB e das NOB, estas geralmente estão localizadas na camada mais externa do grânulo, onde a concentração de oxigênio é alta (WINKLER *et al.*, 2012b). Já os organismos desnitrificantes estão distribuídos abaixo da superfície externa, na zona anóxica, incorporados pelas substâncias poliméricas extracelulares (ADAV; LEE; LAI, 2010a).

Os processos que ocorrem nos grânulos variam nas diferentes fases ao longo do ciclo operacional de um reator RBS. Após o

enchimento, a concentração de carbono orgânico no meio líquido é alta, período de “saciedade” (*feast period*). Esse substrato é completamente difundido para o interior do grânulo, e é convertido parcialmente e armazenado como os polihidroxialcanoatos (PHA). A transferência de oxigênio no interior do grânulo é menor dada à respiração dos organismos aeróbios autotróficos e heterotróficos que estão na superfície do grânulo. Neste período de saciedade, o oxigênio dissolvido (OD) é usado, principalmente, pela nitrificação, pela conversão aeróbia do carbono orgânico e para o crescimento da biomassa (FIGUEROA *et al.*, 2009).

Figura 4 - Modelo conceitual dos principais processos biológicos na remoção de carbono e nitrogênio (NDS) em lodo granular.



Fonte: Guimarães (2017).

Os compostos nitrogenados oxidados, produzidos durante a nitrificação, se propagam em direção ao centro do grânulo e também para o meio líquido. No interior do grânulo, o PHA está disponível para

ser usado como fonte de carbono para o processo de desnitrificação; consequentemente, a remoção de nitrogênio ocorre no interior do grânulo por meio do processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) (DE KREUK; DE BRUIN, 2004; FIGUEROA *et al.*, 2009).

Com a diminuição da concentração de substrato no meio líquido, período de “inanição” (*famine period*), o carbono armazenado como PHA pode ser utilizado como fonte de carbono no processo de desnitrificação. Ainda no *famine period*, a difusão do OD no interior do grânulo é maior do que no *feast period*, 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 (FIGUEROA *et al.*, 2009).

Além disso, com aplicação de períodos *feast-famine*, a remoção biológica de fósforo, conhecida como EBPR (*enhanced biological phosphorus removal*) pode ocorrer de forma simultânea a remoção de carbono e nitrogênio em LGA. Para a remoção biológica de fósforo em LGA, a aplicação de condições de *feast-famine* no ciclo do reator favorece o desenvolvimento de organismos acumuladores de fósforo (PAO) (BASSIN *et al.*, 2012). Durante a fase anaeróbia, estes microrganismos são capazes de assimilar fontes de carbono na forma de ácidos graxos voláteis (AGV) e armazená-los como PHA. Já na fase aeróbia ou anóxica subsequente, na presença de receptores de elétrons (oxigênio ou NO_x) e ausência de substrato orgânico na fase líquida, os PAO consomem o PHA armazenado como fonte de carbono e utilizam como energia para manutenção, crescimento, formação de glicogênio e polifosfato. O ortofosfato é então absorvido do meio líquido, e transformado em polifosfato. Devido a utilização de polifosfato para o crescimento da biomassa PAO nesta fase, a absorção de ortofosfato é maior do que a liberação na fase anaeróbia (*luxury uptake*) (MINO; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1998).

Os processos de nitrificação e desnitrificação também podem ocorrer de forma alternada, com a adição de fases anóxicas intercaladas com fases aeróbias, ao longo ciclo operacional. A introdução de uma fase anóxica provoca uma separação temporal da nitrificação e da desnitrificação. Assim, a remoção de nitrogênio, em vez de ocorrer pelo processo de NDS, passa a ocorrer, principalmente, via nitrificação e desnitrificação alternadas (NDA) (LOCHMATTER; GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2013). Estudos de modelagem indicaram que o processo de NDA promove uma maior RBN do que o processo de NDS (XAVIER *et al.*, 2007). A configuração de NDA pode ser favorecida

ainda com a inserção de alimentação do tipo escalonada, a fim de garantir a fonte de carbono externo para o processo de desnitrificação (DOBBELEERS *et al.*, 2018).

2.4 EMISSÕES DE GEE NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO

As últimas três décadas têm sido sucessivamente mais quentes na superfície da Terra em relação a qualquer período anterior a 1850 (IPCC, 2014). O crescimento acelerado da população e o desenvolvimento de atividades industriais e atividades antrópicas, como desmatamento, agricultura, pecuária e geração e consumo de energia, aumentaram de forma exponencial, com a consequente intensificação nas emissões de gases de efeito estufa (UNFCCC, 1998).

O fato de que as atividades antrópicas têm aumentando o efeito estufa natural e, por conseguinte, provocado alterações na temperatura da superfície da Terra e efeitos adversos aos ecossistemas naturais e à humanidade, têm chamado a atenção da sociedade. Organizações internacionais têm realizado conferências como a 3ª Conferência das Partes da Convenção das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas (COP 3), em Quioto, Japão, que resultou no Protocolo de Quioto (1997), o qual foi o primeiro protocolo assinado por 37 países para controle da emissão de (GEE) na atmosfera, até o ano de 2020. O Protocolo de Quioto estabeleceu a redução de emissões dos seguintes gases de efeito estufa: dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O), hidrofluorcarbonetos (HFC_5), perfluorcarbonetos (PFC) e hexafluoreto de enxofre (SF_6). Em 2015, a COP 21 e a 11ª Reunião das Partes no Protocolo de Quioto (MOP-11) estabeleceram um novo acordo internacional sobre o clima, aplicável a todos os países, com o objetivo de manter o aquecimento global abaixo dos 2°C a partir de 2020 (UNFCCC, 2015; ROGELJ *et al.*, 2016). O Brasil concluiu o processo de ratificação do Acordo de Paris em 12 de setembro de 2016, onde consta, no instrumento entregue às Nações Unidas, o comprometimento em reduzir as emissões de GEE em 37 e 43% abaixo dos níveis de 2005, até os anos de 2025 e 2030, respectivamente (MMA, [s.d.]).

Segundo o IPCC (2014), entre os principais setores de emissões antrópicas de GEE estão os de energia; processos industriais; uso de solvente e outros produtos; agropecuária; agricultura; e tratamento de resíduos. As emissões totais a partir do tratamento de resíduos quase dobraram no período de 1970 a 2010, 734 $\text{MtCO}_{2\text{eq}}$ e 1.146 $\text{MtCO}_{2\text{eq}}$,

respectivamente. Em 2010, emissões de gases de efeito estufa a partir de tratamento de resíduos representavam 3% do total das emissões de todas as fontes; e entre as principais fontes de emissão desses gases no setor de tratamento de resíduos estão o tratamento de efluentes e a disposição de resíduos sólidos no solo (54% e 43%, respectivamente).

Os principais gases de efeito estufa emitidos em ETE são CH₄, CO₂ e N₂O (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009; LAW *et al.*, 2012a). De maneira geral, as emissões em uma ETE podem ocorrer das seguintes maneiras: diretas, através da respiração microbiana (CO₂), remoção biológica de nitrogênio (N₂O) e digestão anaeróbia (CH₄); internas indiretas, como as emissões associadas com o consumo de energia elétrica e térmica; e externas indiretas, como àquelas relacionadas às fontes não controladas dentro da ETE, entre elas o processamento e remoção de lodo, produção de químicos e transporte dos mesmos (MANNINA *et al.*, 2016).

De acordo com Daelman *et al.* (2013), as emissões de CO₂ em uma ETE contribuem para as mudanças climáticas somente se sua origem for do uso de combustíveis fósseis para gerar a energia necessária à instalação. No entanto, recentemente tem-se considerado também as emissões de CO₂, mesmo que de origem não fóssil, oriundas da degradação da matéria orgânica, presente no esgoto afluente (MANNINA *et al.*, 2016).

2.5 EMISSÕES DE N₂O NO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ESGOTO SANITÁRIO

O óxido nitroso é um gás com um potencial de efeito estufa de aproximadamente 300 vezes maior que o do dióxido de carbono, contribuindo com aproximadamente 7% das emissões globais de GEE. Além disso, o N₂O é o principal gás responsável pela depleção do ozônio estratosférico (O₃) através de sua reação com átomos de oxigênio e produção de óxido nítrico (IPCC, 2014; RAVISHANKARA; DANIEL; PORTMANN, 2009).

As atividades antrópicas são responsáveis por 40 a 50% do aumento das emissões de N₂O, em relação aos níveis da era pré-industrial. O principal setor contribuinte para a emissão deste gás é a agricultura (80%), no entanto outras fontes são corresponsáveis pela emissão antrópica, entre elas a combustão de biomassa e de combustíveis fósseis, o manejo de dejetos e o tratamento de esgoto sanitário (LAW *et al.*, 2012a).

Entre 3 e 10% das emissões globais de N_2O podem ser atribuídas aos processos de remoção de nitrogênio durante o tratamento de esgoto sanitário. Utilizando-se o fator de emissão adotado pelo IPCC ($3,2 \text{ g } N_2O \text{ pessoa}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), a emissão de óxido nitroso durante o tratamento de esgoto equivale a $0,35 \text{ g } N-N_2O \text{ Kg } NTK_{\text{afluente}}^{-1}$, porém, estudos apontam uma grande variação no nível de emissão de N_2O em tratamento de esgoto sanitário, uma vez que este fator de emissão foi criado a partir de um único estudo (CZEPIEL; CRILL; HARRISS, 1993). Em compilação bibliográfica de Kampschreur *et al.* (2009), os autores apontaram uma grande variação na fração de nitrogênio que é emitida como N_2O (0-95% em escala de laboratório; 0-14,6% em escala real), a partir do tratamento de esgoto sanitário.

Com o objetivo de quantificar as emissões de CH_4 e N_2O em uma ETE na Holanda, Daelman *et al.* (2013) mediram por 16 meses as emissões destes gases, e verificaram um fator de emissão para N_2O 80 vezes maior ($28 \text{ g } N-N_2O \text{ NTK}_{\text{afluente}}^{-1}$, 2,8% do nitrogênio afluente) do que o estipulado pelo IPCC. No Brasil, pesquisadores revelaram a relação de alguns parâmetros operacionais, tais como concentração de nitrogênio total (NT) afluente, demanda química de oxigênio (DQO) e oxigênio dissolvido (OD) com emissões de N_2O em tanques de aeração com lodos ativados (BROTTO *et al.*, 2010; MELLO *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013, 2015, 2017). O grupo de pesquisas do LABEFLU/ENS/UFSC tem investigado configurações de redução de emissões de N_2O em reator com lodo granular em escala piloto, para o entendimento dos principais fatores que podem influenciar as taxas de emissões (DAUDT, 2015; VELHO *et al.*, 2017).

Na Tabela 1 observa-se nos estudos mencionados que as emissões de N_2O podem ser ocasionadas por microrganismos desnitrificantes e/ou nitrificantes, mesmo que N_2O não seja um intermediário obrigatório das nitrificantes, ocorrendo principalmente nas unidades de lodos ativados. No entanto, outras operações unitárias em uma ETE podem contribuir para as emissões de N_2O : tanques de areia, tanques de pré-sedimentação, clarificadores secundários e tanques de armazenamentos de lodo, uma vez que estes compartimentos podem ter a presença de oxigênio molecular ou combinado (NO_2^- e NO_3^-), favorecendo os processos de nitrificação e desnitrificação (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009).

O N_2O é emitido em sua fase gasosa, e desta forma, é natural que a maior parte da emissão ocorra em compartimentos aerados de uma ETE, porém não significa que este composto seja produzido somente

nas unidades de tratamento aeradas. O N_2O também pode ser produzido em fases anóxicas, onde se encontra na forma dissolvida no meio líquido e, posteriormente ser transferido para a fase gasosa, por meio da aeração do líquido (KAMPSCHEUR *et al.*, 2008).

A compreensão das rotas metabólicas, quantificação, controle e minimização das emissões de N_2O em ETE é um processo complexo, que pode variar muito de acordo com a composição do afluente, fatores operacionais e climáticos (HU *et al.*, 2011a, 2011b; JIA *et al.*, 2012; KIM; KIM, 2011; TODT; *et al.*, 2016). Neste sentido, evidencia-se a importância de um conhecimento mais aprofundado dos fatores externos operacionais, bem como das rotas metabólicas nas quais o N_2O é produzido e emitido.

Tabela 1 - Emissões de N₂O em escala laboratorial e real.

Referência	Emissão de N ₂ O(% carga de N)	Processo de tratamento	Destaques
Lotito <i>et al.</i> (2012)	0,12-0,36% de NT	RBS escala piloto	O OD apresenta forte relação com as emissões de óxido nitroso. Idades baixas de lodo e altas cargas de nitrogênio são responsáveis por emissões mais altas também.
Wunderlin <i>et al.</i> (2012)	0,2-20% de NT ^a	RBS escala laboratorial	Sob condições aeróbias, a adição de nitrito resultou em produção de N ₂ O através da oxidação da hidroxilamina.
Abookar <i>et al.</i> (2013)	0,04% de NH ₄ ⁺ ; 0,036% de NT	LA <i>plug-flow</i> escala real	A massa de emissões de N ₂ O medidas representa um total de 110 kgN-N ₂ Oano ⁻¹ , o que corresponde a um equivalente anual de 34 000 kg CO ₂ .
Castro-Barros <i>et al.</i> (2015)	2% de NT	RBSG escala real	Ocorreu acúmulo de N ₂ O na fase líquida durante a baixa aeração, e aumento da emissão de N ₂ O com o consequente aumento da aeração.
Ribeiro <i>et al.</i> (2015)	0,04-0,30% de NT	LA escala real	A aeração influenciou a emissão de N ₂ O, visto que ela determina o controle do OD além de afetar a transferência física do N ₂ O supersaturado no meio aquoso para a atmosfera.
Ali <i>et al.</i> (2016)	1,0±0,4% de NT; 1,4±0,7% de NT ^a	RBS nitrificante-anamox escala laboratorial	Aproximadamente 70% do N ₂ O foi produzido na zona superficial aeróbia, onde predominam microrganismos nitrificantes.
Bollon <i>et al.</i> (2016)	2,3±0,5% - 4,9±0,6% de NH ₄ ⁺ ^a	Biofiltro nitrificante escala real	O fator de emissão de N ₂ O foi duas vezes maior durante o inverno, e foi correlacionado com maiores concentrações de N ₂ O no efluente e aumento na espessura do biofilme.

50 Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular

Referência	Emissão de N ₂ O (% carga de N)	Processo de tratamento	Destaques
Daelman <i>et al.</i> (2016)	2,8% de NT	Reator <i>plug-flow</i> + carrossel	Foram verificadas tendências de emissão de N ₂ O sazonal correlacionadas aos picos diários de nitrito e às baixas concentrações de oxigênio.
He <i>et al.</i> (2017)	1,4 – 46,3% de NT	RBS anóxico/aeróbio escala laboratorial	A emissão de N ₂ O aumentou após a relação C/N no lodo aumentar de 6,5 para 9,3.
Velho <i>et al.</i> (2017)	1,6% de NT; 2,3% de NH ₄ ⁺ ^a	RBS escala piloto	Baixas relações C:N durante a fase anóxica, provocaram uma desnitrificação incompleta, com o consequente aumento das emissões de N ₂ O na fase aerada.
Chen, Yuan e Ni (2018)	4,9±0,3% – 18,6±0,5% de NH ₄ ⁺ ^a	RBS escala laboratorial	A emissão de N ₂ O apresentou relação negativa com o OD, o qual variou entre 0,2 a 3,0 mgO ₂ L ⁻¹ .
Dobbeleers <i>et al.</i> (2018)	0,07-3,29% de NT	RBS escala laboratorial	A emissão de N ₂ O é diretamente correlacionada ao desempenho da nitrificação.
Duan <i>et al.</i> (2018)	1,2 – 3,9 ± 0,2% de NH ₄ ⁺ ^a	RBS escala laboratorial	As emissões de N ₂ O podem ser efetivamente reduzidas através da técnica de alimentação escalonada.
Ribeiro <i>et al.</i> (2018)	0,3 – 5,6% de NT	RBS escala laboratorial	A presença combinada de NH ₄ ⁺ e altas concentrações de N-NO ₂ ⁻ promoveram a emissão de N ₂ O.

Fonte: O Autor.

^aValores baseados na fração da desnitrificação, nitrogênio total ou amoniacal removido, correspondente à formação de óxido nitroso.

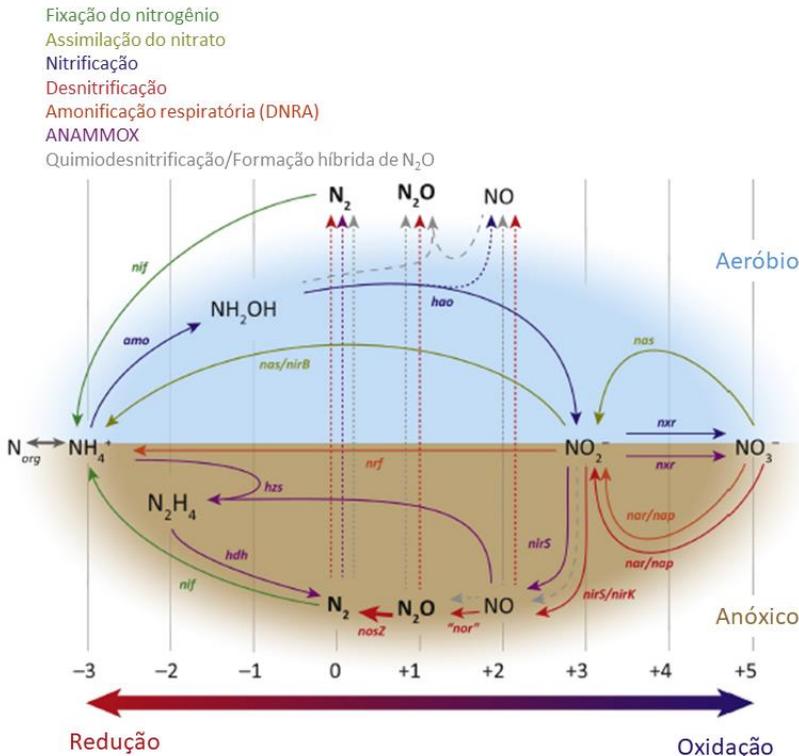
2.6 ROTAS METABÓLICAS DE PRODUÇÃO DE N₂O

O óxido nitroso pode ser produzido por diferentes grupos de microrganismos, os quais apresentam diferentes rotas metabólicas de transformação de compostos nitrogenados (Figura 5) (HALLIN *et al.*, 2018). As contribuições relativas às emissões de N₂O produzidas nas diferentes rotas podem variar, e são diretamente influenciadas pela comunidade microbiana e condições ambientais, mas a maior parte do N₂O emitido é atribuída aos processos de desnitrificação e oxidação de amônia a N₂O.

Na desnitrificação tem-se a redução de compostos nitrogenados à NO, N₂O e N₂, em condições anóxicas, porém, os microrganismos desnitrificantes nem sempre realizam a desnitrificação completa, seja por falta de capacidade genética ou por supressão dos fatores ambientais condicionantes à reação, resultando na formação de N₂O como produto final (PHILIPPOT *et al.*, 2011; GRAF; JONES; HALLIN, 2014). A oxidação da amônia é um processo aeróbio, no qual a NH₄⁺ é oxidado à N₂O através de formação de intermediários como NH₂OH, NOH ou NO, que podem servir como substratos para formação química de N₂O (LAW *et al.*, 2012a; WUNDERLIN *et al.*, 2012).

Durante a amonificação respiratória, também conhecida como redução dissimilatória de nitrato a amônia (DNRA do inglês, *dissimilatory nitrate reduction to ammonium*) NO₃⁻/NO₂⁻ são reduzidos a NH₄⁺ com formação de N₂O, no entanto, as contribuições para as emissões globais, através de amonificação respiratória são menores do que quando comparadas aos processos de desnitrificação e oxidação da amônia (RÜTTING *et al.*, 2011; HALLIN *et al.*, 2018). Outra possível rota de formação de N₂O é através da reação química do nitrito com ferro ferroso para formar óxido nítrico, o qual, por sua vez, reage com o ferro ferroso para formar N₂O; e este processo de quimio desnitrificação pode trazer contribuições relevantes para a formação de N₂O em ambientes com microrganismos redutores de ferro (HALLIN *et al.*, 2018).

Figura 5 - Vias metabólicas dos microrganismos responsáveis pelas transformações no ciclo do nitrogênio (N). Os compostos são posicionados de acordo com o estado de oxidação de N. As linhas sólidas coloridas indicam as vias microbianas, e o genes que codificam as respectivas enzimas que participam de cada processo.



Fonte: Hallin *et al* (2018).

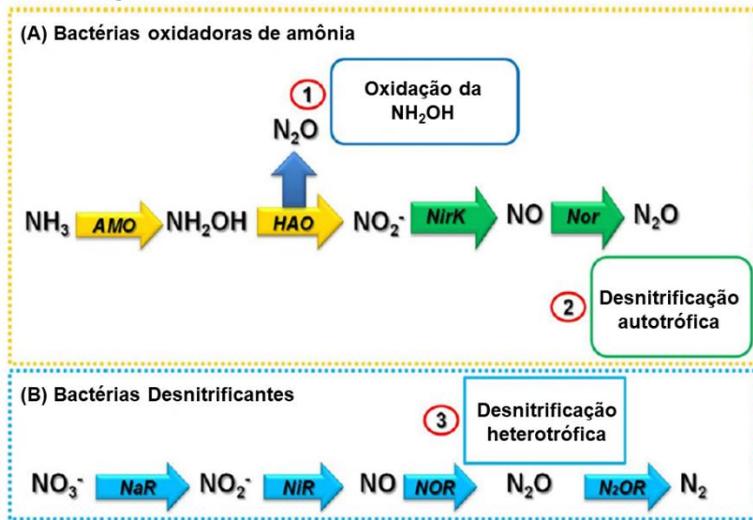
* *Nif*, nitrogenase; *nas/nirB*, nitrato redutase assimilatória; *amo*, amônia monooxigenase; *hao*, hidroxilamina oxidoreductase; *nrx*, nitrito oxidoreductase; *nar/nap*, nitrato redutase; *nirS/nirK*, nitrito redutase; *nor*, óxido nítrico redutase; *nosZ*, óxido nitroso redutase; *nar/nap*, nitrato redutase; *nrx*, nitrito oxidoreductase; *nirS*, nitrito redutase; *hzs*, hidrazina sintase; *hdh*, hidrazina desidrogenase.

Estudos têm reportado que a produção de óxido nitroso em tratamento de esgoto sanitário é associada, principalmente, com nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009; WUNDERLIN *et al.*, 2012; MASSARA *et al.*, 2017). De acordo com Kampschreur *et al.* (2009) e Ni e Yuan (2015), existem três principais rotas de produção de N_2O , que podem ser observadas na Figura 6.

- Produção de N_2O por AOB (vias 1 e 2): primeiramente pode ocorrer a oxidação de NH_4^+ à NH_2OH com a oxidação do oxigênio molecular catalisado pela enzima amônia monoxigenase (AMO). Em seguida, a NH_2OH é oxidada a N_2O , com o auxílio da hidroxilamina oxireductase (HAO) e tendo o oxigênio como principal receptor de elétrons. Neste ponto do processo, o N_2O pode ser produzido caso a oxidação de hidroxilamina a nitrito não seja completa (via 1 - oxidação de hidroxilamina), no entanto, esta produção ocorre somente quando a concentração de nitrito é relativamente alta ($> 45 \text{ mg L}^{-1}$) (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009; MASSARA *et al.*, 2017). As AOB também podem realizar a desnitrificação autotrófica (via 2), em condições limitadas de oxigênio, pois também possuem em sua capacidade genética enzimas relacionadas às reduções de nitrito a óxido nítrico (nitrito redutase – NirK), e de óxido nítrico a óxido nitroso (óxido nítrico redutase – Nor), tendo como produto final o N_2O (LAW *et al.*, 2012a; PENG *et al.*, 2015a).

- Desnitrificação heterotrófica (via 3): o N_2O é um produto intermediário da desnitrificação heterotrófica, mas, caso ocorra algum desequilíbrio na atividade enzimática das bactérias redutoras de nitrogênio associado à inibição pela concentração de OD, acúmulo de N_2O e limitação da disponibilidade de compostos orgânicos biodegradáveis, a desnitrificação pode ocorrer de forma incompleta, ocasionando o acúmulo de N_2O no meio (KIM; KIM, 2011; WUNDERLIN *et al.*, 2012). A desnitrificação heterotrófica, se não sofrer nenhum distúrbio, serve como mecanismo de consumo de N_2O (MASSARA *et al.*, 2017).

Figura 6 - Vias relevantes de produção de N_2O no tratamento biológico de águas residuárias. A) N_2O produzido através de oxidação da NH_2OH (1) e desnitrificação autotrófica (2); B) N_2O é um intermediário obrigatório na desnitrificação heterotrófica (3).



Fonte: Massara *et al.* (2017).

2.7 FATORES QUE INTENSIFICAM AS EMISSÕES DE N_2O

As emissões de N_2O em ETE estão sujeitas a variações devido aos inúmeros fatores intervenientes como: carga nitrogenada afluenta, relação carbono/nitrogênio (C:N), configuração do reator juntamente com as condições operacionais aplicadas, processo de remoção de nitrogênio (como por exemplo, nitrificação e desnitrificação simultâneas e alternadas), concentração de oxigênio dissolvido, fonte de carbono, pH e temperatura. Uma breve descrição do efeito de cada parâmetro nas emissões de N_2O no tratamento de esgoto pode ser observada na Tabela 2.

A disponibilidade limitada de carbono orgânico biodegradável aumenta a emissão de N_2O durante a desnitrificação. Estudos apontam que cerca de 20-30% da carga de nitrogênio afluenta foi emitida como N_2O em sistemas biológicos alimentados com substrato que apresentam relação C:N < 3,5 (KAMPSCHEUR *et al.*, 2009).

Em um estudo utilizando três reatores com lodo granular, em escala laboratorial, para o tratamento de uma mistura de esgoto sanitário com dejetos suínos, as emissões de N_2O foram medidas para três

diferentes cargas de nitrogênio aplicadas (448,5, 321,2 e 224,2 mg L⁻¹). As respectivas emissões máximas de N₂O foram de 8,2%, 7% e 4,4%, sugerindo que a redução de carga de nitrogênio aplicada, ou o aumento da relação C:N provocou menor inibição da desnitrificação heterotrófica (QUAN *et al.*, 2012).

A concentração de OD é considerada um parâmetro muito importante no controle de emissões de N₂O durante a etapa de nitrificação. Baixas concentrações de OD proporcionam maiores emissões (TALLEC *et al.*, 2006). Em condições limitadas de oxigênio, as AOB utilizam o nitrito como receptor final de elétrons, de para armazenar o oxigênio necessário à reação de oxidação da amônia para a hidroxilamina (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009).

O aumento de concentrações de NO₂⁻ está associado à elevação da emissão de N₂O durante a nitrificação e a desnitrificação: na primeira, o aumento da concentração de NO₂⁻ favorece a desnitrificação (efetiva redução do nitrito a N₂O) pelas AOB; e na segunda, altas concentrações de NO₂⁻ resultam em baixa taxa de desnitrificação e acúmulo de NO e N₂O (COLLIVER; STEPHENSON, 2000).

A combinação do efeito de OD e NO₂⁻ em um reator enriquecido com cultura nitrificante foi investigada por Peng *et al.* (2015b). A desnitrificação autotrófica foi predominante para níveis elevados de OD e NO₂⁻; por outro lado, a produção de N₂O foi predominando através da oxidação da hidroxilamina quando ocorreu a combinação de altos níveis de OD (~3,5 mg L⁻¹) juntamente a baixas concentrações de NO₂⁻ (< 10 mg L⁻¹).

Em um estudo realizado por Zhu e Chen (2011) comparou-se o efeito de duas diferentes fontes de carbono, efluente de lodo fermentado e ácido acético, nas emissões de N₂O em reator anaeróbio-aeróbio em escala laboratorial. As emissões de N₂O foram menores (69%) no estudo que utilizou o efluente da fermentação de lodo como fonte de carbono em comparação às emissões observadas naquele que utilizou ácido acético. A presença de íons de cobre (Cu²⁺) e do ácido propiônico no efluente da fermentação do lodo afetou as atividades das enzimas desnitrificantes, diminuindo a produção de N₂O durante a desnitrificação.

A limitada disponibilidade de substrato externo pode levar ao consumo de fontes de carbono armazenadas internamente nos microrganismos. Em um estudo realizado em RBS em escala laboratorial, o efeito de diferentes fontes de carbono (externa: acetato de sódio; interna: PHA) e das relações C:N, no consumo de N₂O pela

desnitrificação foi analisado por Zhou *et al.* (2012), e de maneira geral, os autores concluíram que as maiores taxas de redução de N_2O a N_2 foram obtidas pelas maiores relações C:N, utilizando-se a fonte externa de carbono.

Li *et al.* (2015) reportaram que, durante o tratamento de esgoto sanitário em um RBS, a uma concentração de OD de 3mg L^{-1} , foi observado um acúmulo máximo de N_2O no menor valor de pH aplicado, que variou entre 6,0-8,5. Em outro estudo, realizado por Adouani *et al.* (2015), foi investigado o impacto da temperatura nas emissões de N_2O durante a desnitrificação, em reator em bateladas alimentado com solução sintética. Os autores concluíram que, de maneira geral, as emissões de N_2O aumentaram com o decréscimo da temperatura, devido ao fato de que baixas temperaturas diminuem as atividades enzimáticas envolvidas na desnitrificação, como as enzimas redutoras de NO e N_2O .

Diante do exposto, verifica-se que as emissões N_2O podem ocorrer através de diferentes rotas metabólicas e serem influenciadas por vários fatores operacionais de uma ETE. No entanto, pesquisas sobre a produção e a emissão de N_2O utilizando reatores com lodo granular e esgoto sanitário ainda são escassas.

Tabela 2 - Visão geral dos principais fatores que intensificam as emissões de N_2O no tratamento de esgoto sanitário.

Ref. ¹	Configuração	Esgoto: características	TDH / CN ² / CNV ³	Principais resultados	Destaque
1	Esc. lab.: RBS ácido acético e RBS lodo fermentado	Doméstico (real suplementado); $N-NH_4^+$: 30mg L^{-1} ; NT: 35.5 mg L^{-1}	TDH: 0,67 d CN: $53\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$	A alimentação com lodo fermentado elevou a densidade de bactérias redutoras de N_2O a N_2	DH ⁴
2	Esc. lab.: 3 RBSG	Sintético: mistura doméstico e dejeito suíno; $N-NH_4^+$: 148, 106 e 74 mg L^{-1}	TDH: 0,33 d CNV: 448,5, 321,2 e $224,2\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$ (para 148, 106 e $74\text{ mg N-NH}_4^+\text{ L}^{-1}$, respectivamente)	As emissões de N_2O decresceram com o aumento da taxa de aeração e da relação DQO:N	$\geq 1,5\text{mgO}_2\text{L}^{-1}\text{:DH}$ $>1,5\text{ mgO}_2\text{ L}^{-1}$: metabolismo de AOB
3	Esc. lab.: RBS	Sintético; $N-NH_4^+$: 20 mg L^{-1}	TDH: 0,83 d CN: $24,1\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$	DQO:N = 0,625: redução de N_2O limitada à fonte externa de carbono; DQO:N = 0,625-1,25: aumento na taxa de redução de N_2O com a fonte externa de carbono; COD:N = 1,875-2,5: taxas similares, independentes da fonte de carbono	DH
4	Esc. real: Lodo ativado no Brasil	Doméstico (real); $N-NH_4^+$: $27,5 \pm 7,1\text{ mg L}^{-1}$	TDH: 0,2 d CN: $137,5\text{mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$	Produção e emissão de N_2O nas fases aerada e não aerada; maior emissão na aeração (<i>stripping</i>)	DA ⁵
5	Esc. lab.: 2 RBSG	Sintético; $N-NH_4^+$: 50 mg L^{-1}	TDH: 0,25 d CN: $200\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$	Emissões de N_2O reduziram significativamente em condições de NDA ao aumentar a carga de DQO	NDA: DH NDS: todas as rotas possíveis

58 Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular

Ref. ¹	Configuração	Esgoto: características	TDH / CN ² / CNV ³	Principais resultados	Destaque
6	Esc. lab.: RBS	Sintético; N-NH ₄ ⁺ : 20 mg L ⁻¹	TDH: 1d CN: 20 mg L ⁻¹ d ⁻¹	Fator de emissão de N ₂ O aumentou com a redução do OD e aumento do N ₂ O; DA predominante em grande range de OD e NO ₂ ⁻ ; Oxidação da hidroxilamina: alto OD e pouco NO ₂ ⁻	DA
7	Esc. piloto: RBS	Doméstico (real); N-NH ₄ ⁺ : 64,37 mg L ⁻¹	TDH: 0,625 d CN: 103 mg L ⁻¹ d ⁻¹	A taxa de oxidação de amônia aumentou com o aumento do pH e do OD	DA
8	Esc. lab.: Reator em batelada	Sintético; N-NH ₄ ⁺ : 6mg L ⁻¹	Experimentos em batelada	Baixas temperaturas reduziram todas as atividades enzimáticas de desnitrificação (especialmente NO e N ₂ O reductase)	DH
9	Esc. real: RBS	Doméstico (real); NT:69±4,5 mg L ⁻¹ ; N-NH ₄ ⁺ : 38,7±2,1 mg L ⁻¹	TDH: 1,53 d CN: 45,1 mg L ⁻¹ d ⁻¹	As emissões de N ₂ O correspondem a 60% da pegada de carbono da ETE; Aeração intermitente com fases óxicas & anóxicas curtas: as emissões de N ₂ O reduziram	Rotas metabólicas das AOB
10	Esc. lab.: RBS	Sintético; fontes de C: manitol e acetato de sódio; N-NH ₄ ⁺ : 200 mg L ⁻¹	TDH: 0,67 d CN: 200 mg L ⁻¹ d ⁻¹	Emissões de N ₂ O reduzidas a 41% Acúmulo de NO ₂ ⁻ 20% menor	DH

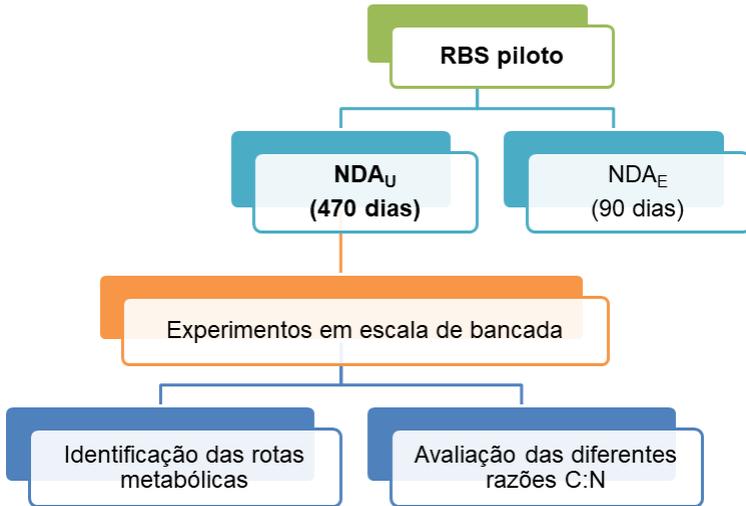
Fonte: O Autor.

¹Referências: 1- Zhu; Chen (2011); 2- Quan *et al.* (2012); 3- Zhou *et al.* (2012); 4- de Mello *et al.* (2013); 5- Lochmatter *et al.* (2013); 6- Peng *et al.* (2015); 7- Li *et al.* (2015); 8- Adouani *et al.* (2015); 9- Rodriguez-Caballero *et al.* (2015); 10- Zhang *et al.* (2016); ²Carga nitrogenada; ³Carga nitrogenada volumétrica; ⁴Desnitrificação heterotrófica; ⁵Desnitrificação autotrófica

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na presente pesquisa foram aplicadas duas configurações operacionais em reator piloto com lodo granular, que favoreceram os processos de nitrificação e desnitrificação alternadas (NDA). Na primeira, o reator operou com enchimento lento de estágio único (NDA_U), seguido de aeração contínua, sedimentação e repouso (470 dias); e na segunda, o reator funcionou com regime de enchimento escalonado (NDA_E), seguido de fase de repouso e de aeração intermitente (90 dias). Em paralelo, durante a NDA_U , foram realizados experimentos em bancada, para identificar as rotas metabólicas e o efeito das diferentes razões DQO: NH_4 na produção e emissão de N_2O . O fluxograma apresentado na Figura 7 ilustra o delineamento experimental utilizado na pesquisa.

Figura 7 - Fluxograma do delineamento experimental.



3.1 SISTEMA EXPERIMENTAL

3.1.1 Características gerais

O sistema experimental em escala piloto (Figura 8) é composto por unidade de captação de esgoto bruto, tanque de armazenamento, tanque intermediário com misturador, bomba de alimentação do reator, reator piloto, rotâmetro, compressor de ar, válvula solenóide para

descarte do efluente, painel de comandos elétricos com um controlador lógico programável, medidores de óxido nítrico líquido e gasoso.

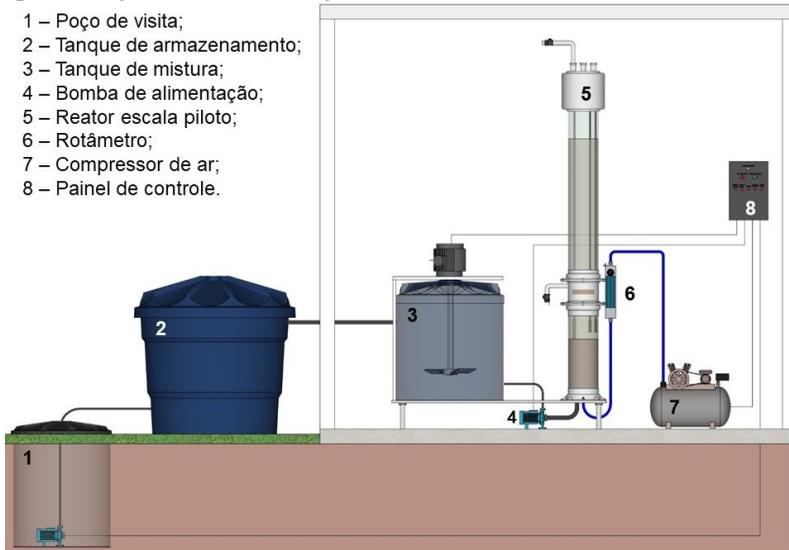
O efluente utilizado no estudo, proveniente da rede coletora de esgoto sanitário da cidade de Florianópolis-SC, foi captado através de uma moto-bomba submersa (Schneider BSC – 94 0 ¾ CV 60 Hz), acionada a cada 20 min, durante 5 min, instalada no poço de visita da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN).

O esgoto sanitário captado no poço de visita foi bombeado para um tanque de armazenamento (5 m³). A partir deste tanque, o esgoto escoou por gravidade a um tanque intermediário, com capacidade de 1 m³ e foi mantido em constante recirculação através de um misturador mecânico (motor elétrico do tipo vertical 1.750 rpm, 60 Hz), acionado a cada 30 min, durante 10 s. Do tanque intermediário, o esgoto foi então bombeado para o reator nos períodos de enchimento de cada ciclo operacional, através de uma bomba Netzsch/Nemo®, modelo NM®015BY01L06B.

Ao final de cada ciclo, o efluente tratado foi descartado por gravidade após a abertura de uma válvula solenóide (Danfoss, EV220B ¾”), e lançado na rede coletora da CASAN em um ponto à jusante da captação.

Figura 8-Esquema do sistema experimental utilizado.

- 1 – Poço de visita;
- 2 – Tanque de armazenamento;
- 3 – Tanque de mistura;
- 4 – Bomba de alimentação;
- 5 – Reator escala piloto;
- 6 – Rotâmetro;
- 7 – Compressor de ar;
- 8 – Painel de controle.



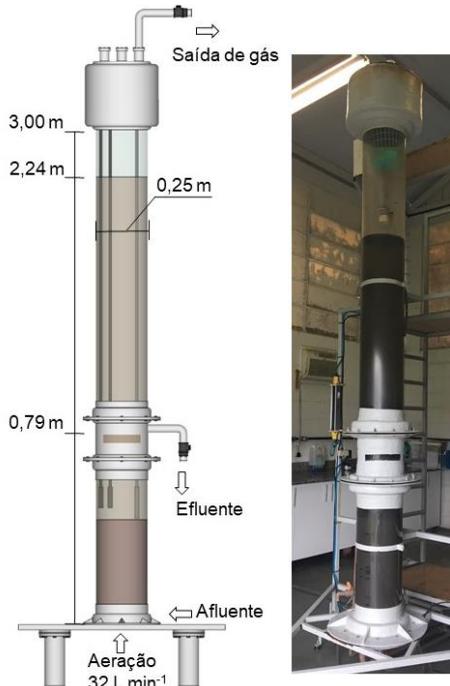
Fonte: O Autor.

O reator piloto foi construído em coluna cilíndrica de acrílico, com 3,0 m de altura e 0,25 m de diâmetro interno. A altura útil utilizada para o tratamento foi de 2,24 m, correspondente a um volume útil de 110 L (Figura 9).

A tubulação de descarte estava localizada a uma altura de 0,78 m da base do reator, o que proporcionou a alimentação do reator com volume de esgoto de 71,7 L, representando uma troca volumétrica ($V_{\text{enchimento}}/V_{\text{reator}}$) de 65%.

O sistema de aeração do reator era composto por dois compressores (Wayne Wetzel profissional – WV 15, 230L, 3hp e SHULZ®, modelo CSL – 20/200), filtros, válvulas reguladoras de pressão e rotâmetros para medição de vazão de ar. Os compressores de ar operaram de forma intercalada, e enviavam ar comprimido para o reator. Foi aplicada uma aeração em uma vazão de $32 \text{ L}_{\text{ar}} \text{ min}^{-1}$, atravessando uma membrana difusora de bolhas finas (EPDM HD 340mm – rosqueável 3/4”) instalada na parte inferior do reator.

Figura 9 - Dimensões do reator piloto RBS com lodo granular utilizado nesta pesquisa.



Fonte: O Autor.

O funcionamento do reator piloto foi automatizado por meio de um controlador lógico programável (CLP), marca SIEMENS, localizado em um painel de comandos elétricos. O CLP permitia o acionamento e o desligamento das bombas de entrada de esgoto bruto, do misturador mecânico, dos compressores de ar, da válvula solenóide para descarte do esgoto tratado e efetuava a operação do reator em regime de ciclos.

3.1.1.1 Operação do reator

A partida do reator ocorreu sem o uso de inóculo, utilizando-se apenas o esgoto sanitário. O reator operou continuamente por 560 dias. As características do esgoto durante as duas configurações operacionais estão apresentadas na Tabela 3. O monitoramento do reator foi realizado semanalmente, a fim de acompanhar a evolução da biomassa granular e as eficiências de remoção de matéria orgânica e nitrogenada.

Tabela 3- Características do esgoto sanitário durante as duas configurações operacionais aplicadas.

Características do esgoto sanitário	NDA_U	NDA_E
pH (-)	$6,8 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,3$
Temperatura ($^{\circ}C$)	20 ± 3	23 ± 1
DQO_T ($mg L^{-1}$)	471 ± 158	367 ± 95
DQO_5 ($mg L^{-1}$)	213 ± 64	161 ± 38
$N-NH_4^+$ ($mg L^{-1}$)	46 ± 13	51 ± 14
PT ($mg L^{-1}$)	$7,5 \pm 2,1$	$6,1 \pm 0,8$
SST ($mg SST L^{-1}$)	185 ± 91	209 ± 86
Carga orgânica ($kg DQO_T m^{-3} d^{-1}$)	$1,3 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,3$
Carga nitrogenada ($kg N-NH_4^+ m^{-3} d^{-1}$)	$0,12 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,05$
Carga de fósforo ($kg P_T m^{-3} d^{-1}$)	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,02$
A:M ($kg DQO_5 kg^{-1} SSV d^{-1}$)	$0,27 \pm 0,09$	$0,23 \pm 0,05$
C:N:P ($g_{DQO_5} : g_{N-NH_4^+} : g_{PT}$)	28:6:1	27:9:1

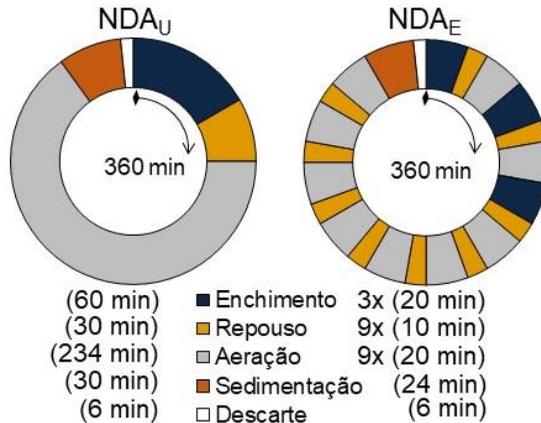
Fonte: O Autor.

O reator foi operado em duas diferentes configurações ou regimes. Na primeira delas, adotada de acordo com sugestões de pesquisas anteriores do grupo LABEFLU (GUIMARÃES, 2017; XAVIER, 2017), o reator foi mantido em condições favoráveis à ocorrência de NDA_U (Figura 10). Nesta etapa, o reator foi operado em ciclos com duração de 6 h, compostos pelas seguintes fases: alimentação

lenta ascensional (sem agitação ou aeração) (60 min); reação anóxica (repouso) (30 min); reação aeróbia (234 min); sedimentação (30 min); e descarte (6 min).

Foi aplicado um período de enchimento lento seguido de reação anóxica, a fim de favorecer a hidrólise da matéria orgânica particulada a componentes solúveis, por meio do aumento de contato entre a cama de lodo (biomassa sedimentada) e o esgoto sanitário afluente. Além disso, maximizando a hidrólise do material particulado, proporciona-se o desenvolvimento de microrganismos heterotróficos de crescimento lento que, muitas vezes, são inibidos pelo processo lento de hidrólise (DE KREUK *et al.*, 2010a; WAGNER *et al.*, 2015a). Ao longo do período de reação anóxica, pulsos de ar foram injetados durante 10 s, a fim de suspender e aumentar o contato da biomassa com esgoto sanitário (DERLON *et al.*, 2016).

Figura 10- Configurações operacionais NDA_U e NDA_E .



Fonte: O Autor.

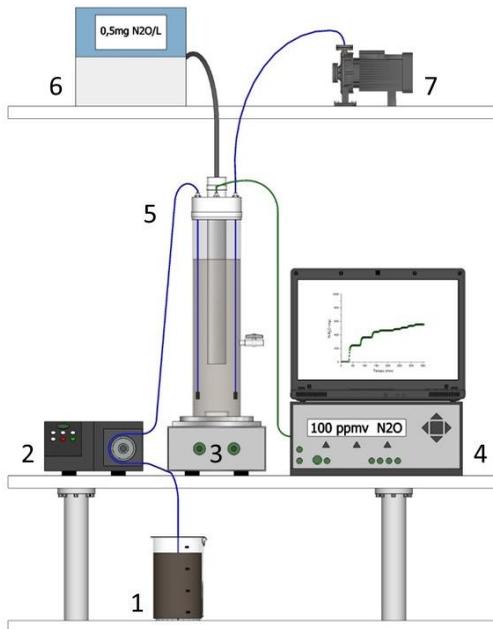
Na segunda configuração, o reator funcionou também em regime NDA, porém, com enchimento escalonado e fases de repouso e aeração intermitentes (NDA_E), seguindo a metodologia descrita por Lochmatter *et al.* (2013) e Dobbeleers *et al.* (2018). Durante a NDA_E , foram configurados três blocos de enchimento (20 min), seguidos de fase de repouso (10 min) e aeração (20 min). Finalizado o enchimento, foram alternadas sete fases de aeração e sete fases anóxicas (repouso) (Figura 10).

Durante períodos chuvosos, foi constatado em trabalhos anteriores realizados pelo grupo LABEFLU que o afluente passa a ser mais diluído devido às infiltrações na tubulação, diminuindo a carga orgânica aplicada ao sistema (GUIMARÃES 2017; XAVIER 2017). Em vista disso, neste trabalho, foi efetuada a gestão do ciclo operacional em períodos chuvoso, reduzindo-se o tempo de ciclo para 4 horas, em ambas as configurações operacionais do reator (PRONK *et al.*, 2015).

3.1.2 Experimentos em bateladas – escala de bancada

Experimentos em bateladas, em escala de bancada, foram realizados durante a NDA_{UJ} para a identificação de rotas metabólicas e a avaliação dos efeitos da razão $DQO:NH_4$ na produção e emissão de N_2O em LGA. Um esquema dos experimentos realizados em bancada pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Esquema ilustrativo dos experimentos realizados em escala de bancada.



Fonte: O Autor.

Os ensaios foram realizados utilizando um reator de vidro com volume útil de 1 L (5), bomba peristáltica para alimentação do reator (2), bombas de aquário para fornecimento de oxigênio dissolvido (7), mesa agitadora (3), e medidores de óxido nitroso líquido (6) e gasoso (7). O sistema foi fechado para viabilizar as análises de amostras de gás.

A fim de simular o funcionamento do reator piloto, as mesmas configurações operacionais (tempo de ciclo, fases de alimentação, repouso, aeração e sedimentação, e troca volumétrica) foram aplicadas no reator em escala de bancada.

A biomassa utilizada nos testes em bancada foi retirada do reator piloto ao final de um ciclo. A mistura e homogeneização do reator foram realizadas através de um agitador magnético. Durante a fase aeróbia, a concentração de OD foi mantida em 2 mg L⁻¹. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente.

3.1.2.1 Experimento em batelada I – Identificação das rotas metabólicas de produção e emissão de N₂O nos processos de nitrificação e desnitrificação

Com o objetivo de identificar as rotas metabólicas envolvidas nos processos de produção e emissão de N₂O no RBS piloto com LGA, durante os processos de nitrificação e desnitrificação na configuração NDA_U, os seguintes experimentos em bateladas foram conduzidos, seguindo a metodologia descrita por Hu *et al.* (2011b), baseada na adição de inibidores proposta por Tallec *et al.* (2008).

Experimentos em bateladas - fase anóxica

Duas diferentes formas de redução do nitrato são atribuídas à produção de N₂O na condição anaeróbia: a desnitrificação heterotrófica (DH) e a amonificação do nitrato (AN) (REHR; KLEMME, 1989; WRAGE *et al.*, 2004).

Nos testes de identificação de rotas metabólicas envolvidas na produção de N₂O em condições anóxicas, 0,7L de licor misto foi retirado do reator piloto no final da fase aeróbia. Este montante foi dividido em volumes iguais para a realização de dois experimentos em bateladas (1,5 h) com adição de inibidores para diferenciar a DH e a AN:

- 1) Com Allylthiourea (ATU);
- 2) Com ATU e NaClO₃.

Esses inibidores foram adicionados no início de cada batelada, nas concentrações de 10 e 0,1 mg L⁻¹ de ATU e NaClO₃, respectivamente.

O experimento com adição de Allylthiourea mostra a produção de N₂O pela amonificação do nitrato e pela desnitrificação heterotrófica (Figura 12A). Por outro lado, o experimento com adição de ATU+NaClO₃ mostra a produção de N₂O pela desnitrificação heterotrófica (Figura 12B). Sendo assim, o N₂O produzido pela amonificação do nitrato pode ser deduzido da diferença A – B (Equação 8).

$$AN = A - B$$

Equação 8

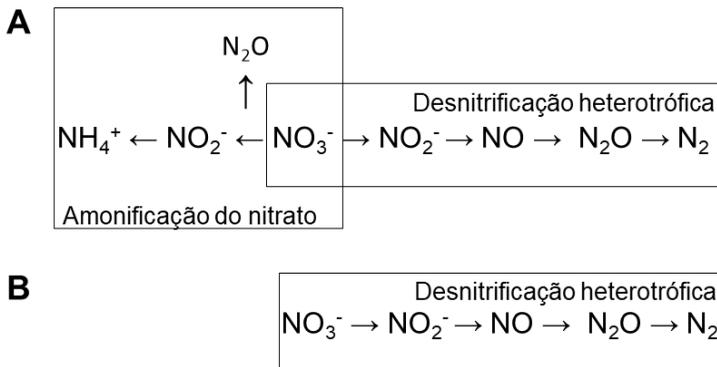
Onde:

AN: amonificação do nitrato (AN);

A: N₂O produzido pela AN e desnitrificação heterotrófica (DH);

B: N₂O produzido pela DH.

Figura 12 - Diagrama das transformações de nitrogênio esperadas com os experimentos em condições anóxicas. (A) com ATU; (B) com ATU e NaClO₃.



Fonte: Hu *et al.*(2011b).

Experimentos em bateladas - fase aeróbia

Aproximadamente 1,0L de licor misto (contendo biomassa granular) foi coletado do reator piloto e dividido em três volumes iguais para a realização dos experimentos.

Para diferenciar a desnitrificação autotrófica (efetuada pelas nitrificantes) da heterotrófica foi necessário quantificar a produção de N_2O em duas diferentes situações:

I) N_2O produzido pelas bactérias autotróficas e heterotróficas (sem uso de inibidores);

II) N_2O produzido pelas heterotróficas.

Para diferenciar os dois processos, três experimentos em bateladas (6h) foram conduzidos:

- 1) Sem adição de inibidores;
- 2) Com adição de $NaClO_3$;
- 3) Com adição de $NaClO_3$ e ATU.

ATU e $NaClO_3$ foram adicionados no início de cada experimento em concentrações de 10 e 1 $mg L^{-1}$, respectivamente.

O experimento sem adição de inibidores mostra a soma de N_2O produzido pela desnitrificação heterotrófica e autotrófica (Figura 13A). O experimento realizado com adição de $NaClO_3$ fornece o N_2O produzido pela desnitrificação autotrófica (Figura 13B); e o último experimento, realizado com a adição de $NaClO_3$ e ATU deve ser usado como controle para subtrair o N_2O introduzido no sistema através da aeração (Figura 13C).

Sendo assim, o N_2O produzido pela desnitrificação heterotrófica pode ser deduzido conforme a Equação 9:

$$DH = [A - (B + C)]$$

Equação 9

Onde:

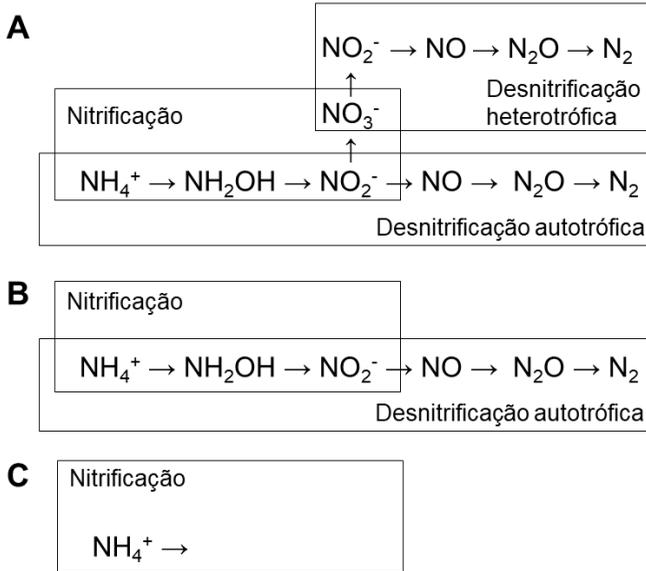
DH: desnitrificação heterotrófica;

A: N_2O produzido pela DH e desnitrificação autotrófica (DA);

B: N_2O produzido pela DA;

C: N_2O introduzido pelo sistema através da aeração.

Figura 13 - Diagrama das transformações de nitrogênio esperadas com os experimentos em condições aeróbias. (A) sem adição de inibidores; (B) com adição de NaClO₃; (C) com adição de ATU e NaClO₃.



Fonte: Hu *et al.* (2011b).

3.1.2.2 Experimento em batelada II –Efeito da razão carbono nitrogênio na produção e emissão de N_2O

Com o objetivo de estimar as máximas emissões de N_2O , pelo lodo granular do RBS piloto, para diferentes condições de carga orgânica e nitrogenada, foram realizados experimentos em bateladas conforme a metodologia proposta por Kim e Kim (2011).

Um volume de biomassa referente ao final do período aeróbio do RBS piloto foi coletado e submetido à aeração por 2 horas para garantir a remoção de qualquer fonte de carbono e o consumo total de nitrogênio amoniacal residual. Em seguida, alíquotas de 1,4L foram amostrados para a realização de quatro ensaios (1, 2, 3 e 4) em bancada, obedecendo ao mesmo tempo de ciclo (6h), fases (enchimento, reação anóxica, reação aeróbia, sedimentação e descarte) e troca volumétrica (65%) do RBS piloto.

Diferentes razões C:N, (expressas na forma de $DQO_S:NH_4$) foram avaliadas nos experimentos em bateladas ($DQO:NH_4 = 3, 5, 1$ e 0). Para realizar os quatro ensaios em bateladas, diferentes substratos foram utilizados para a alimentação do reator. A seguir, estão descritos resumidamente, os quatro experimentos em bateladas:

- 1) $DQO:NH_4 = 3$ – 350 mL de biomassa granular + 650 mL de esgoto sanitário (179 mg L^{-1} de DQO e 60 mg L^{-1} de $N-NH_4^+$), resultando em um volume total de 1 L;

- 2) $DQO:NH_4 = 5$ – 350 mL de biomassa granular + 650 mL de efluente sintético (250 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1}), resultando em um volume total de 1 L;

- 3) $DQO:NH_4 = 1$ – 350 mL de biomassa granular + 650 mL de efluente coletado no final da fase anóxica RBS piloto (esgoto desnitrificado), resultando em um volume total de 1 L;

- 4) $DQO:NH_4 = 0$ – 350 mL de biomassa granular + 650 mL de esgoto sintético contendo somente nitrogênio amoniacal (sem fonte externa de carbono) resultando em um volume total de 1 L. A concentração final de $N-NH_4^+$ do esgoto sintético foi a mesma usualmente verificada no afluente do sistema piloto (Tabela 3).

3.2 MONITORAMENTO DO SISTEMA EXPERIMENTAL

3.2.1 Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$, DQOs, sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram analisados em sua maioria de acordo com Standard Methods (AWWA; APHA; WEF, 2012). Na Tabela 4 estão apresentados os métodos e a frequência das análises físico-químicas.

Tabela 4 - Métodos e frequência das análises físico-químicas realizadas.

Análises	Métodos	Frequência
Oxigênio dissolvido, pH, temperatura	Sonda Multiparâmetros de Qualidade da Água (<i>Environmental Monitoring Systems</i> – YSI 6820 V2)	semanal
Nitrogênio Total (N_T)	Método da digestão com persulfato (kit HACH®) - 2714100	semanal
Nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$)	Método do salicilato com cianureto (kit HACH®) - 2606945	semanal
Nitrito ($N-NO_2^-$), Nitrato	Cromatografia Iônica (DIONEX)	semanal

Análises	Métodos	Frequência
(N-NO ₃ ⁻) e Fosfato (P-PO ₄ ³⁻)	ICS-5000, <i>Thermo Scientific</i> . SM 4110C	
Demanda Química de Oxigênio (DQO _T e DQO _S)	Método colorimétrico de refluxo fechado. Leitura em espectrofotômetro HACH®, DR-4000. SM 5220D	semanal
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO _{5,20})	Método manométrico com incubação de 5 dias a 20°C (em base agitadora HACH®, BOD-TRACK). SM5210D	semanal
Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	Método gravimétrico. SM 2540	semanal
Fósforo Total (P _T)	Método molybdovanadato. SM4500P C	semanal
Polihidroxibutirato (PHB)	Despolimerização ácida do PHB (KARR; WATERS e EMERICH, 1983)	quinzenal

Fonte: O Autor.

*SM = Standard Methods.

O monitoramento dos ciclos no RBS e nos experimentos em bateladas foi efetuado com coletas de amostras a cada 45 min (condições anóxicas) e a cada hora (condições aeróbias).

O monitoramento da produção e emissão de N₂O foi realizado em um intervalo máximo/mínimo de 15 dias, no RBS piloto e nos experimentos em bateladas durante a configuração NDA_U; na configuração NDA_E, este monitoramento ocorreu semanalmente. A concentração de N₂O dissolvido foi medida com um micro sensor (N₂O Wastewater System, UNISENSE A/S, Dinamarca) com intervalo entre 0 a 1,5 mg L⁻¹ de N-N₂O e limite de detecção de 0,005 mg L⁻¹ de N-N₂O (

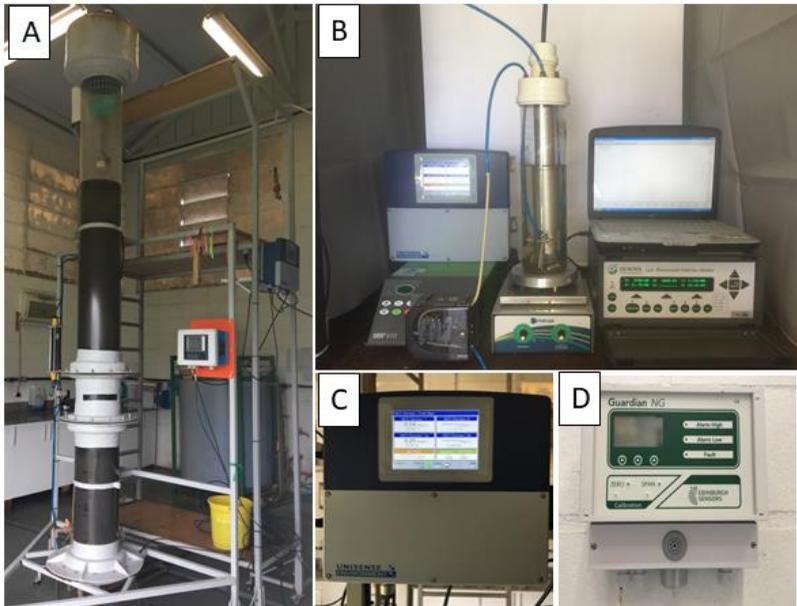
Figura 14C). Este micro sensor ficava no interior dos reatores durante todo o ciclo operacional.

O fluxo de N₂O gasoso foi analisado continuamente (a cada minuto) por um analisador de gás infravermelho (Infra Red, GUARDIAN NG, Edimburgo, Reino Unido), com faixa de medição entre 0 e 3.000 ppm (

Figura 14D). Além disso, foi utilizado um analisador de gás infravermelho fotoacústico marca INNOVA 1412 em um período de manutenção da sonda GUARDIAN NG (

Figura 14 B). Para medir o N_2O gasoso, a parte superior dos reatores (piloto e de bancada) foi fechada, o que permitiu a saída de ar por meio de mangueiras de PVC transparente a ela conectada. Esta mangueira conduzia o fluxo de ar do reator até o analisador de gás

Figura 14-Fotos do RBS piloto (A) aparato experimental em bancada (B) e das sondas utilizadas para medir o óxido nítrico dissolvido (C) e gasoso (D).



Fonte: O Autor.

3.2.2 Índice Volumétrico de Lodo (IVL)

As características de sedimentabilidade do lodo foram determinadas de acordo com uma versão modificada do índice volumétrico do lodo (IVL) proposta por Schwarzenbeck et al. (2004), na qual o IVL é calculado para diferentes tempos de sedimentação. Neste

estudo, escolheu-se determinar o volume do lodo após 5, 10 e 30 min de sedimentação em uma proveta graduada de 1 L, e calculado conforme a equação 10:

$$IVL_{5,10,30} = \frac{H_{5,10,30} \times 10^6}{H_0 \times SST}$$

Equação 10

Onde:

$IVL_{5, 10, 30}$: Índice Volumétrico de Lodo ($\text{mL g}^{-1} \text{SST}$);
 $H_{5, 10, 30}$: Altura de lodo sedimentado após 5,10 e 30 minutos (m);
 H_0 : Altura da lâmina d'água na proveta de decantação (m);
SST: Concentração de sólidos suspensos totais da amostra (mg L^{-1});
 10^6 : Fator de conversão de miligrama para grama e de litro para mililitro.

3.2.3 Granulometria

A distribuição do tamanho das partículas foi determinado a partir do método de peneiramento descrito por Laguna *et al.* (1999). Este método tem como objetivo a separação do material em quatro frações, com partículas de tamanhos distintos. Desta forma foram utilizadas quatro peneiras de aço inoxidável de 20 cm de diâmetro, tendo as respectivas aberturas de malha de 600, 400, 300 e 212 μm , que permitem cobrir o intervalo de tamanho de grânulo. As peneiras são montadas verticalmente em ordem crescente de abertura de malha (de baixo para cima). Um recipiente do mesmo diâmetro das peneiras fica localizado na parte inferior para recuperar as partículas menores que 212 μm . A análise foi realizada utilizando-se uma amostra de 200 mL de licor misto (coletado no fim da fase aeração) e misturados a 800 mL de água da torneira, de forma a facilitar a passagem dos sólidos pelas peneiras, evitando a colmatação.

Após a amostra (licor misto + água) passar nas peneiras, as partículas retidas em cada uma delas são recuperadas por meio de retrolavagem com água destilada. Cada fração foi coletada em um recipiente diferente e filtrada para a determinação dos SST. Uma vez determinada a concentração de SST retida em cada peneira, foi possível calcular a porcentagem que cada fração de tamanho ($> 600 \mu\text{m}$, $600 > d > 400$, $400 > d > 300$, $300 > d > 212$, e $d < 212 \mu\text{m}$) representa em função da massa total da amostra.

3.2.4 Análise microbiológica

A caracterização da comunidade bacteriana foi realizada através da análise de séries temporais de composições de comunidades bacterianas com a análise de sequenciamento de amplificação de elevado rendimento. O DNA foi extraído utilizando-se um *kit* de DNA PowerSoil® (MoBio Laboratories Inc., EUA) a partir de amostras coletadas no final da fase de aeração. O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando-se a tecnologia MiSeq® Illumina de acordo com as instruções do fabricante (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). O par de *primers* bacterianos universais para frente 314F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') e *primers* reversos 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') foi utilizado para amplificação por PCR para amplificar a região V3 / V4 do gene 16S rRNA. As bibliotecas de 16S rRNA foram sequenciadas usando o Sistema de Sequenciamento MiSeq (Illumina Inc., EUA) com o kit V2, 300 Cycles, sequenciamento simples. Todas as leituras foram submetidas individualmente a um filtro de qualidade, baseado na soma dos erros de probabilidades das bases do DNA, permitindo, assim, um máximo de 1% de erros acumulados; depois, as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores Illumina foram removidas. As sequências resultantes que apresentaram 100% de identidade foram agrupadas e empregadas para identificação taxonômica, utilizando-se o banco de dados de Silva (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Os resultados foram expressos como porcentagem da contagem total de leituras de sequenciamento.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das variáveis analisadas foram inicialmente tabulados e organizados em matrizes, utilizando-se o *software* Excel 2007. Os dados tabelados foram então tratados com métodos de estatística descritiva e inferência estatística, para explicar a frequência da ocorrência de eventos e possibilitar a síntese e a interpretação das observações.

A análise descritiva ocorreu a partir da exploração de médias, desvio padrão, medianas e percentis, representados em gráficos de dispersão e box-plot. Ferramentas de inferência estatística, incluindo o teste T-Student e a análise de variância unidirecional (ANOVA) foram utilizadas com nível de

74 Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular

confiança de 95% para o processamento de dados físico-químicos de ambas as configurações (STATISTICA Software, Statsoft, Tulsa, EUA).

3.4 CÁLCULOS

3.4.1 Carga volumétrica aplicada (CV)

Para o cálculo da carga volumétrica (CV) aplicada ao reator, utilizou-se a Equação 11.

$$CV = \frac{S_A \times Q_d}{V_u \times 1000} \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

CV: carga volumétrica aplicada (kg m^{-3} dia de DQO, N-NH_4^+ ou P_T);

S_A : DQO, N-NH_4^+ ou P_T no afluente (g m^{-3});

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

V_u : volume útil do reator (m^3).

3.4.2 Tempo de retenção de sólidos (TRS)

Para o cálculo do tempo de retenção de sólidos (idade do lodo) no reator, utilizou-se a Equação 12.

$$TRS = \frac{X_{SSV} \times V_u}{(X_e \times V_e) / t_c} \quad \text{Equação 12}$$

Onde:

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

X_{SSV} : teor de SSV no licor misto (g SSV L^{-1});

V_u : volume útil no reator (L);

X_e : teor de SSV no efluente tratado (g SST L^{-1});

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

t_c : tempo do ciclo (dia).

3.4.3 Amônia livre (AL)

A concentração de AL é função da concentração total de nitrogênio amoniacal, pH e temperatura da solução, calculada pela Equação 13 (ANTHONISEN *et al.*, 1976).

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

Equação 13

Onde:

AL: é a concentração de amônia livre como NH_3 ($mg NH_3 L^{-1}$);

$C_{N-NH_4^+}$: é a 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 constante de ionização da água.

Ambas as constantes variam com a temperatura, e a relação entre elas se dá pela Equação 14.

$$K_b: K_w = e^{\frac{6.344}{273+T(C)}}$$

Equação 14

3.4.4 Velocidade de remoção volumétrica de substrato ($rDQO$, rNH_4 , rP_T)

$$r_{DQO, NH_4, PT} = \frac{(C_i - C_e)Ve/tc}{V_r}$$

Equação 15

Onde:

$rDQO$, NH_4 , PT : é a velocidade de remoção volumétrica de substrato ($mg DQO$ ou NH_4 ou $PT d^{-1} L^{-1}$);

C_i : é o valor afluente de substrato ($mg DQO$ ou N ou $P L^{-1}$);

C_e : é o valor efluente de DQO ($mg DQO$ ou N ou $P L^{-1}$).

3.4.5 Velocidade de remoção específica de substrato ($rDQO$, rNH_4 , rP_T)

$$q_{DQO, NH_4, PT} = \frac{(C_i - C_e)Ve/tc}{V_r X_{SSV}}$$

Equação 16

Onde:

$q_{DQO, NH_4, PT}$: é a velocidade de remoção específica de substrato (mg DQO ou NH_4 ou $PT\ d^{-1}\ g^{-1}\ SSV$);

C_i : é o valor afluyente de substrato (mg DQO ou N ou $P\ L^{-1}$);

C_e : é o valor efluyente de DQO (mg DQO ou N ou $P\ L^{-1}$);

V_e : é o volume efluyente de um ciclo operacional do RBS (L);

T_c : é o tempo de um ciclo operacional do RBS (d);

V_r : é o volume útil do reator RBS (LR);

X_{SSV} : é o valor de sólidos suspensos voláteis no reator ($g\ SSV\ L^{-1}$).

3.4.6 Cálculos referentes ao óxido nitroso

Conversão de unidades

A metodologia utilizada para calcular a emissão de N_2O na presente pesquisa é a mesma desenvolvida por Daudt (2015).

A concentração de N_2O medida na fase aeróbia pelo analisador de gases é expressa em ppm_v (partes por milhão, em volume), sendo:

$$1\ ppm\ N_2O\ no\ ar = \frac{1\ L\ N_2O}{10^6\ L\ ar}$$

No entanto, é necessário determinar a concentração em gramas de N_2O por litro de ar. Desta forma, utilizando-se a Lei dos Gases Ideais é possível fazer esta conversão, admitindo-se que, nas condições de realização do experimento, o N_2O se comportará como gás ideal.

A Lei dos Gases Ideais pode ser expressa pela Equação 17:

$$P \times V = n \times R \times T$$

Equação 17

Onde:

P: pressão local, (atm);

V: volume ocupado pelo gás, (L);

N: quantidade mássica do gás, (mols);

R: constante universal dos gases = $0,08205746\ (atm\ L^{-1}\ mol^{-1}\ K^{-1})$;

T: temperatura ($^{\circ}$ Kelvin).

Através da Equação 17 é possível determinar a massa de N_2O correspondente a 1 L de N_2O :

$$\frac{P \times V}{R \times T} = n = \frac{\text{massa } N_2O}{\text{massa molar } N_2O}$$

Em condições normais de temperatura (25°C) e pressão (1 atm), tem-se:

$$\frac{1 \text{ atm} \times 1 \text{ L}}{0,08205746 \frac{\text{atm L}^{-1}}{\text{mol K}^{-1}} \times 298,15 \text{ K}} = n = \frac{\text{massa } N_2O}{44 \frac{\text{g } N_2O}{\text{mol } N_2O}}$$

$$\text{massa } N_2O = 1,7985 \text{ g}$$

Desta forma, em 1 L de N_2O , tem-se 1,7985 gramas de N_2O . Voltando-se à relação inicial e substituindo-se o numerador:

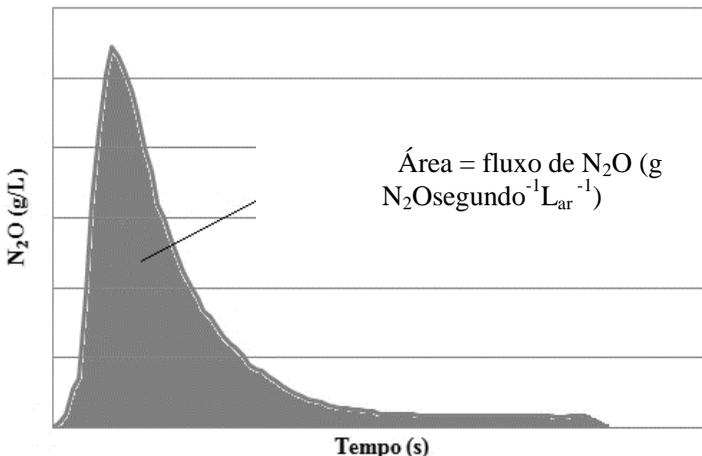
$$1 \text{ ppm } N_2O \text{ no ar} = \frac{1 \text{ L } N_2O}{10^6 \text{ L ar}} = \frac{1,7985 \text{ g } N_2O}{\text{L ar}}$$

Portanto, a 25°C, 1 ppm de N_2O corresponde a $1,7985 \times 10^{-6}$ g $N_2O L_{\text{ar}}^{-1}$. Ressalta-se que a temperatura deste cálculo é corrigida de acordo com a temperatura medida no efluente em cada dia de monitoramento de N_2O .

Cálculo da área do gráfico

Através dos dados de concentração de N_2O emitidos em cada ensaio, corrigidos para as devidas unidades (g $N_2O L_{\text{ar}}^{-1}$), *versus* tempo (segundos) é possível construir curvas de concentração de N_2O ao longo do ciclo do reator. A área sob a curva de variação de concentração de N_2O ao longo do tempo representa o fluxo de N_2O (g N_2O segundo L_{ar}^{-1}) oriundo do reator em um ciclo operacional (Figura 15).

Figura 15 - Comportamento genérico da variação da concentração de N₂O ao longo do tempo e área hachurada do gráfico utilizada no cálculo da emissão de N₂O em um ciclo operacional.



Fonte: Daudt (2015).

Através dos pontos conhecidos que formam a curva, determina-se a sua área, por meio do cálculo de uma integral definida, utilizando-se o método do trapézio composto (Equação 18).

$$\int (C_{N_2O} \times dt) = (C_{N_2O_1} + C_{N_2O_2}) \times \frac{\Delta t}{2} + (C_{N_2O_2} + C_{N_2O_3}) \times \frac{\Delta t}{2} + \dots + (C_{N_2O_{n-1}} + C_{N_2O_n}) \times \frac{\Delta t}{2},$$

Equação 18

Onde:

$\int (C_{N_2O} \times dt)$: Integral da variação da concentração de N₂O ao longo do tempo (numericamente igual à área sob a curva do gráfico) (g N₂Osegundo⁻¹L_{ar}⁻¹);

$C_{N_2O_1}$: Concentração de N₂O referente ao primeiro ponto do gráfico, em (g N₂O L_{ar}⁻¹);

$C_{N_2O_2}$: Concentração de N₂O referente ao segundo ponto do gráfico, em (g N₂O L_{ar}⁻¹);

$C_{N_2O_{n-1}}$: Concentração de N₂O referente ao enésimo ponto do gráfico, em (g N₂O L_{ar}⁻¹);

$C_{N_2O_n}$: Concentração de N_2O referente ao último ponto do gráfico, em ($g N_2O L_{ar}^{-1}$);

Δt : Intervalo de tempo entre duas medições consecutivas de N_2O (igual a 15 segundos).

Cálculo da massa total de N_2O

A partir da concentração de N_2O ao longo do tempo ($g N_2O \text{segundo}^{-1} L_{ar}^{-1}$), pode-se calcular a massa total de N_2O liberada por ciclo do reator, através da multiplicação desta concentração pela vazão de ar aplicada no reator (Equação 19).

$$m_{N_2O} = \int (C_{N_2O} \times dt) \times Q_{ar}$$

Equação 19

Onde:

m_{N_2O} : massa total de N_2O liberada (gramas);

$\int (C_{N_2O} \times dt)$: integral da variação da concentração de N_2O ao longo do tempo ($g N_2O \text{segundo}^{-1} L_{ar}^{-1}$);

Q_{ar} : vazão de ar fornecida pelo compressor de aeração ($L \text{seg}^{-1}$);

Cálculo da massa de N_2O expressa em termos de nitrogênio

A partir do cálculo da massa total de N_2O é possível calcular a massa deste gás, expressa em termos de nitrogênio através da Equação 20.

$$m_{N_2O-N} = m_{N_2O} \times \frac{28 \frac{gN}{molN_2O}}{44 \frac{gN_2O}{molN_2O}}$$

Equação 20

Onde:

m_{N_2O-N} : massa de N_2O expressa em termos de nitrogênio ($g N-N_2O$);

m_{N_2O} : massa de N_2O ($g N_2O$);

28: massa molar do N_2O expressa em termos de nitrogênio ($g N-N_2O \text{mol}^{-1}N_2O$);

44: massa molar do N_2O (gramas de N_2O mol⁻¹ N_2O).

Cálculos referentes à desnitrificação

Correlacionando-se o volume de efluente tratado em uma batelada com as concentrações de nitrogênio total (NT = nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal + compostos nitrogenados oxidados) do afluente e efluente do reator calcula-se a massa de nitrogênio liberada pelo processo de desnitrificação (Equação 21).

$$m_{N_d} = (NT_A - NT_E) \times V_{et} \times \frac{1}{1000}$$

Equação 21

Onde:

m_{N_d} : massa de nitrogênio desnitrificada (gramas);

NT_A : concentração de nitrogênio total afluente (mg NL⁻¹);

NT_E : concentração de nitrogênio total efluente (mg N L⁻¹);

V_{et} : volume de efluente tratado em uma batelada (L);

$\frac{1}{1000}$: fator de conversão de (miligrama) para (grama).

A fração de nitrogênio presente no afluente transformado em nitrogênio gasoso (N_2) durante uma batelada será igual à diferença entre a massa total de nitrogênio desnitrificado (m_{N_d}) e a massa liberada de óxido nitroso expressa em termos de nitrogênio (m_{N-N_2O}), como pode ser observado na Equação 22.

$$m_{N_2} = m_{N_d} - m_{N-N_2O}$$

Equação 22

Onde:

m_{N_2} : massa de N_2 liberada (g N);

m_{N_d} : massa total de nitrogênio desnitrificado (g N);

m_{N-N_2O} : massa de N_2O expressa em termos de nitrogênio (g N- N_2O).

Cálculo da conversão de nitrogênio afluente em óxido nitroso

O cálculo da conversão de nitrogênio afluente em óxido nitroso é realizado através da Equação 23.

$$\text{Convers\~{a}o}_{N_a \rightarrow N_2O-N} (\%) = \frac{m_{N_2O-N}}{NT_A \times \frac{1}{1000} \times V_{et}} \times 100$$

Equa\~{c}\~{a}o 23

Onde:

$\text{Convers\~{a}o}_{N_a \rightarrow N_2O-N}$: fra\~{c}\~{a}o do nitrog\~{e}nio afluyente ao reator convertido a N_2O (%);

m_{N_2O-N} : massa de N_2O liberada expressa em termos de nitrog\~{e}nio (g N- N_2O);

NT_A : concentra\~{c}\~{a}o de nitrog\~{e}nio total afluyente (mg N L^{-1});

$\frac{1}{1000}$: fator de convers\~{a}o de (mg L^{-1}) para (g L^{-1});

V_{et} : volume de efluente tratado em uma batelada (L).

Fator de Emiss\~{a}o (FE)

O fator de emiss\~{a}o de N_2O \~{e} calculado relacionando-se a massa de N_2O liberada, a gera\~{c}\~{a}o *per capita* de esgoto e o volume de efluente tratado (Equa\~{c}\~{a}o 24).

$$FE = m_{N_2O-N} \times \frac{Q_{ep}}{V_{et}} \times 365$$

Equa\~{c}\~{a}o 24

Onde:

FE: Fator de Emiss\~{a}o de N_2O (g N- N_2O pessoa $^{-1}$ ·ano $^{-1}$);

m_{N-N_2O} : massa de N_2O liberado em um ciclo, expressa em termos de nitrog\~{e}nio (g N- N_2O);

Q_{ep} : gera\~{c}\~{a}o *per capita* di\~{a}ria de esgoto (L_{esgoto} pessoa $^{-1}$ ·dia $^{-1}$);

V_{et} : volume de efluente tratado em um ciclo (L).

Fator de Emiss\~{a}o Baseado na Vaz\~{a}o (FEBV)

O fator de emiss\~{a}o baseado na vaz\~{a}o \~{e} calculado utilizando-se a Equa\~{c}\~{a}o 25.

82 Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular

$$FEBV = \frac{m_{N_2O}}{V_{et}}$$

Equação 25

Onde:

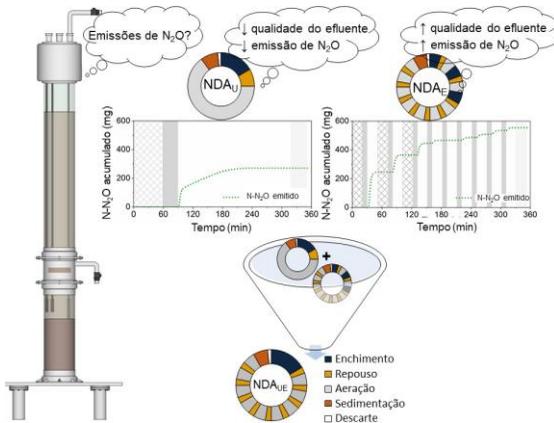
FEBV: Fator de emissão baseado na vazão ($\text{gN}_2\text{O L}^{-1}$);

m_{N_2O} : massa de N_2O emitida em um ciclo (gN_2O);

Vet: volume de efluente tratado em um ciclo (L).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AVALIAÇÃO DE CONFIGURAÇÕES OPERACIONAIS NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO EM UM REATOR COM LGA, COM FOCO NA PRODUÇÃO E EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO



Resumo: A tecnologia de lodo granular aeróbico (LGA) é aplicada para o tratamento biológico de efluentes domésticos e industriais devido ao efluente de alta qualidade, que é produzido em um sistema compacto e apresenta biomassa com boa capacidade

de sedimentação. No entanto, durante o processo de nitrificação-desnitrificação, compostos nitrogenados podem vir a formar óxido nitroso (N_2O), tido como um dos principais gases contribuintes para o efeito estufa. Assim, apesar de a qualidade do efluente tratado estar dentro dos parâmetros de lançamento, os danos causados à atmosfera não podem ser negligenciados. Neste contexto, foi estudado um reator em bateladas sequenciais (RBS) com LGA, aplicando-se duas configurações operacionais de ciclos: enchimento único (NDA_U) e enchimento alternado (NDA_E), de forma a promover a remoção de carbono, fósforo e nitrificação-desnitrificação alternadas. Em paralelo, foram quantificadas a produção e a emissão de N_2O . Ao longo dos experimentos verificou-se que as remoções de carbono (DQO_T) (NDA_U: $79 \pm 11\%$; NDA_E: $79 \pm 5\%$) e fósforo (TP) (NDA_U: $34 \pm 13\%$; NDA_E: $38 \pm 11\%$) foram semelhantes para as duas condições operacionais. Em relação ao nitrogênio, a condição NDA_E foi mais vantajosa, tanto para o nitrogênio amoniacal (NDA_U: 77% ; NDA_E: 95%) quanto para o nitrogênio total (NDA_U: 32% ; NDA_E: 54%), porém, maiores emissões de N_2O foram observadas no NDA_E, e um total de 5-16% do N_T foi emitido como N_2O . Pelo sequenciamento de nova geração, gêneros

como *Thauera*, que são desnitrificantes heterotróficos, de crescimento rápido, estiveram presentes com abundância relativa de 2,1% (dia 462, NDA_U) e 3,8% (dia 556, NDA_E). Igualmente, organismos de crescimento lento capazes de desnitrificar e também de remover o fósforo, como *Defluvicoccus* e *Tetrasphaera*, estiveram presentes na condição NDA_U. A fim de reduzir as emissões de N₂O e obter as maiores eficiências de tratamento, esta pesquisa sugere uma fusão das duas configurações testadas, com uma alimentação única e contínua, seguida de aeração intermitente.

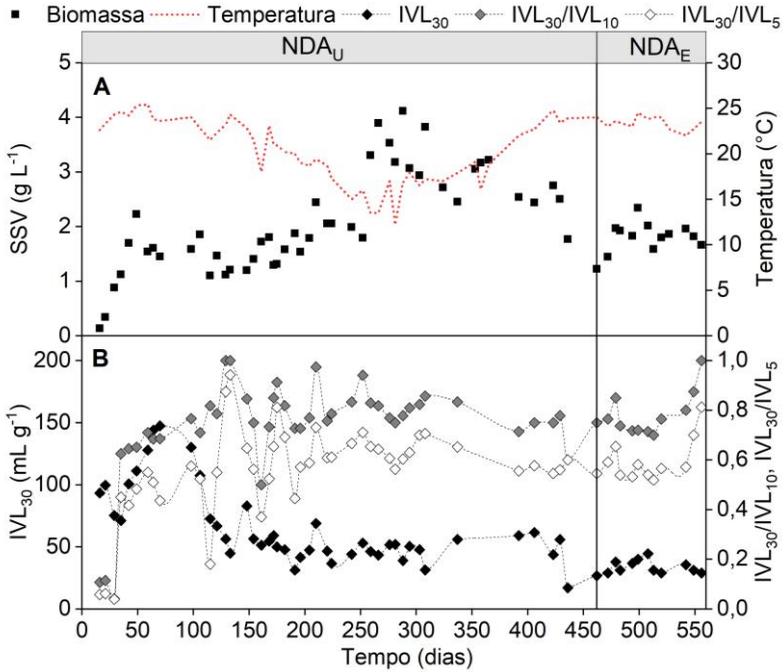
4.1.1 Caracterização do lodo granular

A fim de acumular uma alta concentração de biomassa, para um bom desempenho do sistema de lodo granular (PRONK *et al.*, 2015), foram adotadas as seguintes condições nas configurações operacionais estudadas: enchimento lento de fluxo ascendente, com velocidade ascensional do afluente de 1,5 m h⁻¹ e aplicação de baixa pressão de seleção hidráulica durante a fase de sedimentação (NDA_U: 30 min; NDA_E: 24 min), de acordo com as recomendações de Guimarães *et al.* (2018).

Na NDA_U, a concentração de biomassa aumentou até o dia 49 durante o período de partida do reator, atingindo uma concentração de SSV de 2,3 g L⁻¹. Em seguida, a concentração de SSV manteve uma média de 1,5 g SSV L⁻¹ até o dia 150, seguindo-se um aumento adicional observado até o dia 288, atingindo a máxima concentração de 4,1 g L⁻¹ (Figura 16A). Apesar do desenvolvimento da biomassa no sistema e, conseqüentemente, do acúmulo de sólidos no reator, o tempo de retenção de sólidos (idade do lodo) não foi controlado, atingindo 67 dias.

Essa elevada idade do lodo resultou no aparecimento de microrganismos na biomassa, como *Aeolosoma hemprichi*, conforme é apresentado na Figura 17. Esse metazoário pode deteriorar a qualidade da água e a estabilidade do sistema, já que utiliza as partículas de sólidos como alimento e libera nutrientes na fase líquida (SONG; CHEN, 2009; ZHAN *et al.*, 2014). Desse modo, a partir do dia 288 a idade do lodo foi controlada (máximo de 15 dias) com descarte periódico. Conseqüentemente, a concentração de SSV diminuiu até o final da fase NDA_U, mantendo um valor médio de 2,7 g SSV L⁻¹.

Figura 16- Concentração da biomassa no reator e temperatura do esgoto afluyente (A); e sedimentabilidade do lodo (IVL) durante a NDA_U e a NDA_E .



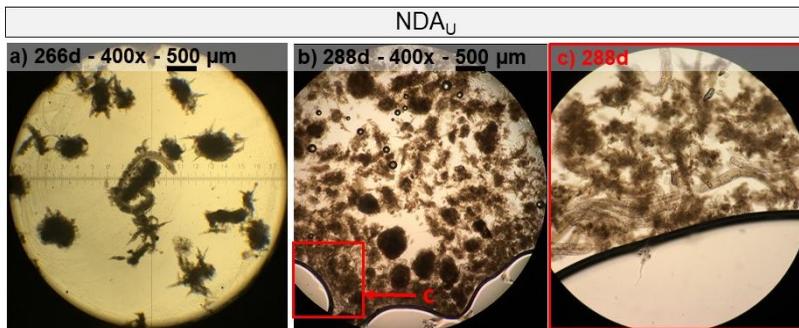
Fonte: O Autor.

Durante a NDA_E , a idade do lodo também foi controlada em 15 dias e a concentração de biomassa teve um valor médio de $2,0 \text{ g L}^{-1}$. Nas duas configurações, entretanto, a biomassa não atingiu concentrações substancialmente altas (Figura 16A), como citado em trabalho com lodo granular ($8 - 10 \text{ g SSV L}^{-1}$) por Pronk *et al.* (2015), que alcançaram 8 g SSV L^{-1} em 9 meses, e com idade do lodo entre 20 e 38 dias.

No presente estudo, porém, a concentração de SSV obtida foi muito maior comparada àquela obtida por Guimarães *et al.* (2018) de $1,5 \text{ g SSV L}^{-1}$, usando o mesmo reator, mas com alimentação em menor tempo (alimentação em um pulso) e alta pressão de seleção com tempos de sedimentação curtos (15 min). Assim, as configurações de enchimento lento do tipo estático, além da baixa pressão de seleção hidráulica, com uma fase prolongada de sedimentação, resultaram em

maiores concentrações de biomassa no reator, entretanto, o aparecimento de vermes e o efeito do controle da idade do lodo em 15 dias contribuíram para o estabelecimento da concentração de biomassa em 2 g SSV L^{-1} . No sentido de alcançar maior acúmulo de biomassa, um TRS maior poderia ser testado, como aquele relatado por Pronk *et al.* (2015), que aplicaram 30 dias. Igualmente, para evitar o aparecimento de vermes, outros métodos, além do controle do TRS, podem ser adotados. Por exemplo, Xu *et al.* (2018) observaram a proliferação de metazoários identificados como *Aelosoma hemprichi* em um reator de lodo ativado de leito fixo integrado à remoção biológica de nutrientes. Das diferentes condições aplicadas no estudo para eliminar os vermes, a mais efetiva foi desligar a injeção de oxigênio dissolvido na zona aeróbia por 48 horas, além de cortar a fonte de alimentação de afluente, interromper a recirculação do licor misto nitrificado e manter os sólidos suspensos em baixa concentração no sistema.

Figura 17-*Aelosoma hemprichi* na biomassa durante a configuração NDA_U antes do controle da idade do lodo.



Fonte: O Autor.

Em relação à sedimentabilidade da biomassa, os valores médios de IVL_{30} se mantiveram constantes durante as duas condições (NDA_U : 50 mL g^{-1} , em 100 dias; NDA_E : 33 mL g^{-1}), e característica de lodo com boa sedimentabilidade. Nos dois casos, os valores de IVL_{30} estão de acordo com o relatado em estudos de LGA com efluentes sanitários (AWANG *et al.*, 2017; PRONK *et al.*, 2015). Os resultados de $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_{10}$ e $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_5$ ficaram em torno de 1 e 0,9 mL g^{-1} , respectivamente (Figura 16B) na NDA_U . Aplicando-se a NDA_E , a capacidade de sedimentação do lodo não foi afetada, obtendo-se valores crescentes de razão de $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_{10}$ e $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_5$, atingindo 1,0 e 0,8

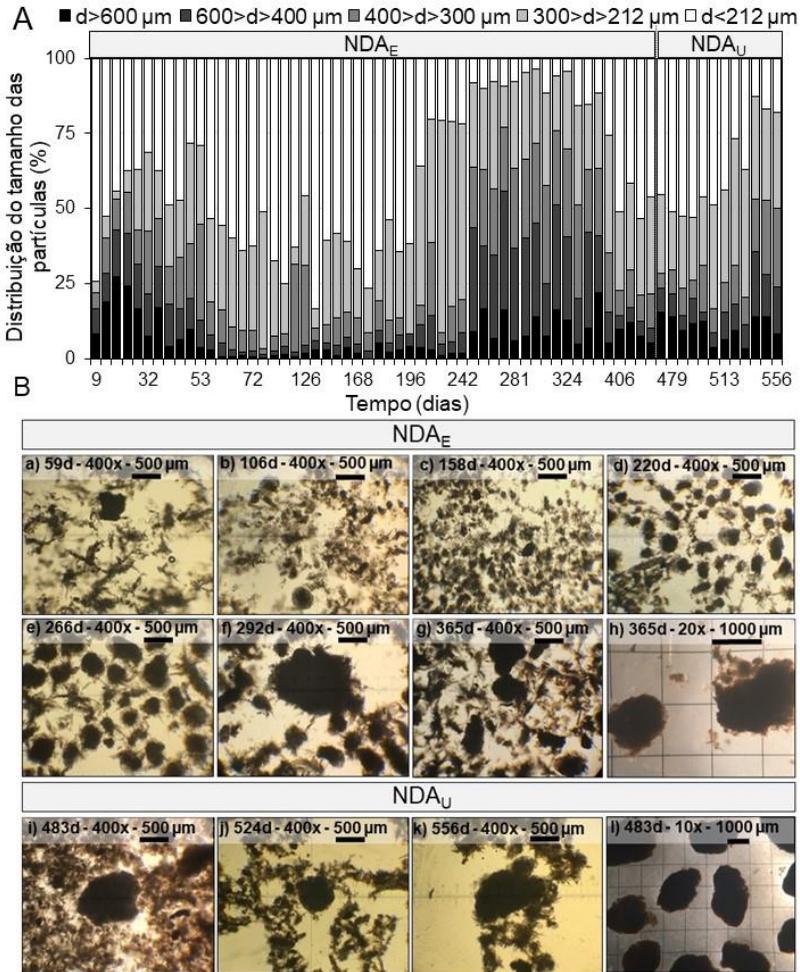
mL g⁻¹ no dia 556. Valores de IVL_{30}/IVL_{10} e IVL_{30}/IVL_5 próximo de 1,0 indicam a característica de lodo granular aeróbio (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007).

A distribuição do tamanho das partículas e a morfologia da biomassa monitoradas ao longo do estudo estão apresentadas na Figura 18. Na NDA_U, iniciada sem inoculação, observou-se rápida agregação de lodo, com partículas com diâmetro de 212 µm em 16 dias (Figura 18A). A fração majoritária do lodo (> 50%) permaneceu com diâmetro na faixa de 212 – 600 µm até o dia 53 (Figura 18A). A partir desse período até o dia 172, o sistema apresentou uma tendência de redução, resultando em partículas menores, e apenas 37±9% delas possuíam tamanho superior a 212 µm (Figura 18A). Embora a distribuição média do tamanho das partículas de lodo tenha se reduzido no sistema, isso não afetou a razão IVL_{30}/IVL_{10} , que permaneceu com média de 0,8±0,1 (Figura 16B). Além disso, mesmo com agregados pequenos, a análise microscópica entre os dias 59 e 158 exibiu o processo de granulação (Figura 18B a-c), que indicou a diminuição do lodo flocofento e o aparecimento de biomassa granular. Como resultado, após esse período de granulação, que durou aproximadamente 200 dias, o lodo granular e denso dominou o sistema. Assim, a distribuição granulométrica da fração majoritária do lodo (86±8 %), entre os dias 204 e 392, foi superior a 212 µm. Esses resultados corroboram a forma granular da biomassa, com núcleo compacto, observada nesse período (Figura 18B d-h).

No final da NDA_U, após o dia 400, o sistema apresentou novamente diminuição no tamanho das partículas, tendo apenas 47 a 59% do lodo com diâmetro maior que 212 µm. Como o reator não sofreu nenhum distúrbio durante esse período, algum fator relacionado à resistência ou à estabilidade dos grânulos pode ter causado essa redução no tamanho das partículas. Entre esses possíveis fatores, é correto mencionar que a temperatura não foi controlada e flutuou de 12°C a 25°C ao longo do período experimental (Figura 16A), elevando-se acima de 20°C, concomitantemente à redução do tamanho das partículas, portanto, a distribuição granulométrica pode estar relacionada à temperatura, uma vez que grânulos maiores foram observados nos períodos de temperaturas mais amenas (< 20°C). No estudo de Nor-Anuar *et al.* (2012), a estabilidade de grânulos aeróbios cultivados em diferentes temperaturas e alimentados com acetato foi similar, enquanto, para grânulos aeróbios alimentados com esgoto sanitário, quanto maior a temperatura, menor a estabilidade do grânulo. Os autores relacionaram

a alta taxa de crescimento de microrganismos com o aumento da temperatura, enquanto que a estabilidade e a resistência dos grânulos são aprimoradas de acordo com a seleção de microrganismos de crescimento lento (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004).

Figura 18 - Evolução da distribuição do tamanho da partícula (A) e desenvolvimento de grânulos aeróbios ao longo do período de estudo (B).



Fonte: O Autor.

A mudança nas condições operacionais para a configuração NDA_E não afetou diretamente a distribuição granulométrica, sendo observada média de 51% de lodo com diâmetro maior que 212 µm ainda no início da estratégia operacional (Figura 18A). Após 32 dias, uma tendência de crescimento do tamanho dos agregados foi observada ao longo do tempo (Figura 18A). O sistema também apresentou biomassa granular com características de boa sedimentabilidade (Figura 18A e Figura 16B). A análise morfológica mostrou que a implementação da NDA_E manteve a forma de lodo granular, melhorando a biomassa com grânulos mais densos e maiores (até 3 mm) (Figura 18B-1), com menos microrganismos filamentosos na superfície (Figura 18B-i, j, k). Nas Figura 18B-h e Figura 18B-i observam-se grânulos cuidadosamente selecionados, a partir do licor misto, e visualizados em microscópio estereoscópico (Tecnival) com câmera Sedgwick-Rafter. Verifica-se que grânulos na NDA_U apresentaram-se menores (1,0 – 1,5 mm) e com uma superfície mais irregular.

O lodo granular aeróbio (LGA) apresentou uma relevante fração de flocos durante todo o período operacional, no entanto, essa situação não afetou a capacidade de sedimentação e o descarte de sólidos no efluente (NDA_U: 37±17 mg TSS L⁻¹; NDA_E: 29±14 SST L⁻¹). Quando o LGA é aplicado ao tratamento de esgoto real, ele sofre uma grande variação de tamanho e de forma, que depende das condições de operação, da composição do esgoto e do clima local. Partículas com tamanhos similares às encontradas nas duas configurações desse trabalho (principalmente de 212 a 600 µm, Figura 18A) também foram encontradas em estudos anteriores do grupo (WAGNER; COSTA, 2013; WAGNER *et al.*, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2018;), bem como em outros estudos que trabalharam com reatores inoculados com lodos ativados para tratamento de esgoto sanitário (NI *et al.*, 2009). No que diz respeito à forma dos grânulos, os que foram encontrados nesse estudo também estão de acordo com a literatura, exibindo pequenas formas ovais ou de haste, típicos de esgoto de baixa carga (< 200 mg DOQ_s L⁻¹) (AWANG *et al.*, 2017; NI *et al.*, 2009; SU; CUI; ZHU, 2012). Portanto, o presente estudo, de longo prazo (> 200 dias), confirmou que a manutenção de grânulos grandes e circulares sem flocos ainda é um desafio em reatores para o tratamento de esgoto sanitário de baixa carga, em uma região de clima subtropical (altas temperaturas).

4.1.2 Desempenho do reator no tratamento de esgoto sanitário para carbono e fósforo ao longo das configurações NDA_U e NDA_E

4.1.2.1 Remoção de DQO

Os resultados obtidos para as eficiências de remoção, valores médios do efluente, velocidade de remoção volumétrica e específica estão apresentados na Tabela 5. Observa-se que a eficiência de remoção de DQO_T e o valor médio efluente não apresentaram diferença estatística significativa para as duas configurações ($p > 0,005$). Apesar de durante a NDA_U o reator mostrar maior eficiência de remoção de DQO_S, as duas configurações resultaram em valores do efluente semelhantes ($p > 0,05$) (46 mg L⁻¹ e 49 mg L⁻¹ para NDA_U e NDA_E, respectivamente). A série de dados temporais está apresentada na Figura 19A. As velocidades de remoções específicas da DQO_T e DQO_S foram estatisticamente maiores para a NDA_U ($p < 0,05$) (0,65±0,55 g DQO_T d⁻¹ g⁻¹SSV; 0,26±0,22 g DQO_S d⁻¹ g⁻¹SSV) do que para NDA_E (0,41±0,11 g DQO_T d⁻¹ g⁻¹SSV; 0,16±0,04 g DQO_S d⁻¹ g⁻¹SSV) (Tabela 5). Ressalta-se que, os valores de qDQO_T e qDQO_S são menores do que os valores encontrados por Guimarães *et al.* (2018) (0,85±0,43 g DQO_T d⁻¹ g⁻¹SSV; 0,51±0,25 g DQO_S d⁻¹ g⁻¹SSV) no mesmo sistema, com um tempo de alimentação de 20 minutos.

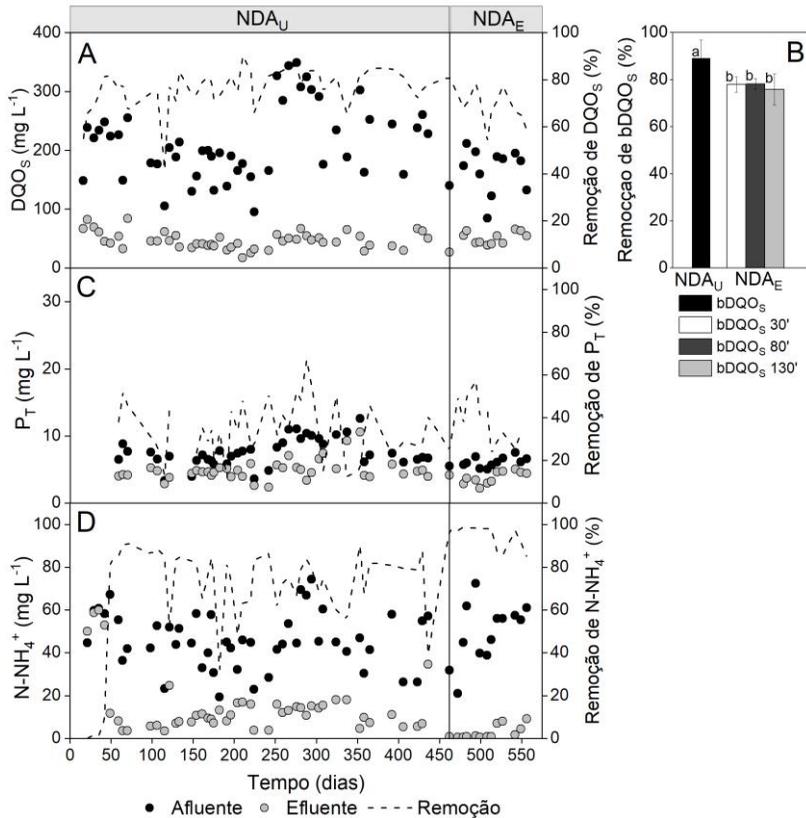
Tabela 5 - Eficiências de remoção, valores médios efluente, velocidade de remoção volumétrica e específica de carbono e fósforo nas duas configurações.

<i>Eficiências de remoção</i>	<i>NDA_U</i>	<i>NDA_E</i>
DQO _T (%)	79 ± 11	79 ± 5
DQO _S (%)	77 ± 9	69 ± 7
PT (%)	34 ± 13	38 ± 11
<i>Valores médios efluentes</i>		
DQO _T (mg L ⁻¹)	90 ± 41	77 ± 19
DQO _S (mg L ⁻¹)	46 ± 14	49 ± 10
PT (mg L ⁻¹)	5 ± 2	4 ± 1
<i>Velocidade de remoção volumétrica e específica de substrato</i>		
rDQO _T (g d ⁻¹ L ⁻¹)	1,08 ± 0,60	0,80 ± 0,23
qDQO _T (g d ⁻¹ g ⁻¹ SSV)	0,65 ± 0,55	0,41 ± 0,11
rDQO _S (g d ⁻¹ L ⁻¹)	0,42 ± 0,15	0,29 ± 0,09
qDQO _S (g d ⁻¹ g ⁻¹ SSV)	0,26 ± 0,22	0,16 ± 0,04
rPT (g d ⁻¹ L ⁻¹)	0,007 ± 0,004	0,006 ± 0,002
qPT (g d ⁻¹ g ⁻¹ SSV)	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,001

Fonte: O Autor.

Os maiores valores de $qDQO_T$, $qDQO_S$ obtidos durante a NDA_U podem ser atribuídos ao longo período de alimentação contínua (60 minutos) aplicado neste regime operacional, diferentemente do que se fez na NDA_E (alimentação escalonada em três fases de 20 minutos).

Figura 19 - Séries temporais afluentes e efluentes e eficiências de remoção de: DQO_S e $bDQO_S$ (A, B); P_T (C); e $N-NH_4^+$ (D) para ambas as configurações operacionais.



Fonte: O Autor.

Em ambas as configurações, o fluxo lento e a alimentação supostamente anaeróbia, seguida de fase repouso, foram introduzidos com o intuito de promover a hidrólise da DQO_T e o consumo da matéria orgânica biodegradável ($bDQO_S$). Na NDA_U , as fases de alimentação e

repouso ocorreram de forma contínua (60 minutos e 30 minutos, respectivamente), enquanto na NDA_E ocorreu de forma escalonada (três fases de alimentação seguidas de fases repouso). A análise de *one-way* ANOVA revelou diferenças entre as médias $bDQO_S$, e o teste de Tukey *post hoc* mostrou que a remoção de $bDQO_S$ no período anaeróbio foi maior durante a NDA_U ($90 \pm 8\%$) do que em NDA_E ($p < 0,05$), $78 \pm 3\%$, $78 \pm 2\%$, $79 \pm 7\%$ na primeira (30 min), segunda (80 min) e terceira fase (130 min) anóxica (enchimento e repouso), respectivamente (Figura 19B). O tempo de contato anaeróbio, promovido no enchimento único e contínuo em NDA_U , pode ter influenciado positivamente a remoção de $bDQO_S$ pelos microrganismos de crescimento lento, em relação ao tempo de contato no enchimento escalonado (NDA_E), onde a $bDQO_S$ também foi consumida na fase de aeração.

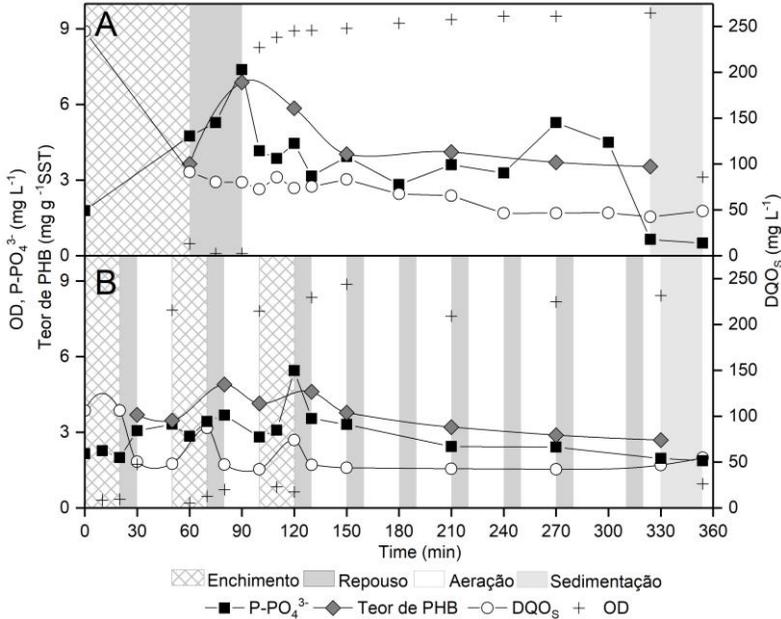
4.1.2.2 Remoção de Fósforo

Nas duas configurações, o enchimento lento do tipo estático foi aplicado com o objetivo de promover a hidrólise da matéria orgânica particulada e o consumo de DQO_S de forma anaeróbia. Essas características são pré-requisitos para favorecer o desenvolvimento de microrganismos de crescimento lento, como os organismos acumuladores de polifosfato (PAO), para alcançar a remoção biológica de fósforo. A liberação do fósforo simultaneamente ao consumo de DQO , durante o enchimento e o repouso, observados em ambas as configurações, sugere a presença de metabolismo de PAO (RUBIO-RINCÓN *et al.*, 2019). Comparando-se ciclos operacionais monitorados (Figura 20), pode-se observar uma diferença substancial entre a atividade destes microrganismos pelo consumo e liberação de $PO_4^{3-}-P$.

Sob a alimentação estática e prolongada na NDA_U , observa-se na Figura 20A o contínuo consumo e liberação de $PO_4^{3-}-P$, concomitante ao consumo anaeróbio de DQO_S , acompanhado de armazenamento de PHB na biomassa durante a fase de alimentação e repouso. No final da fase de repouso, a fração líquida apresentou valores de $7,4 \text{ mg } PO_4^{3-}-P \text{ L}^{-1}$ e $80 \text{ mg } DQO_S \text{ L}^{-1}$, enquanto o carbono armazenado internamente na biomassa atingiu concentrações de $6,9 \text{ mg PHB g}^{-1} \text{ SST}$. Assim que a alimentação e a fase de repouso foram cessadas, o oxigênio fornecido alterou o perfil do ciclo, com a captação de fosfato combinada ao consumo de PHB (Figura 20A), conforme esperado pelo metabolismo PAO. O ciclo operacional em NDA_U foi eficiente na biodesfosfatação, visto que o reator apresentou concentração efluente final $0,5 \text{ mg } PO_4^{3-}-P \text{ L}^{-1}$, quando recebeu $2,7 \text{ mg } PO_4^{3-}-P \text{ L}^{-1}$ no afluente. O PHB presente na

biomassa foi simultaneamente consumido até atingir a concentração de 3,5 mg PHB g⁻¹ TSS no final da fase de aeração.

Figura 20 - Perfis de OD, PO₄³⁻-P, DQO_S e teor de PHB na biomassa, durante um ciclo operacional padrão em regime NDA_U (A) e NDA_E (B).



Fonte: O Autor.

Por outro lado, o ciclo operacional no regime NDA_E, com alimentação escalonada seguida pelas fases de repouso e aeração intermitentes, resultou na liberação e captação periódica de fosfato durante os primeiros 120 minutos do ciclo (Figura 20B), atingindo a máxima liberação no final do último bloco de alimentação, com 5,4 PO₄³⁻-P L⁻¹. O carbono seguiu o mesmo perfil de “zig-zag”. A DQO_S foi parcialmente consumida de forma anaeróbia, enquanto foi fornecida pelas etapas de enchimento, o que pode ser conferido pelo aumento do PHB na biomassa observado na Figura 20B.

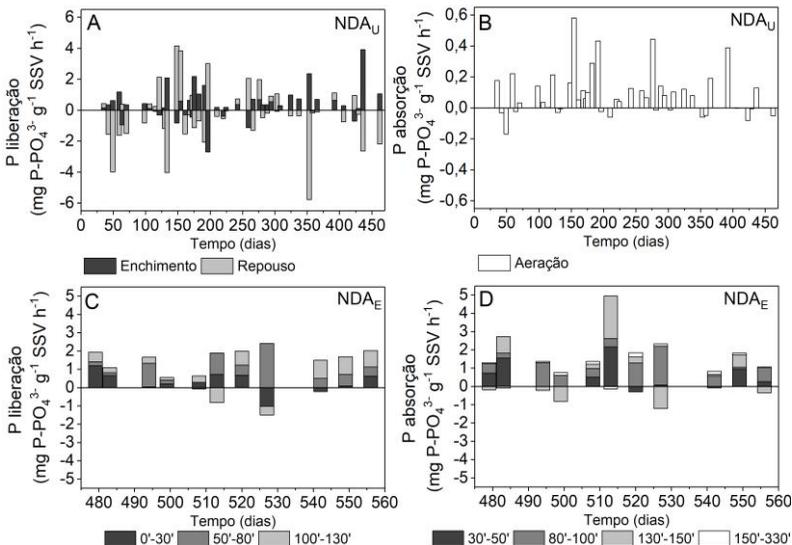
O PHB na biomassa aumentou para 4,9 mg g⁻¹ SST no final da segunda etapa de alimentação, seguido de consumo aeróbio. A concentração aumentou novamente na terceira etapa (terceira alimentação + repouso) atingindo valores de 4,6 mg PHB g⁻¹ SST. No entanto a DQO_S também foi consumida sob condições aeróbias e

anóxicas, como demonstrado pela sua redução nas fases de repouso seguidas de enchimento, atingindo valores de 47 mg DQO_s L⁻¹ no terceiro repouso, que é a última fase após a alimentação (Figura 20B).

A concentração de OD atingiu 0,3, 0,5 e 0,6 mg OD L⁻¹, no primeiro, segundo e terceiro períodos de repouso, respectivamente (Figura 20B). Além disso, os compostos nitrito e nitrato foram gradualmente consumidos durante os primeiros 120 minutos do ciclo na NDA_E (Figura 23C), o que sugere fortemente a ocorrência do processo de desnitrificação (discutido posteriormente). Portanto, a configuração NDA_E não forneceu condição anaeróbia restrita para o consumo de DQO, necessária para o metabolismo das PAO, mas aparentemente forneceu boas condições para as desnitrificantes heterotróficas convencionais. Como consequência, sob este regime a liberação de fosfato foi menor e o *luxury-uptake* de fósforo não foi notado quando comparado com a NDA_U.

Durante a NDA_U, uma maior absorção anóxica de fósforo foi observada para as fases de alimentação e repouso, atingindo valores da ordem de 6 mg P-PO₄³⁻ g⁻¹SSV h⁻¹ (dia 350) (Figura 21A), enquanto o valor máximo atingido foi de 0,5 mg PO₄³⁻-P g⁻¹SSV h⁻¹ (dia 150) na fase de aeração (Figura 21B).

Figura 21 - Velocidades de liberação de fósforo (qP liberação) e de absorção (qP absorção) calculadas nas configurações operacionais.



Fonte: O Autor.

Esse comportamento na NDA_U pode indicar a presença de PAO capaz de realizar a remoção biológica de fósforo, com o $NOx-N$ comoceptor de elétrons. Relação positiva entre as concentrações efluentes de P_T e $N-NOx$ foram encontradas na literatura (LÓPEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2008), sugerindo que a remoção biológica de fósforo está relacionada com a remoção de nitrogênio como consequência da presença de PAO capaz de desnitrificar (DPAO). Na NDA_E , a absorção de fósforo na fase anóxica foi menor que a observada em NDA_U . No entanto, o comportamento de liberação e absorção de fósforo nessa configuração foi bem definido nas fases anóxicas (alimentação + repouso) e aeróbias (Figura 21C e D), respectivamente. Portanto, as evidências encontradas nas duas configurações sugerem a presença de DPAO, favorecida pelas condições aplicadas, sendo mais pronunciada na NDA_U .

Neste estudo, embora as atividades de PAO ou DPAO tenham sido observadas ao longo do ciclo operacional (Figura 20) e durante o tempo operacional (Figura 21), as eficiências de remoção de fósforo foram pequenas e não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas duas configurações ($34 \pm 13\%$ e $38 \pm 11\%$ para NDA_U e NDA_E , respectivamente) (Figura 19C). A remoção de fósforo na NDA_U foi máxima no dia 266 (67%) e apresentou concentração efluente de $3,4 \text{ mg P L}^{-1}$. Na NDA_E , a eficiência máxima foi de 57%, mas com menor concentração no efluente, $2,2 \text{ mg P L}^{-1}$ no dia 499 (Figura 19C). Esse resultado de remoção de fósforo é semelhante ao encontrado por Guimarães *et al.* (2018) (38%) no mesmo sistema, porém os autores operaram com tempo de ciclo de 4 horas e fase de alimentação de 20 minutos.

As mesmas condições adequadas para os organismos PAO favorecem os organismos acumuladores de glicogênio (GAO). Fatores como o tipo de fonte de carbono no afluente (acetato, propionato etc.), carga de fósforo e razão carbono fósforo (C:P) no afluente, pH e temperatura foram apontados como determinantes na competição entre PAO e GAO. A complexidade e a variabilidade da composição dos esgotos sanitários, além das oscilações de parâmetros como pH e temperatura, podem favorecer os agregados de GAO em alguns pontos, os quais consomem a DQO, no entanto não contribuem para remoção de fósforo (RUBIO-RINCÓN *et al.*, 2017; WEISSBRODT *et al.*, 2013).

As cargas de fósforo foram muito semelhantes para NDA_U ($17 \text{ mg P}_T \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e NDA_E ($16 \text{ mg P}_T \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), porém foi observada uma diferença na razão C:P ($64 \text{ g DQO}_S \text{ g}^{-1} \text{ P}_T$ e $84 \text{ g DQO}_S \text{ g}^{-1} \text{ P}_T$,

respectivamente). No entanto, a razão C:P está na faixa considerada ótima para o desenvolvimento de PAO ($50-100 \text{ g DQO}_5 \text{ g}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3-}$) combinada a condições apropriadas, como seletor anaeróbico através de enchimento lento (WEISSBRODT *et al.*, 2013). Portanto, as eficiências de remoção de fósforo provavelmente foram baixas devido à composição do esgoto local, que possuía estrutura de carbono complexa e ácidos graxos voláteis (AGV) insuficientes para esses organismos.

Outros fatores que podem influenciar a remoção de fósforo são: temperatura do afluente e pH no período anaeróbico do reator] (WEISSBRODT *et al.*, 2013; RUBIO-RINCÓN *et al.*, 2017). Neste estudo, a temperatura do afluente foi de $21 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ para NDA_U e NDA_E, respectivamente. O pH registrado após as fases de alimentação e repouso na configuração NDA_U foi $6,7 \pm 1,2$, enquanto que o pH medido após essas fases na NDA_E foi de $7,7 \pm 0,5$. Esse valor representa o pH do afluente bruto com um incremento do pH gerado pela atividade desnitrificante, se estiver presente durante essas fases do ciclo, como foi observado na NDA_E. Weissbrodt *et al.* (2013) sugeriram que os principais fatores que desencadeiam a seleção de PAO e GAO em LGA são pH ($> 7,3$) e temperatura (15°C). Além disso, os autores relataram que PAO é capaz de competir com GAO mesmo em temperaturas mesofílicas, desde que sejam proporcionadas condições alcalinas. Nesse estudo, o valor de pH mais elevado foi observado na NDA_E, no entanto, nenhuma melhora significativa do EBPR foi observada, provavelmente devido às temperaturas mais elevadas ($>15^\circ \text{C}$).

4.1.2.3 Remoção de nitrogênio, produção e emissão de N₂O

Na condição operacional NDA_U, a remoção de amônia começou aos 49 dias, apresentando eficiência de 82% (Figura 19D). O desempenho da nitrificação manteve-se até o fim dessa configuração com valores médios de $77 \pm 12\%$ ($10 \pm 5 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ no efluente), atingindo a eficiência máxima de remoção de 91% ($3,6 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ no efluente) e 97% ($1,0 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ no efluente) nos dias 70 e 462, respectivamente. Os resultados apresentados foram melhores que a remoção de N-NH₄⁺ (78%, $17 \pm 12 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ no efluente), previamente reportados por Guimarães *et al.* (2018), operando o mesmo reator piloto, porém com ciclo de 4 horas, com alimentação em fase única e tempo curto de aeração. Após a alteração para a configuração NDA_E, a remoção de nitrogênio total melhorou, e foi cerca de 20% maior quando comparada à NDA_U (Tabela 6, Figura 19). O enchimento escalonado, seguido de fases de repouso e aeração intermitentes,

promoveu maior eficiência de remoção de amônia (95 ± 5 %), com concentração efluente de $3,0 \pm 3,3$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹ (Figura 19D). Esses resultados estão de acordo com Lochmatter, Gonzalez-Gil e Holliger (2013), que reportaram um aumento na remoção de nitrogênio de aproximadamente 10%, mudando a operação do reator que favorecia a “nitrificação e desnitrificação simultâneas” para uma configuração de “nitrificação e desnitrificação alternadas”.

Tabela 6 - Eficiências de remoção, valores médios efluentes, velocidade de remoção volumétrica e específica dos compostos nitrogenados nitrogênio nas duas configurações operacionais estudadas.

<i>Eficiências de remoção</i>	<i>NDA_U</i>	<i>NDA_E</i>
N-NH ₄ ⁺ (%)	77 ± 12	95 ± 5
NT (%)	31 ± 15	54 ± 11
<i>Valores médios efluentes</i>		
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	10 ± 5	3 ± 3
N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	2 ± 4	12 ± 8
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	18 ± 11	7 ± 5
<i>Velocidade de remoção volumétrica e específica de substrato</i>		
rN-NH ₄ ⁺ (g d ⁻¹ L ⁻¹)	0,07 ± 0,04	0,12 ± 0,03
qN-NH ₄ ⁺ (g d ⁻¹ g ⁻¹ SSV)	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,02

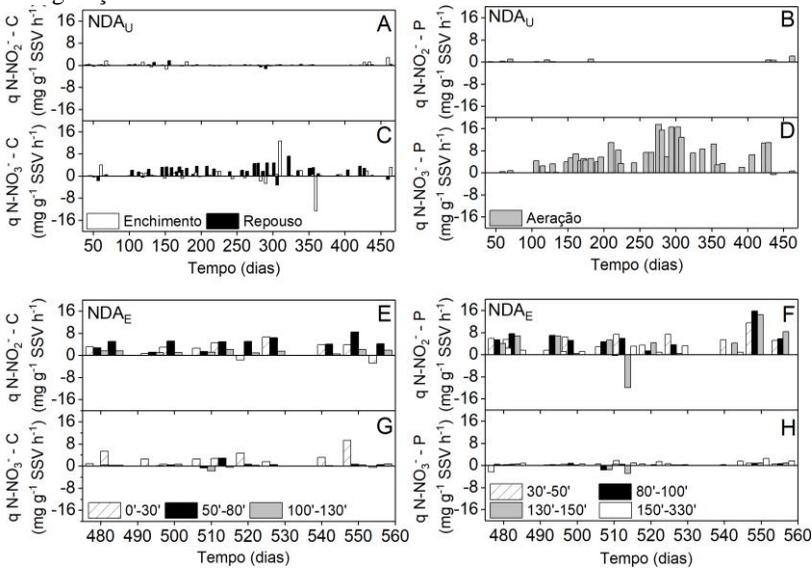
Fonte: O Autor.

As velocidades volumétricas (rN-NH₄⁺) e específicas (qN-NH₄⁺) de remoções de nitrogênio amoniacal foram cerca de duas vezes maiores durante NDA_E ($0,12 \pm 0,03$ g N-NH₄⁺ d⁻¹ L⁻¹; $0,07 \pm 0,02$ g N-NH₄⁺ d⁻¹ g⁻¹ SSV, respectivamente) do que na NDA_U ($0,07 \pm 0,04$ g N-NH₄⁺ d⁻¹ L⁻¹; $0,04 \pm 0,02$ g N-NH₄⁺ d⁻¹ g⁻¹ SSV, respectivamente) (Tabela 6). Embora os maiores valores de rN-NH₄⁺ e qN-NH₄⁺ tenham sido observados na NDA_E, neste regime foi observada a presença de nitrificação parcial, resultando, principalmente, em acúmulo de nitrito no efluente (12 ± 8 mg N-NO₂⁻ L⁻¹; 7 ± 5 mg N-NO₃⁻ L⁻¹) (Tabela 6), enquanto que na NDA_U o nitrogênio amoniacal foi oxidado até nitrato (2 ± 4 mg N-NO₂⁻ L⁻¹; 18 ± 11 mg N-NO₃⁻ L⁻¹).

De fato, na NDA_U, as velocidades específicas de produção (qNO₃⁻-N-P) e consumo (qNO₃⁻-N-C) foram maiores ($5,55 \pm 4,95$ mg N-NO₃⁻-P g⁻¹ SSV h⁻¹; $1,80 \pm 1,96$ mg N-NO₃⁻-C g⁻¹ SSV h⁻¹) (Figura 22D e C) quando comparadas à configuração NDA_E ($0,33 \pm 0,38$ mg N-NO₃⁻-P

$g^{-1}SSV h^{-1}$; $1,18 \pm 1,29 \text{ mg N-NO}_3^{-}-C \text{ g}^{-1}SSV h^{-1}$) (Figura 22H e G). Por outro lado, os valores de $qN\text{-NO}_2^{-}-P$ e $N\text{-NO}_2^{-}-C$ foram mais proeminentes na NDA_E ($4,10 \pm 1,80 \text{ mg N-NO}_2^{-}-P \text{ g}^{-1}SSV h^{-1}$; $2,70 \pm 1,25 \text{ mg N-NO}_2^{-}-C \text{ g}^{-1}SSV h^{-1}$) (Figura 22F e E) do que na NDA_U ($0,14 \pm 0,40 \text{ mg N-NO}_2^{-}-P \text{ g}^{-1}SSV h^{-1}$; $0,13 \pm 0,63 \text{ mg N-NO}_2^{-}-C \text{ g}^{-1}SSV h^{-1}$) (Figura 22B e A).

Figura 22 - Velocidade específica produção e consumo de $NO_x\text{-N}$ em ambas configurações.

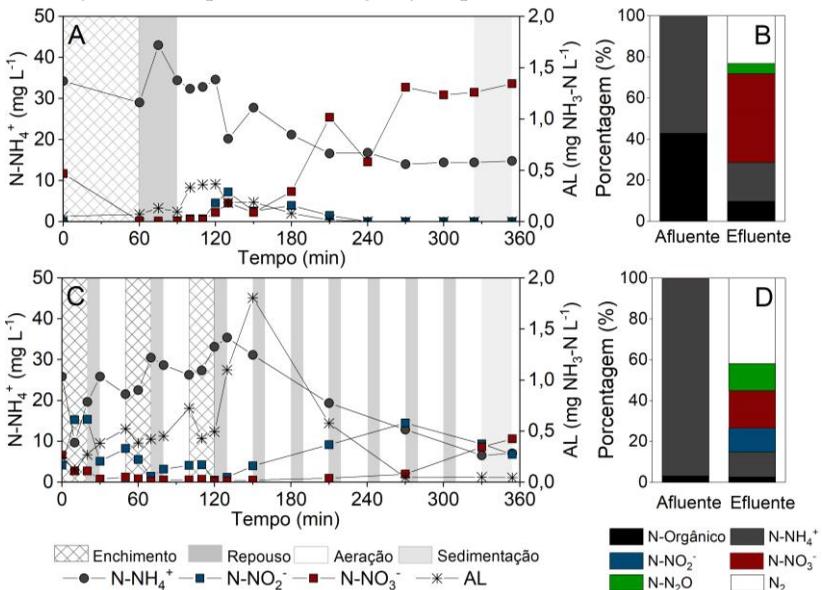


Fonte: O Autor.

Esses valores foram semelhantes aos índices específicos de biomassa encontrados por Guimarães *et al.* (2018), porém os valores de $qN\text{-NO}_3^{-}-P$ no presente estudo foram duas vezes maiores. O melhor desempenho da oxidação de nitrogênio amoniacal para nitrato em NDA_U (maior $qN\text{-NO}_3^{-}-P$), pode estar relacionado a maior duração da fase aeróbia do ciclo nesta configuração que na NDA_E (50% de oxidação). Além disso, a média da idade do lodo foi maior para NDA_U (23 ± 14 dias) do que para NDA_E (14 ± 5 dias), o que pode ter favorecido o desenvolvimento de bactérias oxidadoras de nitrito (NOB), uma vez que esses microrganismos apresentam menor tempo de crescimento que bactérias oxidadoras de amônia (AOB), em condições de clima quente ($18\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$) (HELLINGA *et al.*, 1998).

Além da idade do lodo, a concentração de amônia livre (AL) é outro fator que pode ter influenciado a maior concentração de nitrito durante a NDA_E. A inibição das NOB por AL ocorre no intervalo de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹, e a inibição das AOB ocorre entre 10 e 150 mg L⁻¹ (ANTHONISEN *et al.*, 1976). Na NDA_E, a concentração de AL pode ser correlacionada às altas concentrações de nitrito observadas. Comparando-se o comportamento da AL durante o ciclo típico de cada configuração (Figura 23), verifica-se uma diferença substancial.

Figura 23- Perfil operacional dos compostos nitrogenados e amônia livre (A, C) e balanço de massa para cada configuração operacional (B, D).



Fonte: O Autor.

Na NDA_U (Figura 23A), a nitrificação começou a partir dos 90 minutos, tendo como principal produto o nitrato (34 mg L⁻¹). A concentração de AL ao longo do ciclo decresceu de 0,36 para valores abaixo de 0,1 mg L⁻¹ (180 min). Na NDA_E (Figura 23B), a alimentação escalonada forneceu um aumento gradual de $N-NH_4^+$ no reator, seguida por oxidação durante 20 minutos nas fases de aeração subsequentes. Após este período, o $N-NH_4^+$ foi oxidado a nitrito (6,8 mg L⁻¹) e depois a nitrato (10,6 mg L⁻¹), e o AL diminuiu de 1,81 mg L⁻¹ para valores abaixo de 0,1 mg L⁻¹ até o final do ciclo.

Em ambos os ciclos foram encontrados valores de $N-NH_4^+$ típicos de esgoto sanitário (NDA_U : $45 \text{ mg } NH_4^+ -N \text{ L}^{-1}$; NDA_E : $56 \text{ mg } N-NH_4^+ \text{ L}^{-1}$), entretanto, a configuração NDA_E apresentou pH mais básico (7-8) e temperatura mais alta (24-26 °C), que podem ter influenciado na inibição das NOB, devido a maior concentração de AL. O pH alcalino e a alta temperatura também foram observados por Guimarães *et al.* (2018), além de estarem relacionados a maior concentração de $N-NH_4^+$ na configuração com maiores concentrações de amônia livre (AL). Baet *et al.* (2019) destacaram que quando é necessária a remoção de nitrogênio via nitrito, o acúmulo desse composto no sistema é mais influenciado pela idade do lodo e pela concentração de OD, do que pela inibição por AL. A junção de menor idade do lodo, menor tempo de aeração e maior concentração de AL resultou em maior concentração de $N-NO_2^-$ na NDA_E do que na NDA_U .

O acúmulo de nitrito foi evidenciado em estudos em escala piloto conduzidos no mesmo sistema (GUIMARÃES *et al.*, 2018; JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014; WAGNER *et al.*, 2015b). Esse problema pode ser resolvido por meio do processo simultâneo de nitrificação e desnitrificação que pode ocorrer dentro do grânulo, devido à presença de regiões estratificadas e com a formação de gradientes de oxigênio. No entanto, grânulos de pequeno diâmetro podem impedir a existência de zonas anóxicas e aeróbias, favorecendo a formação de agregados puramente aeróbios. Desta forma, a NDS (nitrificação – desnitrificação simultâneas) não ocorre, exigindo a separação temporal da nitrificação e desnitrificação por meio da introdução de uma fase não aerada no ciclo (LOCHMATTER; GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2013). Neste estudo, a configuração do ciclo com alimentação em fluxo lento, seguido de fase de repouso (possivelmente anóxica) foi projetada para contribuir com o processo de desnitrificação, além de favorecer a hidrólise da matéria orgânica particulada. No entanto, a remoção de nitrogênio total (NT) foi baixa em ambas as configurações (NDA_U : $31 \pm 15\%$; NDA_E : $54 \pm 11\%$) (Tabela 6). A maior eficiência de remoção de NT alcançada na NDA_E está relacionada à alimentação escalonada, seguida pelas fases de repouso e aeração, que promoveram a separação temporal da nitrificação e da desnitrificação. A NDA_E apresentou maior eficiência de nitrato-redução, porém a formação de N_2O foi maior nesta que em NDA_U (NDA_U : 5%; NDA_E : 13% do NT removido e emitido como N_2O) (Figura 23B e D).

Nas Figura 24 A-F estão apresentados os dados relativos às medidas do N_2O ao longo da pesquisa. Na Figura 24A, as representações *box-plot* dos fatores de emissão (FE) estão inclinadas

para a esquerda e para a direita nas configurações NDA_U e NDA_E , respectivamente. Menores valores de FE observados durante a NDA_U foram mais próximos uns dos outros do que os maiores valores. Por outro lado, os valores do FE na NDA_E foram maiores e mais dispersos, variando entre 157-480 g N- N_2O pessoa⁻¹ ano⁻¹. Os valores de FE em ambas as configurações foram superiores aos propostos pelo IPCC (PICHES-MADRUGA *et al.*, [s.d.]), ou seja, 3,2 g N- N_2O pessoa⁻¹ ano⁻¹. No entanto, Ahn *et al.* (2010) também mostraram valores mais altos do que o IPCC e um alto grau de variabilidade nas medidas ($0,28 \pm 0,13 - 140 \pm 1,2$ g N- N_2O por pessoa⁻¹ ano⁻¹) em 12 estações de tratamento de águas residuárias nos Estados Unidos.

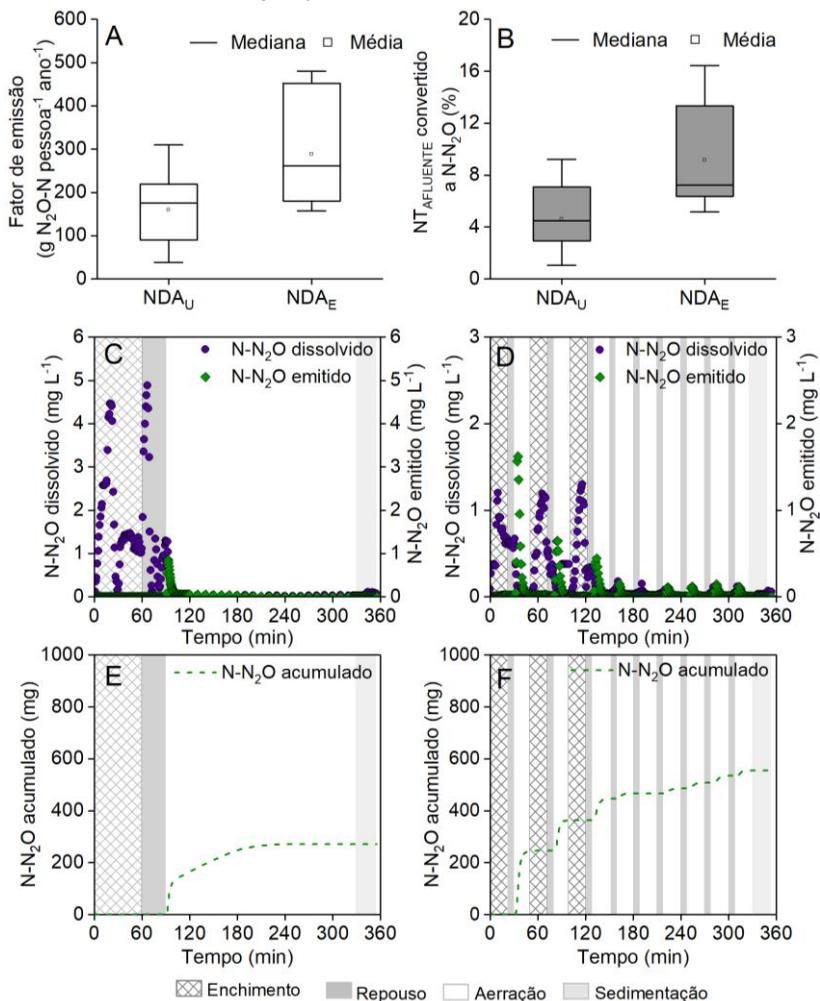
A fração de nitrogênio presente no afluente emitido como N_2O pode ser observada na Figura 23B. A FE obtida na NDA_U apresentou uma distribuição aproximadamente simétrica, cujos pontos de dados pairaram consistentemente em torno do valor central (4,5%). Enquanto isso, a representação mais alta do *box* indicou dados mais dispersos na NDA_E . De fato, 50% do nitrogênio apresentado no efluente emitido como N_2O variou entre 7,2 (mediana) e 16,4% (4º quartil). Essas frações de emissão foram maiores do que as relatadas por Ahn *et al.* (2010), cujos valores variaram entre $0,01 \pm 0,00\%$ e $1,8 \pm 0,79\%$ de NTK emitido como N_2O .

O N_2O foi medido na fase líquida (produção) e na fase gasosa (emissão). Em ambas as configurações, o N_2O foi produzido principalmente durante as fases de alimentação e repouso, quando a fonte de carbono foi fornecida. A emissão ocorreu, assim que a aeração foi iniciada, quando o N_2O foi transferido do licor misto para a fase gasosa (Figura 24C e D). A produção de N_2O está ligada à ocorrência do processo de desnitrificação durante as fases de alimentação. No entanto, o N_2O produzido não foi completamente reduzido ao N_2 , devido a uma atividade metabólica desequilibrada. A desnitrificação incompleta pode estar relacionada ao acúmulo de nitrito ou à disponibilidade limitada de $bDQO_S$ (KAMPSCHEUR *et al.*, 2009; REINO *et al.*, 2017). O N_2O dissolvido, permanecendo em quantidade no líquido, possui alta solubilidade (1.260 mg L⁻¹ a 20 °C) (REINO *et al.*, 2017), porém é facilmente removido do licor misto para a fase gasosa, uma vez iniciada a fase de aeração.

Observando-se as Figura 24 E e F verifica-se que o N_2O gasoso emitido foi mais acumulado na NDA_E do que na NDA_U . Esta evidência não era esperada uma vez que a configuração do ciclo na NDA_E foi projetada com enchimento escalonado e aeração intermitente, no intuito

de melhorar os processos de nitrificação e desnitrificação (como de fato ocorreu) e, conseqüentemente, reduzir a emissão de N_2O .

Figura 24 - Fator de emissão e NT aflúente emitido como $N-N_2O$ (A, B), emissão e produção de $N-N_2O$ (C, D) e $N-N_2O$ acumulado (E, F) durante os ciclos em ambas as configurações.



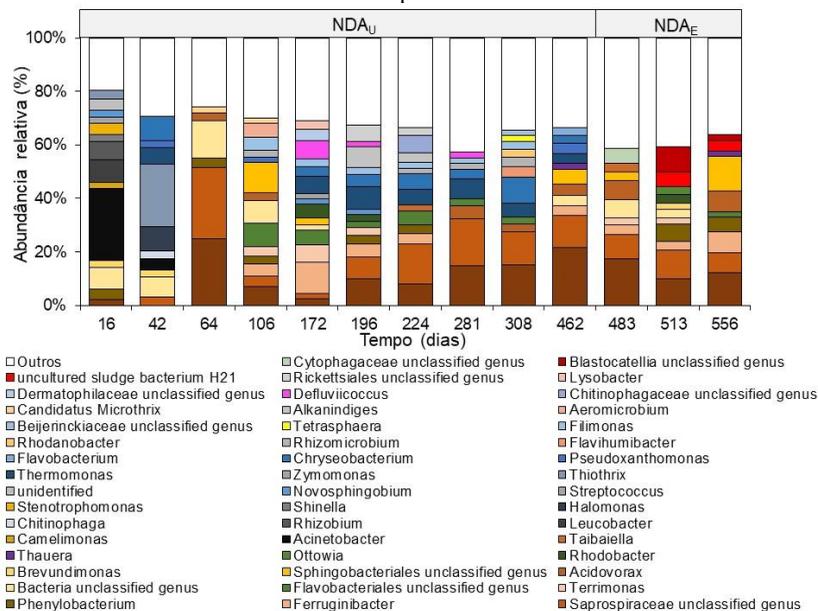
Fonte: O Autor.

Os estudos que sustentaram a escolha da configuração NDA_E relatam a redução das emissões de N_2O durante o tratamento biológico de águas residuárias com aeração intermitente (DOBBELEERS *et al.*, 2018; LOCHMATTER; GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2013). No entanto, na configuração NDA_E , a presença de oxigênio na fase de alimentação, fornecida pela fase de aeração entre os blocos de enchimento, pode ter prejudicado a última etapa da desnitrificação (redução de N_2O para N_2). O grupo de bactérias que expressa a enzima *nosZ* exibe alta sensibilidade na presença de oxigênio (REN *et al.*, 2019), o que poderia dificultar a redução de N_2O a N_2 . Além disso, na NDA_E , a condição de baixas concentrações de oxigênio e nitrito pode promover o processo de nitrificação-desnitrificação por organismos AOB. Portanto, a fim de reduzir as emissões de N_2O e obter as maiores eficiências de tratamento, uma fusão de ambas as configurações, com uma alimentação única e contínua, seguida de aeração intermitente, seria a melhor recomendação de configuração de ciclo operacional para a tecnologia LGA, quando trata efluente sanitário de baixa carga orgânica em clima subtropical. Além disso, essa aplicação reduziria o nitrito e o nitrato no efluente, o que também é benéfico para as PAO, favorecendo a remoção do fósforo.

4.1.3 Comunidade bacteriana

A composição da comunidade bacteriana está apresentada na Figura 25, onde se verificam mudanças ao longo do tempo sob as condições aplicadas no reator (NDA_U e NDA_E). Microrganismos da família *Saprospiraceae*, da ordem *Sphingobacteriales* e do filo *Bacteroidetes*, apresentaram-se ao longo de todo o período experimental, com uma abundância relativa, que variou de 2% a 26%, atingindo a maior população em 64 dias (Figura 25). Essa família é frequentemente observada em abundância em sistemas de tratamento de efluentes por lodos ativados, uma vez que seus membros são relacionados à hidrólise de compostos orgânicos complexos, tais como os presentes em efluentes sanitários usadas neste estudo (MCILROY *et al.*, 2014). Os membros da família *Alcaligenaceae* também foram encontrados em quantidade considerável (2 a 25%) durante todo o período; esses foram identificados em reatores em escala real e escala piloto como nitrificantes e desnitrificantes heterotróficos (ADAV; LEE; LAI, 2010).

Figura 25 - Dinâmica da comunidade bacteriana nas configurações testadas. OTUs com abundância relativa menor que 2% foram incluídos em “outros”.



Fonte: O Autor.

A partida sem inoculação trouxe ao reator microrganismos típicos no afluente, como o gênero *Acinetobacter*, com 26% de abundância relativa no dia 16, além de gêneros como *Thiothrix* (23,4% no dia 42) e *Candidatus Microthrix* (cerca de 2% nos dias 64 e 106), que estavam presentes apenas no início da operação, foram superados por outros gêneros, como *Ferruginibacter*, *Phenylobacterium*, *Terrimonas*, *Acidovorax*, *Rhodobacter* e outros organismos. Populações como *Acidovorax* (3-8% de abundância relativa), *Terrimonas* (2 a 6%) e *Ferruginibacter* (3 a 12%) foram favorecidas pelas condições NDA_U e ainda conseguiram se manter presentes em NDA_E. Esses organismos são aeróbios heterotróficos (MCILROY *et al.*, 2017) e têm sido descritos como desnitrificantes em sistemas de lodo ativado, com remoção biológica de nutrientes, e em sistemas de LGA (ADAV; LEE; LAI, 2010b).

Alguns gêneros foram selecionados apenas nas condições da NDA_U, que são representados por: *Thermomonas* (4-9%), *Chryseobacterium* (3-10%), *Filimonas* (2-5%). *Thermomonas* são aeróbios heterotróficos facultativos provavelmente desnitrificantes, e

têm sido reportados como organismos que assimilam subprodutos orgânicos solúveis, excretados pelos nitrificantes ou pela decomposição celular (DOLINŠEK *et al.*, 2013). As populações de bactérias heterotróficas aeróbias (*Filimonas* e *Chryseobacterium*) foram encontradas em maior abundância do que as populações de desnitrificantes heterotróficas como *Thauera* (em torno de 2%) e *Ottowia* (em torno de 3%), portanto, as bactérias heterotróficas aeróbias foram aparentemente enriquecidas pela configuração NDA_U, e foram as principais responsáveis pela remoção de DQO e NO₃⁻-N.

A partir do dia 172, foram observadas populações relacionadas aos processos de remoção biológica de fósforo (EBPR), representadas por *Defluvicoccus* (abundância relativa entre 1,5-7%) e *Tetrasphaera* (abundância relativa de 2%, dia 308). O *Defluvicoccus* afiliado aos GAO é, em teoria, competidor de organismos PAO, aqui representado por *Tetrasphaera* (WEISSBRODT *et al.*, 2013).

Em relação às populações ligadas à produção de N₂O, foram encontrados gêneros como *Thauera*, desnitrificante heterotrófico pertencente às *Betaproteobacteria*, com abundância relativa de 2,1% (dia 462, na NDA_U) e 3,8% (dia 556, na NDA_E). A produção de N₂O pela *Thauera* tem uma relação positiva com o acúmulo de N-NO₂ (REN *et al.*, 2019). Ge *et al.* (2017; 2018) relataram aumento na produção de N₂O por uma cultura mista de *Thauera* sob condição anóxica, influenciada pelo acúmulo de N-NO₂, que prejudicou a redução do N₂O. Xing *et al.* (2017) ressaltam ainda que o fator de emissão do N₂O foi oito vezes maior quando o N-NO₂⁻ Foi o acceptor de elétrons. Este fato pode ser explicado pela alta concentração de N-NO₂⁻ estimular a nitrito redutase (*nir*), provocando um aumento na competição de elétrons, o que resulta no fornecimento insuficiente de elétrons para o óxido nitroso redutase (*nosz*), e em consequente acúmulo de N₂O. Neste estudo foi observada uma maior concentração de N-NO₂⁻ na configuração NDA_E do que na NDA_U, o que poderia favorecer o alto fator de emissão por organismos heterotróficos desnitrificantes (OHD), como a *Thauera*. Esse membro da família *Rhodocyclaceae* (*Thauera*, 7-29%) também foi encontrado por um estudo anterior, que aplicou pulsos de alimentação (GUIMARÃES *et al.*, 2018).

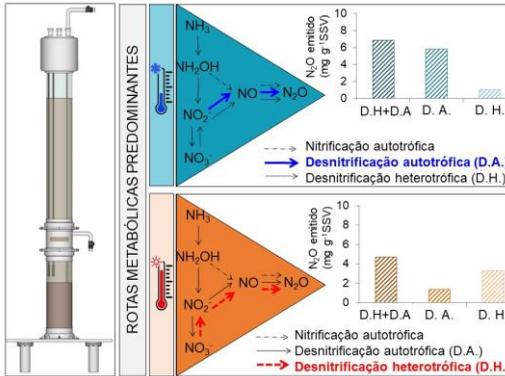
Defluvicoccus e *Tetrasphaera* estiveram presentes na configuração NDA_U. Eles são organismos de crescimento lento, capazes de desnitrificar e também de remover fósforo (no caso da *Tetrasphaera*). Esses organismos podem ter sido substituídos por outros de crescimento rápido, por exemplo, a *Thauera*, nas condições da NDA_E. Esse fato pode

ser explicado pela presença de oxigênio na fase escalonada, proporcionada pela aeração intermitente na NDA_E, o que favoreceu o consumo aeróbio de DQO_S e o desenvolvimento de microrganismos de crescimento mais rápido.

4.1.4 Conclusões

- A partida do reator sem inoculação conseguiu uma rápida formação de grânulos (16 dias) com diâmetros superiores a 212 µm. Nas duas configurações operacionais (NDA_U e NDA_E), o LGA apresentou uma fração relevante de flocos durante todo o período operacional, sem afetar, no entanto, a capacidade de sedimentação da biomassa.
- As eficiências de remoção de DQO_T e P_T foram similares nas duas configurações (NDA_U: 79%, 34%; NDA_E: 79%, 38%, respectivamente), embora a NDA_U tenha mostrado maior atividade dos organismos PAO.
- Uma maior eficiência de remoção de N_T e N-NH₄⁺ foi alcançada em NDA_E (54%; 95%), estando relacionada à alimentação escalonada e à aeração intermitente, que promoveram a separação temporal da nitrificação e desnitrificação. Porém, esta configuração apresentou maior desnitrificação a N₂O (FE:157-480 g N-N₂O pessoa⁻¹ ano⁻¹).
- Na configuração NDA_E, a presença de oxigênio dissolvido na fase anóxica, remanescente intermitente, e altas concentrações de nitrito, podem ter favorecido os processos de nitrificação e desnitrificação por organismos AOB, que é uma importante rota de produção e emissão de N₂O.
- Com relação à comunidade bacteriana, as duas configurações selecionaram de maneira geral microrganismos aeróbios heterotróficos como os membros dos gêneros *Acidovorax* (3-8%), *Terrimonas* (2 a 6%) e *Ferruginbacter* (3 a 12%). Organismos de crescimento lento capazes de desnitrificar e também de remover o fósforo, como *Deftuvicoccus* e *Tetrasphaera* estiveram presentes na condição NDA_U. Esses podem ter sido substituídos por outros de crescimento rápido, por exemplo, a *Thauera*, nas condições da configuração NDA_E, que foram relacionados à maior emissão de N₂O, devido ao fato de apresentarem maiores FE na presença de altas concentrações de N-NO₂⁻.

4.2 PRODUÇÃO/EMISSÃO DE N₂O E ROTAS METABÓLICAS EM REATOR DE LODO GRANULAR AERÓBIO TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO



Resumo: utilizando um RBS piloto (110 L; H/D= 9), operado em regime de nitrificação e desnitrificação alternadas com enchimento único (NDA_U), em ciclos de 6h, foram estudados a produção/emissão de N₂O e o tratamento de esgoto sanitário. O experimento foi

realizado durante 470 dias. Em paralelo, foram realizados experimentos em bateladas, utilizando um reator de bancada (1 L), para identificação das rotas metabólicas que contribuem para a produção/emissão de N₂O por lodo granular aeróbio (LGA). Os resultados foram explorados para dois períodos: inverno (20°C) e verão (25°C). Observaram-se maiores fatores de emissão (FE: 227,5 ± 41,9%) e conversão de nitrogênio total (NT) a N₂O (5,9 ± 2,0%) no período do inverno. Neste período, a biomassa apresentou também maior fração de lodo granular (75±22%). As eficiências na remoção de DQO_T (81±39% e 79±19%) e P_T (39±14% e 31±8%) foram similares em ambos os períodos. Para N_T e N-NH₄⁺, as maiores eficiências de remoção foram obtidas no período do verão, cujos valores médios foram de 35% e 77%, respectivamente. Os experimentos em bateladas apresentaram rotas de emissão de N₂O distintas: no inverno, a principal rota de emissão de N₂O foi a desnitrificação autotrófica (5,8 mg N-N₂O g⁻¹SSV), enquanto no verão a maior fonte de emissão de N₂O no LGA foi a desnitrificação heterotrófica (3,3 mg N-N₂O g⁻¹SSV). O sequenciamento de nova geração indicou a presença de membros desnitrificantes heterotróficos, como *Acidovorax* e *Thermomonas*, o que justifica a contribuição desta rota metabólica nas emissões de N₂O nos dois períodos avaliados, mesmo que em menor contribuição no inverno. Por meio da análise de FISH foram identificadas *Nitrosomonas* sp. no período do inverno,

indicando a viabilidade da ocorrência da oxidação da amônia, assim como da desnitrificação autotrófica.

4.2.1 Desempenho do reator e características da biomassa granular

O desempenho do RBS piloto no tratamento de esgoto sanitário, ao longo dos períodos de inverno e verão, está apresentado na Tabela 7. As eficiências de remoções de DQO_T foram similares em ambos os períodos, com concentrações efluente de $81 \pm 39 \text{ mg L}^{-1}$ e $79 \pm 19 \text{ mg L}^{-1}$ no inverno e no verão, respectivamente.

As concentrações efluentes de P_T ($4,7 \pm 1,2 \text{ mg L}^{-1}$, verão; e $4,5 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$, inverno) não alcançaram o valor máximo permitido de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, exigido pela legislação do Estado de Santa Catarina, para o lançamento de águas residuárias em corpos receptores lênticos (Lei nº 14.675/09).

Em relação à remoção de N_T e $N-NH_4^+$, as maiores eficiências de remoção foram obtidas no verão, cujos valores médios foram 35% e 77%, respectivamente. No entanto, as concentrações efluentes apresentaram valores similares em ambos os períodos ($12 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$; $10 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabela 7-Eficiências de remoção das principais variáveis físico-químicas de monitoramento do RBS piloto.

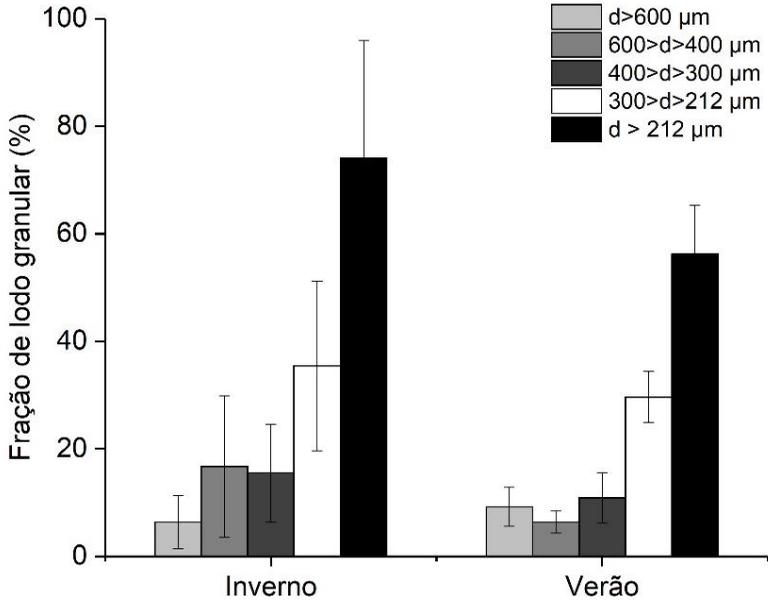
<i>Variáveis</i>	<i>Unidades</i>	<i>Inverno</i>	<i>Verão</i>
Demanda química de oxigênio (DQO_T)	%	81 ± 8	84 ± 3
Fósforo total (P_T)	%	39 ± 14	31 ± 8
Nitrogênio total (N_T)	%	23 ± 6	35 ± 14
Nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$)	%	71 ± 14	77 ± 16

Fonte: O Autor.

O RBS piloto apresentou estabilidade na concentração da biomassa, cuja média de SSV foi $2,5 \pm 0,9 \text{ g L}^{-1}$ ao longo do tempo do experimento. Baixos valores de IVL_{30} foram obtidos nos dois períodos (47 ± 8 e $44 \pm 17 \text{ mL g}^{-1}$ no inverno e verão, respectivamente). Estes valores corroboram uma das vantagens da biomassa granular, que é a excelente sedimentabilidade, também observada em outros estudos com reatores de LGA e tratando esgoto sanitário (PRONK *et al.*, 2015). A avaliação granulométrica destacou que a fração de lodo granular foi maior para o período do inverno, no qual $75 \pm 22\%$ da biomassa

apresentou diâmetro superior a 212 μm (Figura 26), enquanto no período do verão foi de $56\pm 9\%$.

Figura 26- Fração de lodo granular no RBS piloto.



Fonte: O Autor.

4.2.2 Características de emissões de N_2O ao longo da configuração operacional NDA_U

A produção e a emissão de N_2O foram monitoradas ao longo de ciclos operacionais durante a configuração NDA_U (470 dias). Os valores médios dos parâmetros de emissão de N_2O podem ser observados na Tabela 8. A aplicação de etapas de nitrificação e desnitrificação alternadas foi projetada para melhorar as remoções de nitrogênio. No entanto, a NDA_U aplicada apresentou baixas eficiências de remoções de NT ($36 \pm 16\%$). Além disso, tanto as remoções de NT, quanto a fração de nitrogênio desnitrificado a N_2O , apresentaram grande variabilidade (15-68% e 2-40%, respectivamente). Estes resultados estão de acordo com valores observados por Daudt *et al.* (2019), que avaliaram as emissões de N_2O no mesmo sistema, com uma duração da fase anóxica

(repouso) de 13 a 90 min no ciclo operacional do RBS (28-44% para remoção de NT; 16-1%, para fração de nitrogênio convertida a N_2O).

Tabela 8- Valores médios dos parâmetros de emissão de óxido nitroso no RBS ao longo do período operacional.

Variáveis	Valores médios
N_2O_{GASOSO} acumulado (mg N- N_2O)	297,9±156,3
Remoção de NT (%)	35,9±16,1
N- N_2O (%)	16,1±11,9
N_2 (%)	83,9±11,9
NT _{AFLUENTE} convertido a N_2O (%)	4,6±2,5
FE (g N- N_2O pessoa ⁻¹ ano ⁻¹)	162,4±82,1
FEBV (mg N- N_2O L ⁻¹)	2,8±1,4

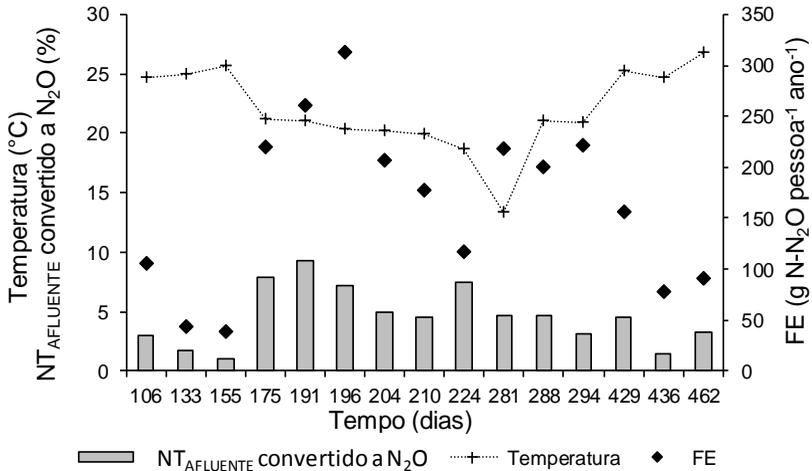
Fonte: O Autor.

A média de N_2O emitido por volume de esgoto tratado (FEBV) variou entre 0,7 a 5,3 mg N- N_2O L⁻¹ (Tabela 8). Considerando a geração *per capita* de 160 L de esgoto por dia (TSUTIYA, 2006), o fator de emissão (FE) para o período monitorado variou entre 38 e 312 g N- N_2O pessoa⁻¹ ano⁻¹. Estes valores estão acima daqueles reportados pelo IPCC (2014), de 3,6 g N- N_2O pessoa⁻¹ ano⁻¹ para ETE sem tratamento biológico de nutrientes (BNR), e pela USEPA (2010), de 7,2 g N- N_2O pessoa⁻¹ ano⁻¹, para ETE com BNR. No entanto, muitos estudos relatam que os FE podem apresentar uma ampla variação, de acordo com o tipo de tratamento do esgoto sanitário aplicado, geração *per capita* local, metodologia de monitoramento dos gases e período de monitoramento (variações sazonais) (AHN *et al.*, 2010; DAELMAN *et al.*, 2015; VASILAKI *et al.*, 2019).

Na Figura 27 podem ser observados, de forma temporal, a temperatura, o FE e a conversão do NT afluente em N_2O . Assim como as variáveis FE e FEBV, a conversão de NT afluente emitida como N_2O também apresentou ampla variação entre 1-9% (Figura 27) e valor médio de 4,6±2,5 % (Tabela 8). Além disso, foi observado que no período em que a temperatura foi menor, entre os dias 175 e 294 (valor médio de 20°C), os valores de FE e da conversão de NT a N_2O foram maiores (227,5±41,9%; 5,9±2,0%, respectivamente). Os valores médios de FE obtidos neste estudo estão acima daqueles encontrados por Ni *et al.* (2013), que avaliaram as emissões de N_2O em RBS em uma ETE em escala real, e encontraram fatores de emissões entre 1,0-1,5%. Por outro lado, Sun, Cheng e Sun (2013) encontraram maiores fatores de emissões

de N_2O (5,6%) ao avaliarem um RBS em uma ETE tratando esgoto sanitário real.

Figura 27- Variação dos fatores de emissão de óxido nitroso, conversão de nitrogênio total afluyente a óxido nitroso e temperatura ao longo do tempo.



Fonte: O Autor.

De acordo com Van Hulle *et al.* (2012), a temperatura influencia a atividade dos microrganismos nitrificantes, afetando a transferência de massa, o equilíbrio químico e a velocidade de crescimento.

O N_2O é um produto intermediário obrigatório no processo de desnitrificação, e pode ter sua produção intensificada na presença de OD, de temperaturas abaixo das suas condições ótimas (25 °C) e de altas concentrações de $N-NO_2^-$ (10 mg L⁻¹) (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009; MASSARA *et al.*, 2017). Resultados de um estudo sobre o efeito da temperatura nas emissões de N_2O , em reator em bateladas sequenciais, alimentado com esgoto sintético contendo acetato, NO_3^- e lodo ativado, indicaram que a produção deste gás aumentou de 13% para 40% e até 82% do NT desnitrificado, para temperaturas de 20°C, 10°C e 5°C, respectivamente (ADOUANI *et al.*, 2015). Os autores concluíram que as emissões de N_2O aumentaram com o decréscimo da temperatura, devido ao fato de que baixas temperaturas diminuem as atividades enzimáticas envolvidas na desnitrificação, como as enzimas redutoras de NO e N_2O .

Por outro lado, estudos mostram que maiores emissões de N_2O também são esperadas em altas temperaturas devido à menor

solubilidade deste gás no meio líquido (WEISS; PRICE, 1980), o que pode facilitar o *stripping* do N₂O produzido durante a desnitrificação para atmosfera (REINO *et al.*, 2017). Igualmente, Brotto *et al.* (2015) verificaram os fatores que controlam as emissões de N₂O em um sistema de lodo ativado em escala real, localizado no Rio de Janeiro (região tropical). Os autores concluíram que além da concentração de OD e da idade do lodo, a temperatura apresentou uma relação positiva com as emissões de N₂O. Os autores relataram ainda, que ocorreu um decréscimo de aproximadamente 3,2 g N₂O m⁻² dia⁻¹ para 0,3 g N₂O m⁻² dia⁻¹ quando a temperatura diminuiu de 31°C para 25°C.

Segundo a literatura, a solubilidade do N₂O diminui com o aumento da temperatura, porém, ela ainda é relativamente alta dado o alto valor do coeficiente de Henry (0,024M/atm), comparativamente ao coeficiente do oxigênio (0,0013M/atm), à mesma temperatura (25°C) e concentração de salinidade (0%) (WEISS; PRICE, 1980; WANG *et al.*, 2016). Desta forma, na presente pesquisa, foi verificado o maior efeito da baixa temperatura (20°C) nas atividades dos microrganismos nitrificantes do que a influência de temperaturas mais elevadas (25°C) nas propriedades físicas de solubilidade do N₂O. Com a diminuição da temperatura, as atividades enzimáticas desaceleram, favorecendo a desnitrificação incompleta, e posteriormente, no início da aeração ocorre o deslocamento do N₂O que não foi reduzido até N₂ para fase gasosa. (MASSARA *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, estudos foram realizados sobre as emissões de N₂O em ETE e também mostraram uma alta variação nas emissões deste gás (KAMPSCHREUR *et al.* 2009; MASSARA *et al.* 2017). Os autores relacionaram as variações de emissão de N₂O a fatores vinculados às condições operacionais como: concentração de OD; temperatura; pH; razão C:N; idade do lodo; e acúmulo de nitrito. No entanto, sabe-se que estes fatores afetam a ecologia microbiana presente nos sistemas de tratamento, provocando desequilíbrio em suas atividades e, conseqüente, variação no potencial de produção e emissão de N₂O (BOLLON *et al.*, 2016; RODRIGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2014).

Em uma pesquisa recente, realizada por Vasilaki *et al.* (2019), que avaliaram uma década de monitoramento de emissões de N₂O em sistemas de tratamento de esgoto, os autores relatam que as emissões diretas em RBS estão entre as maiores emissões de N₂O quando comparadas a outras tecnologias de tratamento de esgoto sanitário. As altas emissões derivadas desta tecnologia são atribuídas às mudanças repentinas nas concentrações de N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻ no reator, e acúmulo de N₂O dissolvido durante as fases anóxicas (fases de repouso e

sedimentação) e subseqüentes fases aeradas (PIJUAN *et al.*, 2014). Desta forma, torna-se essencial o conhecimento das rotas metabólicas envolvidas na produção e emissão de N_2O em LGA, para entender os fatores que influenciam as emissões deste gás e permitir o desenvolvimento de estratégias mitigadoras adequadas para esta tecnologia de tratamento.

4.2.3 Experimentos em bateladas – identificação das rotas metabólicas envolvidas nas emissões de N_2O no LGA

Experimentos em bateladas foram realizados com adição de inibidores específicos, a fim de identificar as principais rotas metabólicas envolvidas na produção e emissão de N_2O no LGA. Os experimentos foram realizados em escala de bancada (Figura 11) com biomassa oriunda do reator em escala piloto (Figura 9). Primeiramente foram quantificadas as emissões de N_2O no reator piloto, e após o final do ciclo coletava-se biomassa para realização dos experimentos em bateladas.

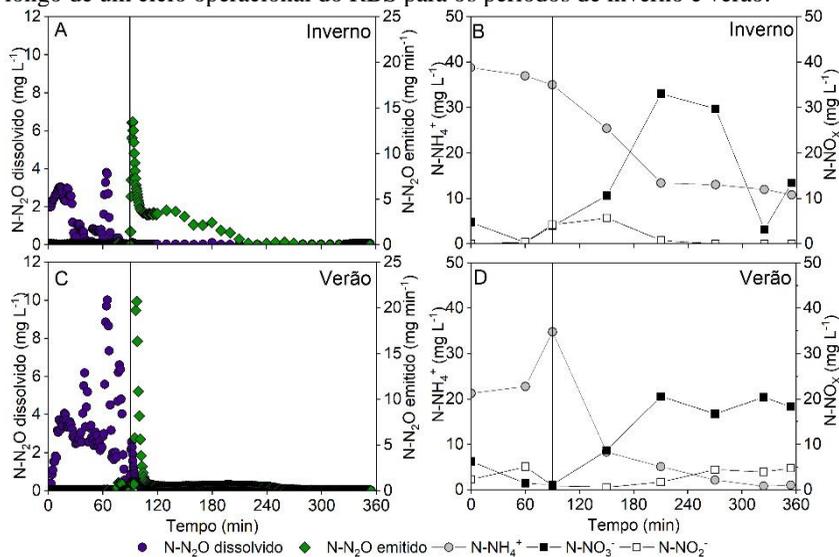
O perfil das emissões de N_2O , concentrações de N_2O dissolvido no meio líquido, bem como as concentrações de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ podem ser observados na Figura 28. Verifica-se que o N_2O foi produzido principalmente durante a fase de repouso, atingindo valores máximos de 4,0 e 10,0 mg $N-N_2O L^{-1}$, para os períodos de inverno e verão, respectivamente (Figura 28A e C). Após o final da fase de enchimento (60 min de tempo de ciclo), observa-se uma variação na concentração de N_2O dissolvido em ambos os períodos, que podem estar relacionadas com os pulsos de O_2 aplicados após o final da fase de enchimento, e em intervalos de 15 min durante a fase de repouso. Por ser um reator com alta relação altura diâmetro ($H/D=9,0$), a concentração de N_2O dissolvido pode estar estratificada ao longo da coluna de líquido, e com os pulsos de ar, ocorre a mistura do licor misto que contém estas diferentes concentrações, resultando em concentrações maiores de N_2O registradas.

Outro fator que pode influenciar a variação da concentração de N_2O , após a aplicação de pulsos de ar, é a presença de O_2 na fase de repouso. Os microrganismos que contêm a enzima óxido nitroso redutase (*nosZ*), responsáveis pela última etapa da desnitrificação, apresentam maior sensibilidade à presença de O_2 do que aqueles responsáveis pelas etapas anteriores da desnitrificação. Desta forma, a

redução de N_2O pode ser prejudicada, e este se acumula no meio líquido (BONIN; TAMBURINI; MICHOTÉY, 2002; TALLEC *et al.*, 2008).

Após o início da aeração, aos 90 min de operação do ciclo, as concentrações de N_2O dissolvido reduziram-se a valores inferiores a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, em um intervalo de 10 min. Uma vez que o N_2O é um produto intermediário da desnitrificação, a maior produção de N_2O dissolvido ocorreu na fase anóxica do ciclo. Nesta fase, porém, emissões de N_2O não foram observadas, indicando que o mesmo foi consumido pela rota de desnitrificação, ou ficou solúvel na fase líquida. Esta situação foi também observada por Dobbeleers *et al.* (2017), os quais destacaram que o N_2O foi principalmente emitido na fase de aeração, enquanto que, nos períodos sem aeração as emissões poderiam ser desprezadas devido à alta solubilidade do gás no meio líquido.

Figura 28- Perfil das emissões de N_2O , concentrações de N_2O dissolvido na fração líquida (A, C) e concentrações de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$ (B, D) ao longo de um ciclo operacional do RBS para os períodos de inverno e verão.



Fonte: O Autor.

Após o início da aeração foram verificados perfis diferentes nas emissões de N_2O (Figura 28A e C). As emissões de N_2O no ciclo operacional realizado no inverno apresentaram valor máximo de $13,5 \text{ mg min}^{-1}$ e demoraram aproximadamente 2h para atingir valores abaixo de $0,7 \text{ mg min}^{-1}$. Por outro lado, o valor máximo registrado no período

do verão foi de 21 mg min^{-1} , reduzindo-se para valores abaixo de $0,7 \text{ mg min}^{-1}$ em 20 minutos. O maior tempo demandado para atingir baixos valores de emissão de N_2O foi observado principalmente nos períodos de temperaturas amenas (13 a $21 \text{ }^\circ\text{C}$, (Figura 27), que correspondem ao período do inverno. Este fato está associado às maiores conversões de NT afluyente a N_2O e maiores FE, entre os dias 175 e 294 (Figura 27).

Analisando o perfil dos compostos nitrogenados (Figura 28B), observa-se que o N-NO_3^- foi desnitrificado na fase de enchimento, decaindo de $4,8$ a $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. A oxidação do N-NH_4^+ ocorreu a partir da fase aeróbia, concomitante com a emissão de N_2O (Figura 28A). Ambos atingiram valores próximos às concentrações finais em 210 min de ciclo. A concentração de N-NO_2^- atingiu valor máximo (6 mg L^{-1}) em 150 min, e a oxidação do N-NH_4^+ ocorreu principalmente até N-NO_3^- com uma concentração final de $13,4 \text{ mg L}^{-1}$. No ciclo realizado no verão, também foi observado o processo de desnitrificação a partir do $\text{N-N}_2\text{O}$, o qual decaiu de $6,2$ a $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ ao fim da fase repouso, e do N-NO_3^- , que também passou pelo processo de desnitrificação, decaindo de $2,3$ a $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 28D). A oxidação do N-NH_4^+ ocorreu de forma mais rápida, e aos 210 min a concentração resultante foi $5,1 \text{ mg L}^{-1}$, isto é, 84% de eficiência de remoção. As eficiências de remoção de NT para os ciclos do inverno e do verão foram de 15% e 50%, respectivamente.

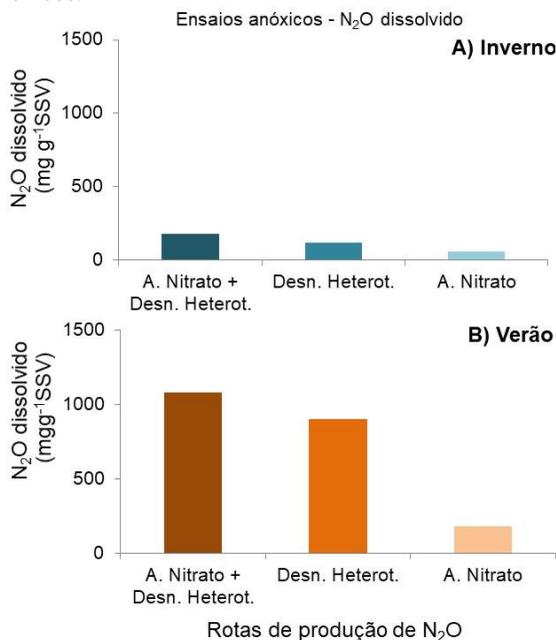
Huet *al.* (2013) avaliaram o efeito da fonte de carbono nas emissões de N_2O e verificaram as maiores emissões em reator alimentado com acetato de sódio, quando comparadas àqueles com glicose e farinha de amido (*starch*). Os autores relataram o mesmo comportamento visto no ciclo de inverno nesta pesquisa, onde a oxidação do N-NH_4^+ acompanhou as emissões de N_2O . O estudo concluiu que as altas concentrações de N-NO_2^- (7 mg L^{-1}) inibiram a nitrificação e provocaram maior produção e emissão de N_2O via desnitrificação heterotrófica e autotrófica.

Na presente pesquisa, não foi observado acúmulo de N-NO_2^- ao longo dos ciclos, uma vez que foi alcançada a nitrificação completa até N-NO_3^- . No entanto, o comportamento da emissão de N_2O até 210 min de operação (aeração), no ciclo realizado no inverno, sugere que, além da emissão provocada pelo deslocamento do N_2O remanescente, produzido na desnitrificação heterotrófica (fase de repouso), ocorreu a produção deste gás por AOB (desnitrificação autotrófica) na fase de aeração.

Como citado anteriormente, durante a fase anóxica não ocorreu emissão de N_2O devido à ausência de fluxo de ar e à alta solubilidade

deste composto em água. Desta forma, os experimentos anóxicos foram avaliados somente quanto à produção de N_2O dissolvido (Figura 29). Como mencionado na seção 3.1.2.1, duas diferentes rotas podem estar relacionadas com a formação de N_2O na fase anóxica: a desnitrificação heterotrófica (DH) e a amonificação do $N-NO_3^-$. Pela Figura 29 observa-se que, para os dois períodos observados, a DH foi a principal rota de produção de N_2O (119 e 900 $mg\ N-N_2O\ g^{-1}SSV$ no inverno e no verão, respectivamente). No entanto, mesmo que em menor proporção, a amonificação do $N-NO_3^-$ também contribuiu para produção de N_2O em ambos os períodos (58 mg e 178 $mg\ N-N_2O\ g^{-1}SSV$, no inverno e no verão, respectivamente).

Figura 29-Rotas metabólicas na produção de N_2O durante os experimentos anóxicos.



Fonte: O Autor.

A maior contribuição para formação de N_2O pela DH era esperada, visto que a amonificação do $N-NO_3^-$ ocorre principalmente por microrganismos heterotróficos por meio da redução anaeróbia do nitrato à amônia, via nitrito (STROHM *et al.*, 2007). Em um estudo realizado por Huet *al.* (2011b), para identificação das rotas metabólicas na

produção e emissão de N_2O em RBS, em diferentes concentrações de OD durante o período da nitrificação, os autores observaram que durante os experimentos anóxicos, a principal fonte de produção de N_2O foi a amonificação do nitrato, e que esta contribuição aumentou com o decréscimo da concentração de OD. A DH foi uma rota de consumo de N_2O , sustentada pelas condições operacionais instaladas (2h de fase anóxica).

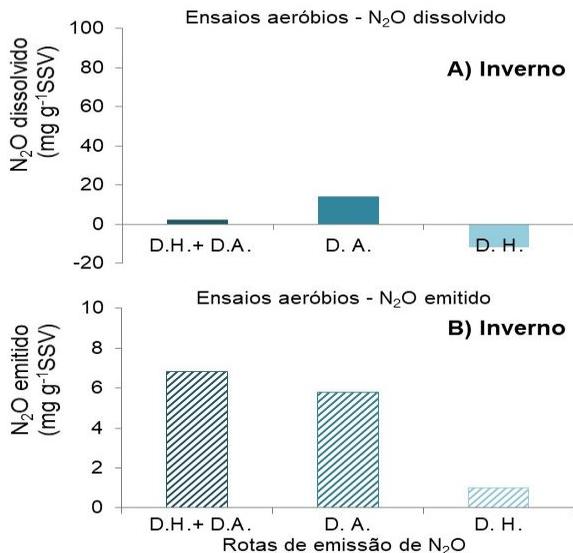
No presente estudo, embora as configurações operacionais também sustentassem a DH, rota de consumo de N_2O , fatores como os pulsos de ar, relação C:N e temperatura podem ter causado desequilíbrio nesse processo, tornando-a a principal rota de produção de N_2O dissolvido na fase anóxica, em ambos os períodos.

Na Figuras 30 e Figura 31 visualizam-se a produção e a emissão de N_2O durante os experimentos aeróbios, para os ciclos realizados no inverno e no verão, respectivamente. Foi observado que, para o período de inverno, a desnitrificação autotrófica (DA) foi a maior fonte de produção (14,2 mg N- N_2O g⁻¹SSV, Figura 29A) e emissão (5,8 mg N- N_2O g⁻¹SSV, Figura 29B) de N_2O , enquanto que a DH foi a rota de consumo. Porém, mesmo que em menor quantidade do que a desnitrificação autotrófica, a DH também contribuiu para as emissões no período do inverno (1,0 mg N- N_2O g⁻¹SSV).

As emissões de N_2O via DA, no inverno, podem estar relacionadas com a maior porcentagem de grânulos neste período (75 ± 22%, Figura 26). Com a biomassa granular predominante, a transferência de oxigênio para o interior do grânulo pode ter diminuído, o que pode ter possibilitado o desenvolvimento da DA. Além disso, os resultados obtidos para DA no período do inverno corroboram o perfil de emissão no ciclo operacional para o mesmo período (Figura 28A). Os AOB, responsáveis pela DA, apresentam em sua expressão gênica enzimas como a nitrito redutase (*nir*) e óxido nítrico redutase (*nor*), que são capazes de catalisar a reação de redução de N_2O a NO, e finalmente a N_2O , como produto final (MASSARA *et al.*, 2017). Assim, dada à falta da enzima *nosZ* e de uma rota de consumo de N_2O bem estabelecida (exemplo, a DH), a emissão do N_2O produzido na DA foi prevalente.

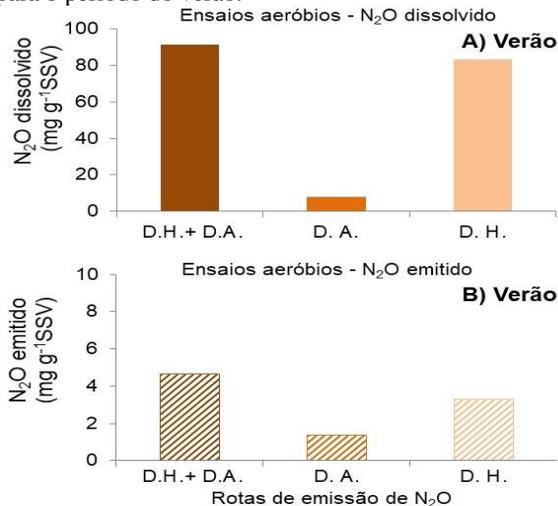
Nos experimentos aeróbios realizados no verão (Figura 31) foi observado que a DH foi a maior fonte de produção e emissão de N_2O (83 e 3,3 mg N- N_2O g⁻¹SSV, respectivamente). Porém mesmo em menor quantidade (1,4 mg N- N_2O g⁻¹SSV), a rota metabólica da DA foi presente no LGA, e também contribuiu para as emissões neste período.

Figura 30 - Produção e emissão de N_2O nos experimentos aeróbios em bateladas para o período do inverno.



Fonte: O Autor.

Figura 31 - Produção e emissão de N_2O nos experimentos aeróbios em bateladas para o período do verão.



Fonte: O Autor.

Huet *et al.*, 2011b) reportaram que a maior fonte de emissão de N₂O durante experimentos aeróbios foi a DH, para reator de lodo ativado com OD acima de 2 mg L⁻¹; e inferiram que a DH pode ter ocorrido na interface aeróbica-anóxica dos flocos de lodo ativado.

Na presente pesquisa, durante o período de temperaturas elevadas foi observada uma menor fração da biomassa granular (Figura 26), o que dificulta a formação de gradiente de concentrações de oxigênio no interior do grânulo. Desta forma, a mudança nas rotas metabólicas predominantes nas emissões de N₂O no LGA, para os períodos distintos avaliados, podem estar relacionadas a outros fatores. Por se tratar de esgoto sanitário real, a composição desse esgoto pode sofrer variações sazonais, provocadas por precipitações que, conseqüentemente, promovem sua diluição e redução da carga orgânica volumétrica (COV). Além disso, Florianópolis está localizada em uma região subtropical, a qual apresenta ampla flutuação nas temperaturas ao longo do ano (ALVARES *et al.*, 2013). Estes fatores podem influenciar no desenvolvimento da comunidade microbiana em cada período.

4.2.4 Comunidade microbiana

As comunidades bacterianas foram verificadas utilizando-se um método avançado de sequenciamento de *amplicon* de nova geração e alta resolução. Amostras da biomassa foram coletadas do RBS piloto e foram caracterizadas nos dias coincidentes aos ciclos realizados para os períodos de inverno e verão (Tabela 9). Foi verificado que ambos os períodos apresentaram microrganismos da família *Alcaligenaceae* e *Saprosiraceae*, com abundância relativa acima de 12%. Estas famílias são encontradas com frequência em sistemas de tratamento de esgoto sanitário (WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). Em menor abundância relativa, membros do gênero *Acidovorax* também estiveram presentes no inverno (4,6%) e no verão (4,1%). Este gênero tem sido reportado como microrganismos desnitrificantes em lodos ativados (MCILROY *et al.*, 2015).

Microrganismos afiliados ao gênero *Thermomonas* estiveram presentes em ambos os períodos, com abundância relativa maior no inverno (7,5%) do que no verão (3,7%). Membros deste gênero foram associados às atividades desnitrificantes em ETE que aplicam RBN. Estes microrganismos pertencem ao grupo de heterotróficos aeróbios facultativos e são capazes de assimilar substratos de forma anaeróbia (MCILROY *et al.*, 2016), indicando possível participação na rota de

produção de N_2O através da amonificação do nitrato e DH. O gênero *Rhizomicrobium* foi encontrando em abundância relativa de 2,3% somente no período do inverno. Estes microrganismos são associados aos metabolismos desnitrificantes e foram encontrados em sistemas de remoção de nitrato de águas subterrâneas (XIE *et al.*, 2017).

Microrganismos associados ao gênero *Pseudoxanthomonas* foram encontrados com abundância relativa de 4,0% somente no período do verão. Estes microrganismos pertencem à comunidade desnitrificante heterotrófica e são produtores de EPS, essenciais à estrutura e à estabilidade do grânulo (ADAV; LEE; LAI, 2010a). Membros do gênero *Thauera* e *Flavobacterium* estiveram presentes no período do verão, com abundância relativa acima de 2%. Microrganismos pertencentes ao gênero *Thauera* possuem metabolismos desnitrificantes heterotróficos e, sob condições anóxicas, a redução de N_2O a N_2 pode ser inibida na presença de altas concentrações de $N-NO_2^- (>10 \text{ mg L}^{-1})$ (REN *et al.* 2019). A presença deste gênero no verão corrobora os resultados obtidos nos experimentos em batelada, que indicaram a DH como principal fonte de emissão.

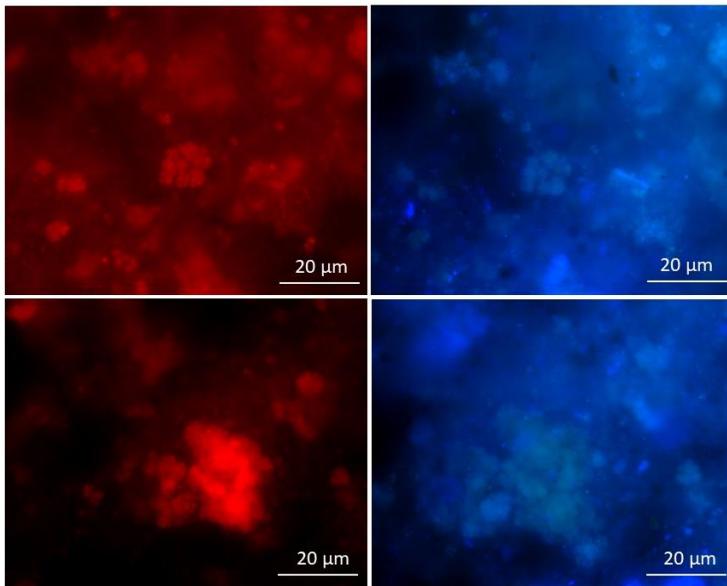
Tabela 9-Abundância relativa dos microrganismos observados a nível de gênero durante o período de inverno e verão(acima de 2%).

Gênero	Inverno	Verão
<i>Alcaligenaceae unclassified genus</i>	14,8%	21,7%
<i>Saprosiraceae unclassified genus</i>	17,7%	12,0%
<i>Ferruginibacter</i>	0,0%	3,5%
<i>Bacteria unclassified genus</i>	0,0%	4,0%
<i>Acidovorax</i>	4,6%	4,1%
<i>Sphingobacteriales unclassified genus</i>	0,0%	5,8%
<i>Ottowia</i>	2,7%	0,0%
<i>Thauera</i>	0,0%	2,1%
<i>Thermomonas</i>	7,5%	3,7%
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,0%	4,0%
<i>Chryseobacterium</i>	3,5%	2,8%
<i>Flavobacterium</i>	0,0%	2,7%
<i>Rhizomicrobium</i>	2,3%	0,0%
<i>Filimonas</i>	2,0%	0,0%
<i>Defluviococcus</i>	2,3%	0,0%
Outros	42,6%	33,7%

Fonte: O Autor.

Embora não tenham sido identificados microrganismos autotróficos pela técnica de sequenciamento de nova geração, as análises de FISH 16S rRNA indicaram a presença de *Nitrosomonas sp.* com a sonda NEU (CCC CTC TGC TGC ACT CTA) no período de inverno (Figura 32). As *Nitrosomonas* são as principais AOB encontradas em ETE, são capazes de nitrificar e desnitrificar simultaneamente e estão associadas com altas concentrações de nitrogênio amoniacal afluente ($> 50 \text{ mg L}^{-1}$) (REN *et al.*, 2019; McILROY *et al.*, 2015).

Figura 32- Células bacterianas hibridizadas com a sonda NEU (à esquerda) e DAPI (à direita) no ciclo operacional realizado no inverno.



Fonte: O Autor.

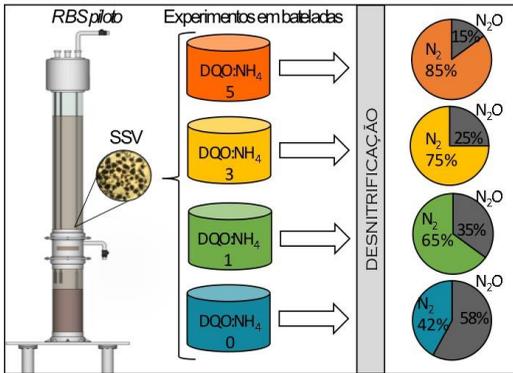
Estes organismos podem tanto realizar a oxidação da amônia, como a desnitrificação autotrófica. Hu *et al.* (2013) relataram o metabolismo de desnitrificação por AOB (*Nitrosomonas*) como a principal fonte de emissão de N_2O no tratamento de esgoto sanitário em RBS. Os resultados obtidos nos experimentos em bateladas indicaram a DA como a principal rota de emissão de N_2O , o que corrobora a presença de AOB detectada por FISH durante este período experimental. Estes resultados demonstram a vantagem e necessidade de acoplar o uso

das técnicas de biologia molecular. Muitos estudos têm relatado que estas diferenças observadas entre as estimativas da comunidade microbiana pela análise de FISH e no sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA podem estar relacionadas com métodos de extração do DNA, subestimando bactérias poucos abundantes pelo método de sequenciamento de amplicons e seleção do primer universal (DIWAN *et al.*, 2018; RUBIO-RINCÓN *et al.*, 2019; VALVERDE-PÉREZ *et al.*, 2016). Desta forma, para obter uma melhor visão da diversidade microbiana, e auxiliar nas interpretações das principais rotas envolvidas nas emissões de N₂O, é recomendada a utilização de diferentes técnicas que combinem, preferencialmente, métodos baseados na extração de DNA (sequenciamento de nova geração e qPCR) com outras técnicas que não necessitam desta etapa (FISH) (VALVERDE-PÉREZ *et al* 2016).

4.2.5 Conclusões

- As maiores emissões de N₂O do reator com LGA foram observadas durante o período de menores temperaturas (13 a 21°C), que desaceleram as atividades enzimáticas e favorecem a desnitrificação incompleta, com consequente emissão de N₂O.
- As rotas metabólicas prevalentes na produção (fase anóxica) e emissão (fase aeróbia) de N₂O durante o período de temperaturas mais baixas (13 a 21°C) foram a desnitrificação heterotrófica (fase anóxica) e autotrófica (fase aeróbia). No período com temperaturas mais elevadas (25°C), a desnitrificação heterotrófica foi a principal rota metabólica envolvida na produção e na emissão de N₂O. Além da temperatura, fatores como variações sazonais na composição do esgoto sanitário podem estar associadas às mudanças de rotas metabólicas envolvidas na produção e emissão de N₂O.
- Organismos desnitrificantes heterotróficos, como *Acidovorax* e *Thermomonas* intermediaram as emissões de N₂O nos dois períodos avaliados. No período com temperaturas mais baixas, a ocorrência de *Nitrosomonas sp.* indicou a viabilidade da oxidação da amônia, resultando na desnitrificação autotrófica como principal rota de emissão de óxido nitroso.

4.3 EFEITO DA RAZÃO CARBONO NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO E EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO EM REATOR COM LODO GRANULAR AERÓBIO



Resumo: No presente trabalho foram avaliados os efeitos da relação carbono nitrogênio (DQO:NH₄) na produção e emissão de óxido nitroso (N₂O), durante a remoção de nitrogênio por lodo granular aeróbio. Para tal, foi utilizado um reator

em bateladas sequenciais (RBS) piloto, com volume útil de 110 L e 65% de troca volumétrica, conduzido sob regime de nitrificação e desnitrificação alternadas com enchimento único (NDA_U), em ciclos de 6h e relação DQO:NH₄=3,0. Devido ao longo tempo de fase anóxica (enchimento + repouso= 1,5 hora), a DQO_s apresentou pouca variação durante a fase aeróbia, indicando que a matéria orgânica prontamente disponível havia sido consumida na fase anóxica (repouso). As concentrações de nitrato diminuíram durante a fase anóxica (9,6 a 1 mg L⁻¹), indicando a presença do processo de desnitrificação heterotrófica. Dado o pequeno diâmetro dos agregados microbianos (0,2 a 0,6 mm), a nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) não foram observadas neste estudo. O N₂O foi principalmente produzido na fase anóxica, como resultado do processo de desnitrificação, e emitido na fase de aerção. Em paralelo, o mesmo ciclo do reator piloto foi simulado em experimentos em bateladas, utilizando um RBS de bancada, com volume útil de 1 L, para avaliação do desempenho do processo em diferentes relações DQO:NH₄ (3, 5, 1 e 0, expressas na forma de DQOs:NH₄). Foi observada a oxidação de N-NH₄⁺ durante a fase de aerção nos experimentos com DQO:NH₄ de 3, 5 e 1, respectivamente. Os maiores picos de emissões de N₂O ocorreram nos experimentos com razões 3 e 5 (0,48 mg min⁻¹ e 0,37 mg min⁻¹, respectivamente), no entanto, as maiores conversões da fração de nitrogênio desnitrificado emitido como N₂O e dos fatores de emissão baseados na vazão de

esgoto tratado (FEBV) foram observados nos ensaios com razão DQO:NH₄ = 1 e 0. Foi verificado o déficit de doadores de elétrons para a desnitrificação heterotrófica no experimento DQO:NH₄=1. Os demais experimentos realizados em bateladas apresentaram valores de DQO removida maiores que a DQO requerida para a desnitrificação heterotrófica ($2,65 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), sugerindo que os experimentos com as maiores relações DQO:NH₄ não apresentaram limitações estequiométricas para o desenvolvimento da desnitrificação biológica do nitrogênio presente em esgoto.

4.3.1 Desempenho do reator e produção/emissão de N₂O

O monitoramento de N₂O no RBS piloto e os ensaios em bateladas tiveram início após três meses da partida do sistema piloto. Este período compreende os primeiros 180 dias da configuração NDA_U. Os resultados das características do esgoto sanitário e do desempenho do reator, na degradação de matéria orgânica e nutrientes, podem ser observados na Tabela 10. Durante o período monitorado, as eficiências de remoção de DQO_T e DQO_S foram superiores a 70%, apresentando valores médios efluentes de 108±47 e 50±15 mg L⁻¹, respectivamente.

As eficiências de remoção de DBO₅ do esgoto afluente foram superiores a 80%, com média efluente de 32±7 mg L⁻¹. Este valor atende aos limites de lançamentos presentes na lei estadual de Santa Catarina ($\leq 60 \text{ mg L}^{-1}$ ou 80% de eficiência para DBO₅ - Lei n. ° 14.675/2009). As concentrações finais de fósforo no efluente tratado não atenderam os limites exigidos pela mesma lei estadual ($\leq 4 \text{ mg L}^{-1}$ de fósforo total) (Tabela 10). Os valores observados para o nitrogênio amoniacal evidenciam a ocorrência do processo de nitrificação, com remoção média de 81%.

Tabela 10- Características do esgoto sanitário, concentrações efluentes e eficiências de remoção para os principais parâmetros no RBS piloto.

Variáveis	Afluente mg L ⁻¹	Efluente mg L ⁻¹	Remoção %
DQO _T	481±329	93±22	76±9
DQO _S	186±38	46±13	73±10
DBO ₅	217±60	32±7	83±8
P _T	6,5±1,4	4,3±0,6	34±11
N-NH ₄ ⁺	48 ±11	8±5	81±10
SST	155 ±103	43±15	65±21

Fonte: O Autor.

Uma vez que o reator alcançou estabilidade na atividade microbiana e na concentração de biomassa ($1,5 \text{ g SSV L}^{-1}$), foi realizado o monitoramento do seu desempenho ao longo de ciclos operacionais, concomitante à determinação das emissões de N_2O . Durante cada ciclo monitorado, o reator foi alimentado com uma relação C:N (DQO: NH_4) média de $4,0 \pm 1,0$, com cargas orgânicas, nitrogenada e de fosfato de $0,96 \pm 0,25 \text{ kg DQO}_T \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e $0,48 \pm 0,14 \text{ kg DQO}_S \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$; $0,12 \pm 0,04 \text{ kg N-NH}_4^+ \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$; e $0,008 \pm 0,004 \text{ kg P-PO}_4^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

Na Figura 33 visualiza-se um perfil típico do desempenho do reator na remoção de matéria orgânica, compostos nitrogenados, bem como na produção (N_2O dissolvido) e emissão de N_2O . Observa-se que a DQO_S foi consumida durante a fase anóxica do ciclo: enchimento ($60'$) e repouso ($30'$), onde as concentrações diminuíram de 130 mg L^{-1} para 57 mg L^{-1} (Figura 33A). Ressalta-se que, para a concentração de DQO_S inicial apresentada na Figura 33, considerou-se a concentração resultante da mistura do esgoto afluente com o licor misto do ciclo anterior.

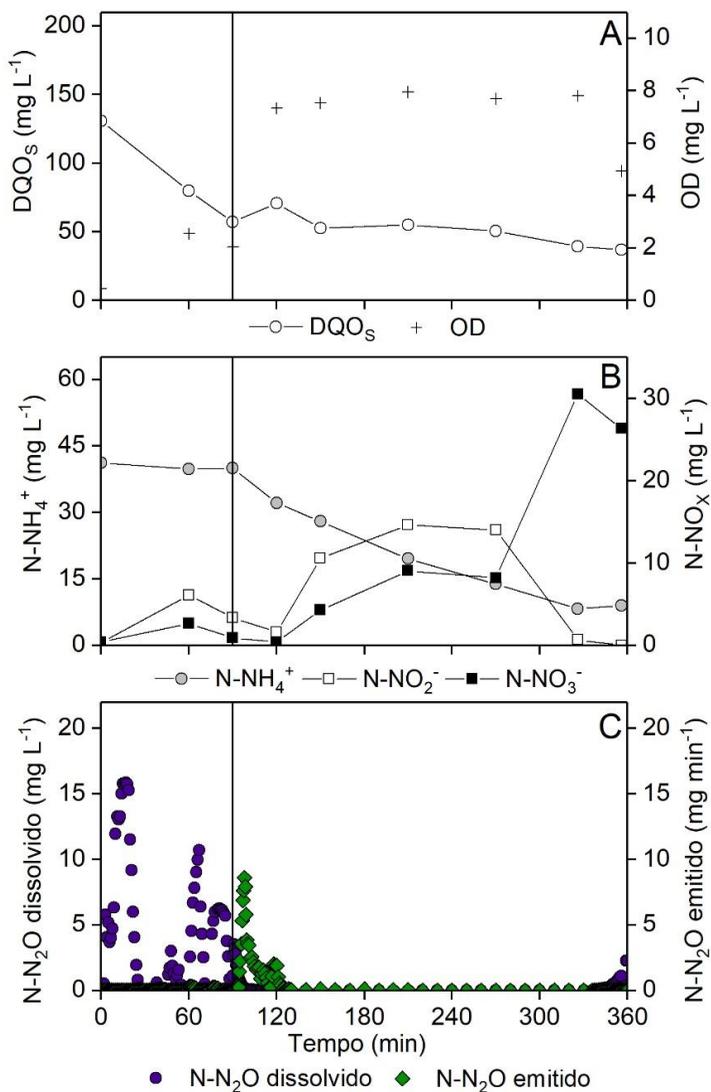
A partir do início da fase aeróbia, a DQOs apresentou pouca variação, indicando que a matéria orgânica prontamente disponível foi consumida na fase anóxica. Isto se relaciona com o longo período de contato da biomassa, em condições anóxicas, o qual favorece a hidrólise da matéria orgânica total em matéria orgânica prontamente disponível (DE KREUK *et al.*, 2010b; GUIMARÃES *et al.*, 2018; WAGNER *et al.*, 2015a). Em um estudo conduzido neste mesmo reator, onde foram testadas três estratégias operacionais com diferentes tempos de reação anóxica/aeróbia (EI: 13 min/200 min; EII: 30 min/188 min; EIII: 90 min/248 min), foi observado que a matéria orgânica prontamente disponível foi consumida principalmente na estratégia com maior período anóxico (EIII) (XAVIER *et al.* 2019).

O oxigênio dissolvido apresentou concentração de $2,6 \text{ mg L}^{-1}$ após o período do enchimento (Figura 33 A). Este valor está relacionado aos pulsos de ar de 10 s a cada 15 min introduzidos no reator para promover o contato biomassa-substrato. Nos primeiros 30 minutos da aeração, verificou-se que a concentração de OD aumentou de $2,0$ para $7,4 \text{ mgL}^{-1}$, e manteve-se estável na saturação até o fim desta fase. Ao final da sedimentação, o valor de OD alcançou 5 mg L^{-1} .

Assim como a DQO_S , as concentrações de nitrato diminuíram durante a fase anóxica ($9,6$ a 1 mg L^{-1}), indicando a presença do processo de desnitrificação heterotrófica. A oxidação do nitrogênio amoniacal ocorreu a partir do início da fase de aeração, diminuindo de

41 para 9 mgL^{-1} . A principal espécie nitrogenada produzida foi o nitrato (26 mgL^{-1}).

Figura 33-Perfil do ciclo operacional no RBS piloto com LGA: DQO_S e OD (A); N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ e N-NO₃⁻ (B); e produção e emissão de N₂O (C).



Fonte: O Autor.

A nitrificação e a desnitrificação podem ocorrer de maneira simultânea (NDS) em lodo granular aeróbio, durante a fase de aeração, devido ao tamanho dos grânulos, da difusão da concentração de OD e da atividade microbiana (SHI *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2014). No entanto, a NDS não foi observada neste estudo, visto que os diâmetros dos grânulos obtidos (0,2 a 0,6 mm) são considerados insuficientes para a formação de zonas anóxicas dentro dos bioagregados (BIN *et al.*, 2011; MATSUMOTO *et al.*, 2010). Assim, a concentração de oxigênio dissolvido mantida em nível de saturação na fase de aeração promoveu a nitrificação, porém prejudicou a desnitrificação simultânea, desse modo, a remoção de nitrogênio neste estudo foi realizada por nitrificação e desnitrificação devido à alternância de condições anóxicas e aeróbias dentro do reator.

Em relação ao monitoramento de N_2O no ciclo, observa-se que embora a emissão deste gás tenha ocorrido durante a fase de aeração (Figura 33 C), o N_2O foi principalmente produzido na fase anóxica, como resultado do processo de desnitrificação (KAMPSCHEUR *et al.* 2009). Para verificação deste processo, o N_2O dissolvido foi medido na fase líquida, mostrando que a maior produção ocorreu nos primeiros 15 min, com pico máximo de 16 mg L^{-1} . A produção e acúmulo de N_2O dissolvido mantiveram-se até o fim da fase anóxica (90 min), devido à presença de fonte de carbono oriunda da fase de enchimento que ocorreu até 60 min. Após o início da aeração, observou-se a transferência do N_2O dissolvido no meio líquido para a fase gasosa (*stripping*), principalmente nos primeiros 25 min desta fase, com um pico de concentração de $8,1 \text{ mg min}^{-1}$.

O fator de emissão (FE) de N_2O foi de $38,20 \text{ g N-N}_2\text{O pessoa}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. A fração de nitrogênio afluente convertida em N_2O foi 1,0% e a proporção de N_2O emitido em relação ao nitrogênio total desnitrificado foi 3,0%. Segundo Kampschreur *et al.* (2009), a fração de nitrogênio afluente convertida em N_2O pode variar de 0 a 14,6% entre os estudos realizados em estações de tratamento em escala real. Embora tenha ocorrido produção de N_2O no sistema, a fração de nitrogênio amoniacal afluente convertido em N_2O foi consideravelmente baixa quando comparada a outros sistemas de tratamento de águas residuárias (KAMPSCHEUR *et al.*, 2009; LAW *et al.*, 2012).

De acordo com Konget *al.* (2013) e Castro-Barroset *al.* (2016), as emissões de N_2O a partir dos processos de remoção biológica de nutrientes variam substancialmente, devido a diferentes condições operacionais, características e composição das águas residuárias, tipo de

reatores e métodos de medição utilizados para estimar a emissão de N_2O . Quanet *et al.*, 2012) utilizando um RBS com LGA, tratando esgoto sintético simulando dejetos suínos, verificaram que o aumento da relação C:N e a taxa de aeração podem reduzir as emissões de N_2O .

Diversos fatores já foram associados ao acúmulo de N_2O durante a desnitrificação, tais como: baixa relação C:N (<3,5), pH baixo (6,5), acúmulo de nitrito nas fases de nitrificação e desnitrificação, e curto tempo de retenção de sólidos (<1 dia) (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009; KISHIDA *et al.*, 2004; QUAN *et al.*, 2012).

Uma vez que as características do esgoto podem variar bastante, deficiências em carbono orgânico podem limitar o processo de remoção de nitrogênio, especialmente em climas subtropicais com alta incidência de precipitação. Assim, torna-se importante a avaliação da influência das relações C:N na produção de N_2O a partir da remoção biológica de nitrogênio de esgotos sanitários.

4.3.2 Experimentos em bateladas – avaliação do efeito de diferentes razões DQO:NH₄ na produção e emissão de N₂O

A fim de verificar o efeito de diferentes razões C:N na produção e emissão de N_2O em reator com LGA, experimentos em bateladas foram realizados. Na Tabela 11 são observados os valores afluentes de DQO_S e N-NH₄⁺ dos substratos utilizados no RBS, em escala de bancada. O experimento com razão DQO:NH₄ = 3, foi realizado utilizando esgoto sanitário como substrato. Nos experimentos com as razões DQO:NH₄ = 5 e 0, foram utilizados esgoto sintético; no experimento onde a DQO:NH₄ = 0, não foi adicionada fonte de carbono; e no experimento com DQO:NH₄ = 1 foi utilizado esgoto sanitário coletado ao fim do período anóxico (esgoto desnitrificado) como substrato para o ensaio.

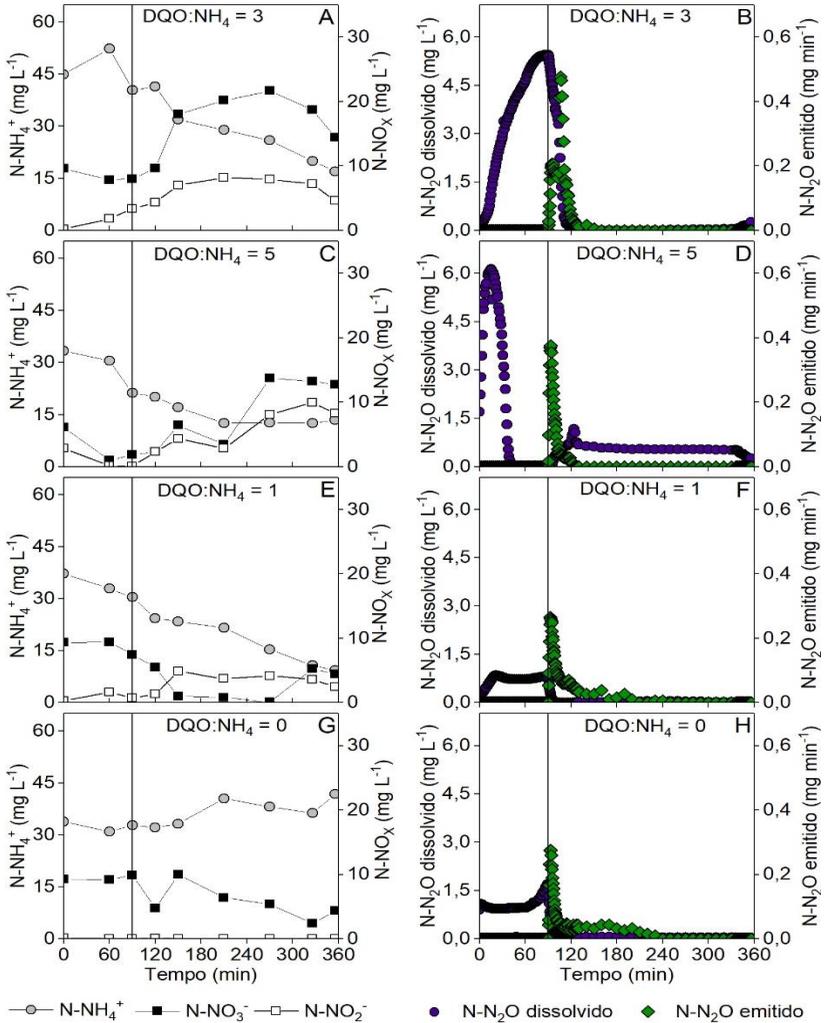
Tabela 11-Razões DQO:NH₄ utilizadas nos experimentos em batelada.

Razões	DQO _S	N-NH ₄ ⁺
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
DQO:NH ₄ = 3	179	60
DQO:NH ₄ = 5	0	46
DQO:NH ₄ = 1	60	52
DQO:NH ₄ = 0	244	47

Fonte: O Autor.

Na Figura 34(A-H) têm-se o comportamento das concentrações de N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , e a produção e emissão de N_2O nos experimentos em bateladas simulando um ciclo de RBS.

Figura 34-Comportamento das concentrações de N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , e produção e emissão de N_2O nos experimentos em bateladas simulando um ciclo de RBS sob as diferentes razões DQO:NH_4 . A e B $\text{DQO:NH}_4 = 3$ (A, B); $\text{DQO:NH}_4 = 5$ (C, D); $\text{DQO:NH}_4 = 1$ (E, F); $\text{DQO:NH}_4 = 0$ (G, H).



Fonte: O Autor.

A concentração de $N-NH_4^+$ permaneceu invariável durante a fase anóxica nos quatro experimentos em bateladas (Figura 34 A, C, E, G). Observa-se que ocorreu um decréscimo nas concentrações de $N-NO_3^-$ na fase anóxica para os experimentos $DQO:NH_4 = 3$ e 5 (9,6-7,8 $mg L^{-1}$; 6,1-1,0 $mg L^{-1}$, respectivamente). Aqueles que foram realizados com razão $DQO:NH_4 = 1$ e 0 não apresentaram mudanças significativas nas concentrações de $N-NO_x$.

Foi observada a oxidação de $N-NH_4^+$ na fase de aeração em todos os ensaios (17,0; 13,5 e 9,3 $mg L^{-1}$ para os experimentos $DQO:NH_4$ de 3, 5 e 1, respectivamente), excetuando-se aquele com relação $DQO:NH_4 = 0$ (42,0 $mg L^{-1}$). As concentrações efluentes de $N-NO_x$ foram 4,6 $mg N-NO_2^- L^{-1}$, 14,5 $mg N-NO_3^- L^{-1}$ ($DQO:NH_4 = 3$); 8,23 $mg N-NO_2^- L^{-1}$; 12,3 $mg N-NO_3^- L^{-1}$ ($DQO:NH_4 = 5$); 2,5 $mg N-NO_2^- L^{-1}$, 4,5 $mg N-NO_3^- L^{-1}$ ($DQO:NH_4 = 1,0$); 0,01 $mg N-NO_2^- L^{-1}$; 4,4 $mg N-NO_3^- L^{-1}$ ($DQO:NH_4 = 0$).

Assim como no reator piloto, a nitrificação completa até $N-NO_3^-$ realizou-se nos experimentos alimentados com as razões $DQO:NH_4 = 3$, 5 e 1 (Figura 34 A, C e E, respectivamente). A presença de $N-NO_3^-$ no ensaio com razão $DQO:NH_4 = 0$, não era esperada, uma vez que não ocorreu a oxidação da $N-NH_4^+$. Desta forma, a presença de $N-NO_3^-$ pode ser justificada pela parcela de esgoto com $N-NO_x$, proveniente da alíquota da biomassa usada no teste. Em relação ao comportamento da produção e emissão de N_2O nos experimentos em bateladas foram observados comportamentos diferentes na produção de N_2O dissolvido (Figura 34B, D, F e H).

O N_2O dissolvido foi produzido e acumulado no meio reacional, principalmente na fase anóxica, nos experimentos com $DQO:NH_4 = 3$, 1 e 0, (Figura 34B, F e H), entretanto, no ensaio com razão $DQO:NH_4 = 5$, o N_2O dissolvido foi produzido e consumido durante a fase anóxica.

Os maiores picos de emissão de N_2O ocorreram nos experimentos com razões $DQO:NH_4 = 3$ e 5 (0,48 $mg min^{-1}$; 0,37 $mg min^{-1}$, respectivamente), no entanto, as maiores conversões de $NT_{AFLUENTE}$ a N_2O , frações de nitrogênio desnitrificado emitido como N_2O e fatores de emissão baseados na vazão de esgoto tratado (FEBV) foram observados nos ensaios com razão $DQO:NH_4 = 1$ e 0 (Tabela 12).

Como as eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal foram diferentes entre os ensaios em bateladas, os resultados de N_2O foram estimados com base na remoção de NT para quantificar e analisar a conversão de nitrogênio para N_2O .

Tabela 12-Valores dos parâmetros de emissão de óxido nitroso nos experimentos em bateladas com diferentes razões DQO:NH₄.

Experimentos em bateladas	NT _{AFLUENTE} convertido a N ₂ O	Desnitrificação		FEBV
	%	N-N ₂ O %	N ₂ %	mg N-N ₂ OL ⁻¹
DQO:NH ₄ =3	10	25	75	10
DQO:NH ₄ =5	6	15	85	5
DQO:NH ₄ =1	18	35	65	14
DQO:NH ₄ =0	19	58	42	14

Fonte: O Autor.

Como as eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal foram diferentes entre os ensaios em bateladas, os resultados de N₂O foram estimados com base na remoção de NT para quantificar e analisar a conversão de nitrogênio para N₂O.

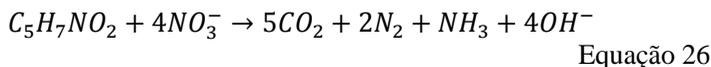
Um estudo realizado por Yanet *al.* (2017) avaliaram as produções e emissões de N₂O no tratamento de esgoto sanitário em reatores em escala laboratorial (50 L), alimentados com três diferentes razões C:N (3,4; 5,4; e 7,5). Os autores relataram que, com o aumento da razão C:N, as emissões de N₂O diminuíram de 2,23 a 0,05% (baseadas no NT_{AFLUENTE} convertido a N₂O). O mesmo comportamento foi verificado por Heet *al.* (2017), que avaliaram as produções e emissões de N₂O em reatores biológicos com filtro aerados, sob diferentes razões C:N (2; 5; e 8), e verificaram FEBV de 0,24, 0,12 e 0,21 mg L⁻¹, respectivamente.

Segundo Lawet *al.* (2012b), sob condições de limitada disponibilidade de substrato orgânico, enzimas de desnitrificação (NO₃⁻ redutase, N₂O redutase, NO redutase e N₂O redutase) competem por elétrons e desencadeiam a desnitrificação incompleta. Em teoria, espera-se que N₂O e NO se acumulem no meio durante a desnitrificação com DQO limitada, pois as enzimas NO₃ redutase e NO₂ redutase têm maior afinidade com os elétrons do que com as enzimas NO e N₂O redutase. Além disso, outro fator que está associado às maiores emissões de N₂O nos reatores que foram alimentados com baixas razões DQO:NH₄ é o acúmulo de N-NO₂⁻ (resultante da nitrificação e desnitrificação incompleta), o qual pode inativar a enzima N₂O redutase, aumentando assim a produção de N₂O e as suas emissões (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009).

4.3.3 Estimativa da DQO consumida pela desnitrificação heterotrófica

A quantidade mínima de doador de elétrons requerida para viabilizar a “nitrito-redução completa” foi calculada a partir da estequiometria da reação, considerando o esgoto e o nitrito como doador e aceptor de elétron, respectivamente. Cálculos estequiométricos permitem a realização de balanços de massas e a estimativa das necessidades de doadores de elétrons, nutrientes e de oxigênio (ou outro aceptor de elétron) em reatores biológicos (BENETTI; AQUINO, 2010).

De acordo com Arceivala (1981), a desnitrificação via nitrito, com o carbono orgânico do esgoto como fonte de elétrons, ocorre conforme a Equação 26. Verifica-se que reação de desnitrificação completa demanda aproximadamente 3 mg C₅H₇NO₂ / mg N-NO₃⁻, isto é, cerca de 2,65 x 10⁻⁵ moles de carbono orgânico em 1,0 L de esgoto (PHILIPS *et al.*, 2002).



Na Tabela 13 tem-se o valor da DQO_s removida em cada uma das relações DQO:NH₄ testadas, necessárias para comparar com a DQO requerida para desnitrificação heterotrófica (2,65 x 10⁻⁵ mol L⁻¹). Ressalta-se que a concentração da DQOs inicial considerou a concentração resultante da mistura do substrato afluyente com o meio reacional do ciclo anterior. Ademais, a DQO removida considerou a concentração obtida ao final da fase anóxica.

Tabela 13- Cálculos estequiométricos de demanda por elétrons para desnitrificação heterotrófica utilizando o carbono orgânico do esgoto.

Relação DQO:NH ₄	DQOs disponível		DQOs removida	
	mgL ⁻¹	mol L ⁻¹	mgL ⁻¹	mol L ⁻¹
DQO:NH ₄ =3 (Piloto)	130,72	1,15 x 10 ⁻³	93,78	8,29 x 10 ⁻⁴
DQO:NH ₄ =3	135,11	1,19 x 10 ⁻³	73,93	6,54 x 10 ⁻⁴
DQO:NH ₄ =5	171,20	1,51 x 10 ⁻³	40,24	3,55 x 10 ⁻⁴
DQO:NH ₄ =1	61,76	5,39 x 10 ⁻⁴	7,52	6,63 x 10 ⁻⁵
DQO:NH ₄ =0	5,66	5,00 x 10 ⁻⁵	-	-

Fonte: O Autor.

Observando os resultados dos cálculos estequiométricos, nota-se que a concentração de DQOs afluyente seria teoricamente suficiente para

garantir a demanda por elétrons para desnitrificação de toda a amônia oxidada na maioria dos experimentos. A pequena concentração de DQOs no início do experimento DQO:NH₄=0 foi relativa ao residual de material orgânico proveniente da biomassa e, portanto, inviabilizou a determinação da DQOs removida neste experimento. Além disso, a discussão sobre a demanda por elétrons é mais acurada considerando-se a DQOs removida na fase na anóxica, visto que ela se relaciona à atividade de desnitrificação heterotrófica, principal rota de consumo de N₂O (KAMPSCHREUR *et al.*, 2009; VASILAKI *et al.*, 2019).

Verifica-se o déficit de doadores de elétrons para a desnitrificação heterotrófica no experimento DQO:NH₄=1. Esta observação corrobora os elevados fatores de emissão de N₂O observados neste experimento (Tabela 12). Os demais experimentos realizados em bateladas (DQO:NH₄=3 e 5) e o realizado no reator piloto (DQO:NH₄=3) apresentaram valores de DQO removida maiores que a DQO requerida para a desnitrificação heterotrófica (Equação 26).

Do ponto de vista estequiométrico, a viabilidade da atividade desnitrificante no reator piloto (DQO:NH₄=3) é similar aquela do reator em bateladas (DQO:NH₄=5), porém a dinâmica da nitrato-redução pode variar dada a diferença entre disponibilidade de doadores e receptores de elétrons. De acordo com André *et al.* (2011), na presença de doadores de elétrons como o carbono orgânico do esgoto, a desnitrificação é influenciada principalmente por fatores cinéticos. Os autores destacam que a energia livre de Gibbs das reações envolvidas na completa redução do nitrato a N₂ é muito grande ($\Delta G^0 = -1202 \text{ kJmol}^{-1}$ de NO₃⁻ a 25°C) e que a nitrato-redução pode ser desenvolvida sem restrições termodinâmicas, caso haja um excesso de doadores de elétrons.

No entanto, vale ressaltar que estas demandas teóricas levam em consideração apenas o consumo de elétrons pela desnitrificação heterotrófica via N-NO₃⁻, assim, a desnitrificação completa nestas condições só seria garantida na ausência de competição por elétrons entre os microrganismos desnitrificantes heterotróficos e aeróbios heterotróficos (Benetti *et al.*, 2010). Porém, as condições não eram estritamente anaeróbias na fase de enchimento e repouso, devido às altas concentrações de OD remanescentes do ciclo anterior (OD próximo ao nível de saturação), e a pulsos de ar para mistura da biomassa com licor misto na fase de repouso, favorecendo a competição por elétrons entre estes microrganismos.

4.3.4 Conclusões

- Em relação às emissões de N_2O no reator piloto, cerca de 3% do NT desnitrificado foi emitido como N_2O . O reator apresentou uma FE de $38,2 \text{ g N-N}_2\text{O pessoa}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ e um FEBV de $0,65 \text{ mg N-N}_2\text{O pessoa}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Embora tenha ocorrido a produção de N_2O no sistema, a fração de nitrogênio amoniacal afluente convertida em N_2O foi consideravelmente baixa. A emissão de N_2O ocorreu principalmente na fase aerada, mas sua produção ocorreu principalmente durante a desnitrificação heterotrófica na fase de enchimento-reposo.
- Em relação aos ensaios realizados com diferentes relações DQO: NH_4 com o LGA oriundo do RBSG piloto, cerca de 10%; 6%; 18% e 19% do NT afluente foram convertidos a N_2O , nos experimentos em bateladas alimentados com DQO: $NH_4=3; 5; 1$ e 0, respectivamente. O aumento das emissões de N_2O para as menores relações DQO: NH_4 pode ser atribuído a uma desnitrificação incompleta, induzida pela escassez de substrato orgânico.
- A estimativa da DQO consumida pela desnitrificação heterotrófica foi realizada, e foi verificado o déficit de doadores de elétrons para a desnitrificação heterotrófica no experimento DQO: $NH_4=1,0$. Para os outros experimentos, foram observados valores de DQO removida maiores que a DQO requerida para a desnitrificação heterotrófica ($2,65 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$), sugerindo que os experimentos com altas relações DQO: NH_4^+ não apresentaram limitações estequiométricas para o desenvolvimento da desnitrificação biológica do nitrogênio presente em esgoto.

5 DISCUSSÃO INTEGRADA

No presente estudo foi comparado o desempenho de tratamento de esgoto sanitário de baixa carga e as emissões de N_2O em duas condições operacionais NDA_U e NDA_E , aplicadas ao RBS com LGA, localizado em região de clima subtropical (*capítulo 1*). Além disso, foram identificadas as rotas metabólicas (*capítulo 2*) e os efeitos de relações DQO: NH_4 (*capítulo 3*) nos processos de produção e emissão de N_2O . Considerando-se os resultados obtidos nas configurações experimentais estudadas, bem como aqueles obtidos nos experimentos em bateladas realizados em NDA_U , é importante realizar uma análise que compreenda os resultados obtidos nestas etapas, a fim de apontar as convergências e divergências entre os resultados obtidos (Tabela 14).

Quanto à biomassa presente no reator, foi observado que as condições de operação do sistema e as configurações das fases dos ciclos permitiram o desenvolvimento de LGA, com uma concentração em torno de 2058 e 1851 mg SSV L^{-1} , em NDA_U e NDA_E , respectivamente. Estes valores são menores do que encontrado em LGA aplicado em escala real (8 g SSV L^{-1}) (Pronk *et al.* 2015), mas considerados maiores quando comparados com estudos anteriores realizados no grupo de pesquisa ($< 1,5$ g SSV L^{-1}) (GUIMARÃES *et al.*, 2018; XAVIER *et al.*, 2019). Em relação ao desenvolvimento de grânulos, a partida do reator sem inoculação conseguiu uma rápida formação de grânulos (16 dias) com diâmetros superiores a 212 μm . Nas duas configurações, o LGA apresentou uma fração relevante de flocos (40%) durante todo o período operacional. Entretanto, essa variação não afetou a capacidade de sedimentação (IVL₃₀: 51 e 33 mL g^{-1} , para NDA_U e NDA_E , respectivamente) e a descarga de sólidos no efluente (SST: 37 e 29 mg L^{-1} , para NDA_U e NDA_E , respectivamente). Portanto, o presente estudo confirmou que quando o LGA é aplicado ao tratamento de esgoto sanitário, sofre uma enorme variação em tamanho e formato dos grânulos, influência das condições operacionais, da composição do esgoto sanitário e do clima local.

A remoção de DQO_T foi similar em ambas as configurações (79%), enquanto que a remoção da DQOs foi maior na NDA_U 77% que na NDA_E : 69%, embora o efluente tenha apresentado concentrações semelhantes (NDA_U e NDA_E : 46 e 49 mg L^{-1} , respectivamente). As eficiências de remoção de P foram semelhantes nas duas configurações (NDA_U e NDA_E : 34 e 38%, respectivamente); a NDA_U mostrou maior atividade dos organismos PAO.

Tabela 14 - Síntese dos principais resultados obtidos durante: as configurações NDA_U e NDA_E (*capítulo 1*); os experimentos em escala de bancada para identificação das rotas metabólicas (*capítulo 2*) e avaliação do efeito das diferentes razões C:N (*capítulo 3*) na produção e emissão de N₂O.

Capítulo 1		
Variáveis	NDA _U	NDA _E
SSV _{reator} (mg L ⁻¹)	2058	1851
IVL ₃₀ (mL g ⁻¹)	51	33
IVL ₃₀ /IVL ₁₀	0,80	0,80
IVL ₃₀ /IVL ₅	0,61	0,62
D>0,2 mm (%)	59	62
SST _{efluente} (mg L ⁻¹)	37	29
DQO _T efluente (mg L ⁻¹)	90	77
Remoção de DQO _T (%)	79	79
DQO _S efluente (mg L ⁻¹)	46	49
Remoção de DQO _S (%)	77	69
PT _{efluente} (mg L ⁻¹)	4,9	3,8
Remoção de PT (%)	34	38
N-NH ₄ ⁺ efluente (mg L ⁻¹)	10	3
Remoção de N-NH ₄ ⁺ (%)	77	95
N-NO ₂ ⁻ efluente (mg L ⁻¹)	2	12
N-NO ₃ ⁻ efluente (mg L ⁻¹)	18	7
NT _{efluente} (mg L ⁻¹)	41	28
Remoção de NT (%)	31	54
NT _{afluente} convertido a N ₂ O (%)	5	9
FE (g N-N ₂ O pessoa ⁻¹ ano ⁻¹)	162	288
FEBV (mg N-N ₂ O L ⁻¹)	2,8	4,9
Capítulo 2		
Variáveis	Inverno	Verão
Remoção de DQO _T (%)	81	84
Remoção de PT (%)	39	31
Remoção de N-NH ₄ ⁺ (%)	71	77
D>0,2 mm (%)	75	56
Remoção de NT (%)	23	35
NT _{afluente} convertido a N ₂ O (%)	5,9	2,5
FE (g N-N ₂ O pessoa ⁻¹ ano ⁻¹)	228	85
FEBV (mg N-N ₂ O L ⁻¹)	1,2	3,7
<i>Rotas metabólicas de produção de N₂O – experimentos anóxicos</i>		
DH ^a (mg N-N ₂ O g ⁻¹ SSV)	119	900
AN ^b (mg N-N ₂ O g ⁻¹ SSV)	58	178

Capítulo 2				
Variáveis	Inverno		Verão	
<i>Rotas metabólicas de produção de N₂O – experimentos aeróbios</i>				
DA ^c (mg N-N ₂ O g ⁻¹ SSV)	14,2		7,9	
DH ^a (mg N-N ₂ O g ⁻¹ SSV)	-11,8		83	
<i>Rotas metabólicas de emissão de N₂O – experimentos aeróbios</i>				
DA ^c (mg N-N ₂ O g ⁻¹ SSV)	5,8		1,4	
DH ^a (mg N-N ₂ O g ⁻¹ SSV)	1,0		3,3	
Capítulo 3				
Variáveis	C:N=5	C:N=3	C:N=1	C:N=0
DQO _S afluente (mg L ⁻¹)	244	179	60	0
N-NH ₄ ⁺ afluente (mg L ⁻¹)	47	60	52	46
NT _{afluente} convertido a N ₂ O (%)	6	10	18	19
Desnitrificação – N-N ₂ O (%)	15	25	35	58
Desnitrificação – N ₂ (%)	85	75	65	42
<i>Demanda por elétrons para desnitrificação heterotrófica completa</i>				
DQO _S requerida (mol L ⁻¹)	2,65x10 ⁻⁵	2,65x10 ⁻⁵	2,65x10 ⁻⁵	2,65x10 ⁻⁵
DQO _S afluente (mol L ⁻¹)	1,51x10 ⁻³	1,19x10 ⁻³	5,39x10 ⁻⁴	5,00x10 ⁻⁵
DQO _S removida ^d (mol L ⁻¹)	3,55x10 ⁻⁴	6,54x10 ⁻⁴	6,63x10 ⁻⁵	-

a: desnitrificação heterotrófica, b: amonificação do nitrato, c: desnitrificação autotrófica

O tempo de contato anaeróbio fornecido pelo enchimento único na NDA_U apresentou maior influência positiva nas remoções de bDQO_S (NDA_U e NDA_E: 90% e 78%, respectivamente) por microrganismos de crescimento lento, do que o tempo de contato no enchimento escalonado na NDA_E, quando a bDQO_S também foi consumida por vias aeróbias. Portanto, a configuração NDA_E não forneceu condição anaeróbia restrita para o consumo de DQO necessário para o metabolismo dos PAO. Como consequência, a liberação de fosfato foi menor e o *luxury-uptake* de fósforo não foi notado na NDA_E tal como visto na NDA_U.

Quanto às transformações dos compostos nitrogenados, foi verificado em NDA_U a oxidação completa de N-NH₄⁺ até N-NO₃⁻, com valores médios efluentes de 18 mg L⁻¹. Enquanto que NDA_E apresentou menores concentrações efluentes de N-NO_x (12 mg N-NO₂⁻ L⁻¹ e 7 mg N-NO₃⁻ L⁻¹). Além disso, foi nesta configuração que ocorreu a maior remoção de N-NH₄⁺ (95%). A maior eficiência alcançada na NDA_E está relacionada à alimentação escalonada, seguida de fases de repouso e aeração intermitentes, que promoveram a separação temporal da nitrificação e desnitrificação.

Em relação às emissões de N_2O , o maior tempo de monitoramento na NDA_U (470) viabilizou a observação de comportamentos distintos nas emissões de N_2O ao longo do período. Maiores emissões de N_2O no reator com LGA foram observadas durante o período de menores temperaturas (13 a 21°C) (FE e NT convertido a N_2O : 228 g N- N_2O pessoa⁻¹ ano⁻¹ e 5,9% para o inverno e 85 g N- N_2O pessoa⁻¹ ano⁻¹ e 2,5%, para o verão, respectivamente). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato que temperaturas mais amenas desaceleram as atividades enzimáticas, favorecendo a desnitrificação incompleta e a consequente emissão de N_2O .

Embora a configuração NDA_E tenha apresentado maior eficiência de remoção de NT (NDA_U : 31%; NDA_E : 54%), a nitrato-redução a N_2O foi maior quando comparada com NDA_U (NDA_U : 5%; NDA_E : 9%). Esse resultado pode ser atribuído, de fato, à presença de oxigênio na fase de alimentação escalonada proporcionada pela fase de aeração localizada entre os blocos de enchimento, o que pode prejudicar o último passo da desnitrificação (redução de N_2O para N_2). Na NDA_E , baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de nitrito favoreceram o processo de nitrificação e desnitrificação por organismos AOB, que é uma rota importante de produção e emissão de N_2O . Além disso, as altas concentrações de nitrito elevaram a produção de N_2O por desnitrificantes heterotróficas como a *Thauera*.

Portanto, a fim de reduzir as emissões de N_2O e obter as maiores eficiências de tratamento, a combinação das fases de ciclo de ambas as configurações, com um enchimento único e contínuo e aeração intermitente, pode ser a melhor alternativa para tecnologia LGA, no tratamento de esgoto sanitário de baixa carga orgânica, em clima subtropical. Estas configurações de ciclo podem reduzir as concentrações de N- NO_x no efluente, o que evita a inibição das atividades de PAO e favorece a remoção de fósforo.

Desta forma, foi realizada a pesquisa mais aprofundada sobre as rotas metabólicas que estão envolvidas na produção e emissão de N_2O em LGA, aplicando condições que favorecem a nitrificação e desnitrificação alternadas.

Quanto aos experimentos em bateladas realizados com o LGA na NDA_U , foram observados que as rotas metabólicas envolvidas na produção e emissão de N_2O em LGA podem sofrer mudanças de acordo com fatores como temperatura e variações sazonais na composição do esgoto sanitário. As rotas prevalentes de produção e emissão de N_2O durante o período de temperaturas mais baixas foram a desnitrificação

heterotrófica (119 mg N-N₂O_{dissolvido} g⁻¹ SSV, fase anóxica) e autotrófica (14,2 mg N-N₂O_{emitido} g⁻¹ SSV, fase aeróbia).

No período com temperaturas elevadas (25°C), a desnitrificação heterotrófica foi a principal rota metabólica envolvida na produção (83 mg N-N₂O_{dissolvido} g⁻¹SSV, fase anóxica) e na emissão (3,3 mg N-N₂O_{emitido} g⁻¹ SSV, fase aeróbia) de óxido nitroso.

Por meio de análise de sequenciamento de nova geração, foi observado que organismos membros do gênero *Acidovorax* e *Thermomonas* estavam presentes nos dois períodos avaliados e foram relacionados com a rota da desnitrificação heterotrófica. Já no período com temperatura mais baixas, através da análise de FISH, foram detectados organismos como as *Nitrosomonas sp.*, que foram relacionados à oxidação da amônia e à emissão de N₂O através da desnitrificação autotrófica.

Portanto, foi observado ao longo de toda configuração NDA_U e nos experimentos em bateladas para identificação das rotas metabólicas, que a produção e emissão de N₂O em LGA pode sofrer variações no que diz respeito às rotas metabólicas envolvidas, bem como, à quantidade de N₂O emitido, de acordo com fatores externos como a temperatura. No entanto, fatores como a variação da composição do esgoto sanitário também podem influenciar nas emissões de N₂O em LGA.

Neste sentido, foram realizados ensaios, para conhecimento mais aprofundado, sobre os efeitos da variação da relação C:N no esgoto bruto nas emissões de N₂O em LGA. Nos experimentos em bateladas em escala de bancada alimentados com diferentes razões DQO:NH₄, foi verificado que as maiores emissões de N₂O (10, 6, 18 e 19% NT afluente convertido a N₂O) foram obtidas nas menores relações DQO:NH₄ (3, 5, 1 e 0, respectivamente). O aumento das emissões nas menores relações DQO:NH₄ pode ser justificado pela desnitrificação incompleta, devido à falta ou à competição por substrato orgânico entre os microrganismos presente no LGA.

Cálculos estequiométricos para estimativa da DQO requerida ($2,65 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) na desnitrificação heterotrófica indicaram o *déficit* de doadores de elétrons ($6,63 \times 10^{-5}$) no experimento C:N=1. Para as maiores relações DQO:NH₄, não foram observadas limitações estequiométricas para o desenvolvimento da desnitrificação biológica do nitrogênio presente em esgoto.

140 Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular

6 CONCLUSÕES

Com base nas hipóteses e nas questões levantadas nesta pesquisa, têm-se as seguintes conclusões:

- Entre as configurações estudadas, pode-se concluir que o enchimento lento de forma contínua em NDA_U, promoveu a melhor remoção de matéria orgânica solúvel e maiores atividade de organismos envolvidos na remoção de fósforo. Com enchimento escalonado e aeração intermitente em NDA_E, altas remoções de N-NH₄⁺ foram alcançadas. No entanto, As maiores remoções de nitrogênio do esgoto sanitário em NDA_E não foram traduzidas em menores emissões de N₂O.
- Durante o período de temperaturas amenas (13 a 21°C), a principal rota de produção de N₂O foi a desnitrificação heterotrófica (fase anóxica) enquanto a rota predominante na emissão de N₂O (fase aeróbia) foi a desnitrificação autotrófica. Durante o período de temperaturas altas (25°C), a rota de desnitrificação heterotrófica foi a principal via de produção e emissão. Por meio de análises de biologia molecular, foi possível detectar microrganismos desnitrificantes heterotróficos como os do gênero *Acidovorax* e *Thermomonas* em ambos os períodos. No período do inverno, microrganismos do gênero *Rhizomicrobium*, associados ao metabolismo desnitrificante e *Nitrosomonas sp.*, associados à nitrificação e desnitrificação autotrófica, foram encontrados. No período do verão, membros do gênero *Pseudoxanthomonas* e *Thauera*, estiveram presentes e corroboraram os resultados obtidos nos experimentos em batelada, que indicaram a desnitrificação heterotrófica como principal fonte de emissão.
- As relações DQO:NH₄ influenciaram nas produções e emissões de N₂O no LGA nos experimentos em bateladas. As emissões de N₂O foram maiores nos experimentos em bateladas alimentados com menores relações DQO:NH₄. Do ponto de vista estequiométrico, a relação DQO:NH₄ que alimenta o RBS piloto não apresenta déficit de elétrons para realização da desnitrificação heterotrófica via N-NO₃⁻.

142 Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular

7 RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos com a presente pesquisa, sugerem-se as seguintes recomendações para futuros trabalhos envolvendo emissões de N_2O em RBS com LGA:

- Avaliar o tratamento de esgoto sanitário, bem como as emissões de N_2O em RBS com configurações de ciclo com enchimento lento contínuo seguido de fase de repouso e aeração intermitente, a fim de promover condições restritas anaeróbias, para auxiliar na remoção de fósforo e na completa redução do $N-NO_3^-$ a N_2 .
- Avaliar o efeito de enchimento e fase de repouso com mistura lenta, para promover a mistura da biomassa com o esgoto sanitário, evitando a presença de O_2 na fase anóxica devido aos pulsos de ar.
- Utilizar mais de uma técnica de biologia molecular para identificar com maior precisão os microrganismos presentes no LGA, envolvidos nas rotas metabólicas de produção e emissão de N_2O .

144 Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular

REFERÊNCIAS

ABOUBAKAR, A. *et al.* Nitrous oxide emissions and dissolved oxygen profiling in a full-scale nitrifying activated sludge treatment plant.

Water research, v. 47, n. 2, p. 524-534, 2013.

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

Biotechnology Advances, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 411-423, 2008.

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

ADOUANI, N. *et al.* N₂O and NO emissions during wastewater denitrification step: Influence of temperature on the biological process.

Comptes Rendus Chimie, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 15-22, 2015.

AHN, J. H. *et al.* N₂O Emissions from Activated Sludge Processes, 2008-2009: Results of a National Monitoring Survey in the United States. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 4505-4511, 2010.

AKABOCI, T. R. V. **Tratamento de esgoto sanitário em reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios: desempenho do processo e modelagem matemática.** Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis (SC), 169 p., 2013.

ALI, M. *et al.* Source identification of nitrous oxide emission pathways from a single-stage nitritation-anammox granular reactor. **Water research**, v. 102, p. 147-157, 2016.

ANDRÉ, L.; PAUWELS, H.; DICTOR, M. C.; PARMENTIER, M.; AZAROUAL, M. Experiments and numerical modelling of microbially-catalysed denitrification reactions. **Chemical Geology**, [s.l.], v. 287, n. 3-4, p. 171-181, 2011.

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

ANTUNES XAVIER, J. **Granulação natural da biomassa em reator operado em bateladas sequenciais para tratamento de esgotosanitário**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis (SC), 141p., 2017.

ARCEIVALA, S. J. 1981 **Wastewater Treatment and Disposal**. Engineering and Ecology in Pollution Control. New York: Marcel Dekker, 1981, p. 892.

AWANG, A. *et al.* Characterization of Aerobic Granular Sludge Developed under Variable and Low Organic Loading Rate. **Sains Malaysiana**, [s. l.], v. 46, n. 12, p. 2497–2506, 2017.

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.

BAE, W.; KIM, S.; PARK, S.; RYU, H.; CHUNG, J. Evaluation of predominant factor for shortcut biological nitrogen removal in sequencing batch reactor at ambient temperature. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], 1-10, 2019.

BENETTI, A. D.; AQUINO, S. F. Aplicação de princípios de bioenergética no cálculo da estequiometria de reações biológicas em processos de tratamento de águas residuárias. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 245–250, 2010.

BEUN, J. J.; HENDRIKS, A.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; MORGENROTH, E.; WILDERER, P. A.; HEIJNEN, J. J. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Water Research**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 2283–2290, 1999.

BIN, Z. *et al.* Dynamic and distribution of ammonia-oxidizing bacteria communities during sludge granulation in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor. **Water Research**, [s. l.], v. 45, n. 18, p. 6207–6216, 2011.

BLACKBURNE, R.; YUAN, Z.; KELLER, J. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. **Biodegradation**, [s.l.], v. 19, n.2, p. 303-312, 2008.

BOLLON, J. *et al.* N₂O emissions from full-scale nitrifying biofilters. **Water Research**, [s. l.], v. 102, p. 41–51, 2016.

BONIN, P.; TAMBURINI, C.; MICHOTEY, V. Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. **Water Research**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 722–732, 2002.

BOUGARD, D. *et al.* Nitrification of a high-strength wastewater in an inverse turbulent bed reactor: Effect of temperature on nitrite accumulation. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 106–113, 2006.

BROTTO, A. C. *et al.* Emissão de óxido nitroso de estação de tratamento de esgoto de lodos ativados por aeração prolongada - estudo preliminar. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 618–623, 2010.

BROTTO, A. C. *et al.* Factors controlling nitrous oxide emissions from a full-scale activated sludge system in the tropics. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 15, p. 11.840–11.849, 2015.

CASTRO-BARROS, C. M. *et al.* Effect of nitrite on the N₂O and NO production on the nitrification of low-strength ammonium wastewater. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 287, p. 269–276, 2016.

CHUNG, Y.-C.; CHUNG, M.-S. BNP test to evaluate the influence of C/N ratio on N₂O production in biological denitrification. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 42, n. 3–4, p. 23–27, 2000.

COLLIVER, B. B.; STEPHENSON, T. Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 219–232, 2000.

CZEPIEL, P. M.; CRILL, P. M.; HARRISS, R. C. Methane emissions from municipal wastewater treatment processes. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 2472–2477, 1993.

DAELMAN, M. R. J. *et al.* Methane and nitrous oxide emissions from municipal wastewater treatment - Results from a long-term study. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 2.350–2.355, 2013.

DAELMAN, M. R. J. *et al.* Seasonal and diurnal variability of N₂O emissions from a full-scale municipal wastewater treatment plant. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 536, p. 1–11, 2015.

DAIMS, H., LEBEDEVA, E. V., PJEVAC, P., HAN, P., HERBOLD, C., ALBERTSEN, M., ... & KIRKEGAARD, R. H. Completenitrification by Nitrospira bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504, 2015.

DAUDT, G. C. **Desempenho e emissões de óxido nitroso de reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios para tratamento de esgoto sanitário**. 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DAUT, G.C. **Emissões de N₂O e de CO₂ por um reator em bateladas sequenciais com lodo granular aeróbio no tratamento de esgoto sanitário**. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

Daudt G. C. *et al.* Researching new ways to reduce N₂O emissions from a granular sludge sequencing batch reactor treating domestic wastewater under subtropical climate conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n 01, p. 209-220, 2019.

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

DE KREUK, M. K. *et al.* Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. **Water Research**, [s. l.], v. 44, n. 20, p. 5.929–5.938, 2010a.

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**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 55, n. 8–9, p. 75–81, 2007.

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**, [s. l.], v. 49, n. 11–12, p. 9–17, 2004.

DIWAN, V. *et al.* Does universal 16S rRNA gene amplicon sequencing of environmental communities provide an accurate description of nitrifying guilds? **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 151, n. March, p. 28–34, 2018.

DOBBELEERS, T. *et al.* Evaluation of two start-up strategies to obtain nitrogen removal via nitrite and examination of the nitrous oxide emissions for different nitrification levels during the treatment of slaughterhouse wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], 2018.

DOBBELEERS, T. *et al.* Performance of aerobic nitrite granules treating an anaerobic pre-treated wastewater originating from the potato industry. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 226, p. 211–219, 2017.

DOLINŠEK, J. *et al.* Interactions of Nitrifying Bacteria and Heterotrophs: Identification of a Micavibrio-Like Putative Predator of Nitrospira spp. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 2027–2037, 2013.

DOMINGOS, D.G. **Uso de alginato e Np-Magnetita para a agregação de lodo biológico no tratamento de esgoto sanitário.**

Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis (SC), 165p., 2019.

FIGUEROA, M. *et al.* Nitrogen removal in aerobic granular systems. *In: Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*. Londres: IWA Publishing, 2009. p. 373–401.

GE, G. *et al.* Nitrogen Removal and Nitrous Oxide Emission in an Anaerobic/Oxic/Anoxic Sequencing Biofilm Batch Reactor. **Environmental Engineering Science**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 19–26, 2018.

GIESEN, A. *et al.* Advancements in the application of aerobic granular biomass technology for sustainable treatment of wastewater. **Water Practice and Technology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 47–54, 2013.

GRAF, D. R. H.; JONES, C. M.; HALLIN, S. Intergenomic Comparisons Highlight Modularity of the Denitrification Pathway and Underpin the Importance of Community Structure for N₂O Emissions. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. e114118, 2014.

GUIMARÃES, L. B. **Caracterização microbiológica do lodo granular na remoção de nutrientes e potencial de recuperação de exopolímeros de efluentes em reatores em bateladas sequenciais**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2017.

GUIMARÃES, L. B. *et al.* Elucidating performance failures in use of granular sludge for nutrient removal from domestic wastewater in a warm coastal climate region. **Environmental Technology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 3.330, 2018.

HALLIN, S. *et al.* Genomics and Ecology of Novel N₂O-Reducing Microorganisms. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 43–55, 2018.

HANAKI, K.; HONG, Z.; MATSUO, T. Production of Nitrous-Oxide Gas During Denitrification of Waste-Water. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 26, n. 5–6, p. 1.027–1.036, 1992.

HE, Q. *et al.* Effects of C/N ratio on nitrous oxide production from nitrification in a laboratory-scale biological aerated filter reactor. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 1.270–1.280, 2017.

HELLINGA, C. *et al.* The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 135–142, 1998.

HU, Z. *et al.* Effect of anoxic/aerobic phase fraction on N₂O emission in a sequencing batch reactor under low temperature. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 9, p. 5486–5491, 2011a.

HU, Z. *et al.* Identifying sources of nitrous oxide emission in anoxic/aerobic sequencing batch reactors (A/O SBRs) acclimated in different aeration rates. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 237–245, 2011. b.

HU, Z. *et al.* Impact of carbon source on nitrous oxide emission from anoxic/oxic biological nitrogen removal process and identification of its emission sources. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 1.059–1.069, 2013.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change: Climate Change 2014: **Synthesis Report**. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland: IPCC, 2014. 151p.

JIA, W. *et al.* Effect of PHB and oxygen uptake rate on nitrous oxide emission during simultaneous nitrification denitrification process. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 113, p. 232–238, 2012.

JUNGLES, M. K. **Desenvolvimento de grânulos aeróbios no tratamento de esgoto sanitário em reatores operados em bateladas sequenciais (RBS)**. 2011. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 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**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 27–33, 2014.

KAMPSCHREUR, M. J. *et al.* **Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during full-scale reject water treatment**. [s. l.], 2008. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 17 ago. 2018.

KAMPSCHREUR, M. J. *et al.* Nitrous oxide emission during wastewater treatment. **Water Research**, [s. l.], v. 43, n. 17, p. 4.093–4.103, 2009.

KIM, D. J.; KIM, Y. Effect of ammonium concentration on the emission of N₂O under oxygen-limited autotrophic wastewater nitrification. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 988–994, 2011.

KISHIDA, N. *et al.* Effect of C/N ratio on nitrous oxide emission from swine wastewater treatment process. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 49, n. 5–6, p. 359–365, 2004.

KONG, Q. *et al.* N₂O emission in a partial nitrification system: Dynamic emission characteristics and the ammonium-oxidizing bacteria community. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 127, p. 400–406, 2013.

LAW, Y. *et al.* Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences*, [s. l.], v. 367, n. 1593, p. 1265–77, 2012. a.

LEE, D. J. *et al.* Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 919–934, 2010.

LETTINGA, G. *et al.* Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 699–734, 1980.

- LI, P. *et al.* The synergistic effects of dissolved oxygen and pH on N₂O production in biological domestic wastewater treatment under nitrifying conditions. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 36, n. 13, p. 1.623–1.631, 2015.
- 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**, [s. l.], 2007.
- LIU, Y.; TAY, J. H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 533–563, 2004.
- LOCHMATTER, S.; GONZALEZ-GIL, G.; HOLLIGER, C. Optimized aeration strategies for nitrogen and phosphorus removal with aerobic granular sludge. **Water Research**, [s. l.], v. 47, n. 16, p. 6.187–6.197, 2013.
- LÓPEZ-VÁZQUEZ, C. M. *et al.* Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands. **Water Research**, [s. l.], v. 42, n. 10–11, p. 2.349–2.360, 2008.
- LOTITO, Adriana Maria *et al.* Nitrous oxide emissions from the oxidation tank of a pilot activated sludge plant. **Water research**, v. 46, n. 11, p. 3563-3573, 2012.
- MANNINA, G. *et al.* Greenhouse gases from wastewater treatment - A review of modelling tools. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 551–552, p. 254–270, 2016.
- MASSARA, T. M. *et al.* A review on nitrous oxide (N₂O) emissions during biological nutrient removal from municipal wastewater and sludge reject water. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 596–597, p. 106–123, 2017.
- MATSUMOTO, S. *et al.* 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.

MCILROY, S. J. *et al.* Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 50–64, 2016.

MCILROY, S. J. *et al.* MiDAS 2.0: an ecosystem-specific taxonomy and online database for the organisms of wastewater treatment systems expanded for anaerobic digester groups. **Database : the journal of biological databases and curation**, [s. l.], v. 2.017, n. 1, 2017.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28365734>.

Acesso em: 13 maio. 2019.

McILROY, S. J. *et al.* Re-appraisal of the phylogeny and fluorescence in situ hybridization probes for the analysis of the Competibacteraceae in wastewater treatment systems. **Environmental Microbiology Reports**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 166–174, 2015.

MELLO, W. Z. De *et al.* Nitrous oxide emissions from an intermittent aeration activated sludge system of an urban wastewater treatment plant. **Química Nova**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 16–20, 2013.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery**. 5th Edition. New York: McGraw-Hill, 2016. 2018p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Acordo de Paris**. [s.d.].

Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unida>

[s/acordo-de-paris](http://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unida/s/acordo-de-paris)>. Acesso em: 15 ago. 2018.

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**, [s. l.], v. 23, n. 4–6, 1991.

MORGENROTH, E. *et al.* Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. **Water Research**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 3191–3194, 1997.

MUNCH, E. V.; LANT, P.; KELLER, J. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. **Wat. Res.**, [s. l.], v. 30, n. 2, 1996.

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**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 751–761, 2009.

NI, B. J. *et al.* Mathematical modeling of nitrous oxide (N₂O) emissions from full-scale wastewater treatment plants. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 14, p. 7.795–7.803, 2013.

NIELSEN, J. L. *et al.* **FISH Handbook for biological wastewater treatment**. [s.l: s.n.].

NOR-ANUAR, A. *et al.* Strength characteristics of aerobic granular sludge. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 309–316, 2012.

PENG, L. *et al.* N₂O production by ammonia oxidizing bacteria in an enriched nitrifying sludge linearly depends on inorganic carbon concentration. **Water Research**, [s. l.], v. 74, n. i, p. 58–66, 2015a.

PENG, L. *et al.* The combined effect of dissolved oxygen and nitrite on N₂O production by ammonia oxidizing bacteria in an enriched nitrifying sludge. **Water Research**, [s. l.], v. 73, p. 29–36, 2015b.

PHILIPPOT, L. *et al.* Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. **Global Change Biology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 1497–1504, 2011.

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.

PICHS-MADRUGA, R. *et al.* **Climate Change 2014**. Mitigation of Climate Change Working Group III Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. [s. l.], [s.d.].

PIJUAN, M. *et al.* Effect of process parameters and operational mode on nitrous oxide emissions from a nitrification reactor treating reject wastewater. **Water Research**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 23–33, 2014.

PRONK, M. *et al.* Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment. **Water Research**, [s. l.], v. 84, p. 207–217, 2015.

QIN, L.; LIU, Y.; TAY, J.-H. Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 21, p. 47–52, 2004.

QUAN, X. *et al.* Nitrous oxide emission and nutrient removal in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **Water Research**, [s. l.], v. 46, n. 16, p. 4.981–4.990, 2012.

RAVISHANKARA, A. R.; DANIEL, J. S.; PORTMANN, R. W. Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. **Science**, [s. l.], v. 326, n. 5.949, p. 123–125, 2009.

REHR, B.; KLEMME, J. H. Competition for nitrate between denitrifying *Pseudomonas stutzeri* and nitrate ammonifying enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 51–57, 1989.

REINO, C. *et al.* Effect of temperature on N₂O emissions from a highly enriched nitrifying granular sludge performing partial nitrification of a low-strength wastewater. **Chemosphere**, [s. l.], v. 185, n. July, p. 336–343, 2017.

REN, Y.; NGO, H. H.; GUO, W.; NI, B. J.; LIU, Y. Linking the nitrous oxide production and mitigation with the microbial community in wastewater treatment: A review. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 7, n. March, p. 100–191, 2019.

RIBEIRO, R. P.; DE MELLO, W. Z.; KLIGERMAN, D. C.; OLIVEIRA, J. L. D. M.; ALVIM, R. B.; ANDRADE, A. S.; DE ALMEIDA, P. A. Emissões de óxido nitroso do tanque de aeração de uma estação de tratamento de esgotos com sistema de lodos ativados convencional. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 998–1003, 2013.

RIBEIRO, R. P. *et al.* Controlling Factors of Nitrous Oxide Emissions From a Conventional Activated Sludge Wastewater Treatment Plant. **Engvista**, [s. l.], v. 17, p. 375–384, 2015.

- RIBEIRO, R. P. *et al.* The response of nitrous oxide emissions to different operating conditions in activated sludge wastewater treatment plants in Southeastern Brazil. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 76, n. 9, p. 2.337–2.349, 2017.
- RIBEIRO, Renato Pereira *et al.* Effects of different operating conditions on total nitrogen removal routes and nitrous oxide emissions in a lab-scale activated sludge system. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, n. 2, 2018.
- RODRIGUEZ-CABALLERO, A. *et al.* Evaluation of process conditions triggering emissions of green-house gases from a biological wastewater treatment system. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 493, p. 384–391, 2014.
- ROGELJ, Joeri *et al.* **Paris Agreement climate proposals need a boost to keep warming well below 2 °C**. [s. l.], 2016. Disponível em: <https://tntcat.iiasa.ac.at/AR5DB/>. Acesso em: 15 ago. 2018.
- ROGERIO, T.; AKABOCL, V. **Tratamento de esgoto sanitário em reator em bateladas sequenciais com grânulos aeróbios**:desempenho do processo e modelagem matemática. 2013. Dissertação (Mestrado).Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- RUBIO-RINCÓN, F. J. *et al.* Cooperation between Candidatus Competibacter and Candidatus Accumulibacter clade I, in denitrification and phosphate removal processes. **Water Research**, [s. l.], v. 120, p. 156–164, 2017.
- RUBIO-RINCÓN, F. J. *et al.* Effect of Lactate on the Microbial Community and Process Performance of an EBPR System. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. February, p. 1–11, 2019.
- RÜTTING, T. *et al.* Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. **Biogeosciences**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1779–1791, 2011.

SARMA, S. J.; TAY, J. H.; CHU, A. Finding Knowledge Gaps in Aerobic Granulation Technology. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 66–78, 2017.

SENGAR, A. *et al.* Aerobic granulation technology: Laboratory studies to full scale practices. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 197, p. 616–632, 2018.

SHI, Y. J. *et al.* Aerobic granulation for nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor and the emission of nitrous oxide. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 2.536–2.541, 2011.

SHOW, K.-Y.; LEE, D.-J.; TAY, J.-H. Aerobic Granulation: Advances and Challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 167, n. 6, p. 1622–1640, 2012.

SONG, B.; CHEN, X. Effect of *Aeolosoma hemprichi* on excess activated sludge reduction. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 300–304, 2009.

STROHM, T. O.; GRIFFIN, B.; ZUMFT, W. G.; SCHINK, B. Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 5, p. 1420-1424, 2007.

SU, B.; CUI, X.; ZHU, J. Optimal cultivation and characteristics of aerobic granules with typical domestic sewage in an alternating anaerobic/aerobic sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 110, p. 125–129, 2012.

SUN, S.; CHENG, X.; SUN, D. Emission of N₂O from a full-scale sequencing batch reactor wastewater treatment plant: Characteristics and influencing factors. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 85, p. 545–549, 2013.

TALLEC, G. *et al.* Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 7, p. 2.200–2.209, 2008.

TODT, D.; DÖRSCH, P. Mechanism leading to N₂O production in wastewater treating biofilm systems. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 355–378, 2016.

TSUTIYA, M. T. **Abastecimento de Água**. 3. ed. São Paulo: Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2006. 643p.

UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE. Adoption of the Paris Agreement. FCCC/CP/2015/L.9/Rev.1. *In*: 2015, **Anais...** [s.l: s.n.] Disponível em: <https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/l09r01.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2018.

UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE. KYOTO PROTOCOL TO THE UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE UNITED NATIONS. *In*: 1998, **Anais...** [s.l: s.n.] Disponível em: <https://unfccc.int/sites/default/files/kpeng.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2018.

USEPA, U. S. E. P. A. **Nutrient control design manual**. Watertown: EPA, 2010.

VALVERDE-PÉREZ, B. *et al.* Short-sludge age EBPR process – Microbial and biochemical process characterisation during reactor start-up and operation. **Water Research**, [s. l.], v. 104, p. 320–329, 2016.

VAN HULLE, S. W. H. *et al.* N₂O and NO emissions during autotrophic nitrogen removal in a granular sludge reactor – a simulation study. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 33, n. 20, p. 2.281–2.290, 2012.

VASILAKI, V.; MASSARA, T. M.; STANCHEV, P.; FATONE, F.; KATSOU, E. A decade of nitrous oxide (N₂O) monitoring in full-scale wastewater treatment processes: A critical review. **Water Research**, [s. l.], 2019.

VÁZQUEZ-PADÍN, J. R. *et al.* Nitrifying granular systems: A suitable technology to obtain stable partial nitrification at room temperature.

Separation and Purification Technology, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 178–186, 2010.

VELHO, V. F. *et al.* Effect of COD/N ratio on N₂O production during nitrogen removal by aerobic granular sludge. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 76, n. 12, 2017.

WAGNER, J.; DA 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. *et al.* Aerobic granular sludge technology and nitrogen removal for domestic wastewater treatment. **Water Science & Technology**, [s. l.], v. 71, n. 7, p. 1.040-1.046, 2015.

WAGNER, J. *et al.* Effect of particulate organic substrate on aerobic granulation and operating conditions of sequencing batch reactors. **Water Research**, [s. l.], 2015. a.

WAGNER, J. **Processo de granulação aeróbia em reatores em bateladas sequenciais em condições de baixa carga orgânica**. 2015. Tese (Doutorado). PPG Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

WAGNER, J. **Desenvolvimento de Grânulos Aeróbios e Tratamento de Esgoto Doméstico em um Reator em Bateladas Sequenciais (RBS) sob Diferentes Condições Operacionais**. 2011. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

WANG, Y. *et al.* Nitric oxide and nitrous oxide emissions from a full-scale activated sludge anaerobic/anoxic/oxic process. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 289, p. 330–340, 2016.

WEBER, S. D. *et al.* Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 19, p. 6.233–6.240, 2007.

WEI, Y. *et al.* The effect of poly-??-hydroxyalkanoates degradation rate on nitrous oxide production in a denitrifying phosphorus removal system. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 170, 2014.

WEISS, R. F.; PRICE, B. A. NITROUS Oxide SOLUBILITY in Water and Seawater. **Marine Chemistry**, [s. l.], v. 8, p. 347–359, 1980.

WEISSBRODT, D. G. *et al.* Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], 2013.

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**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 579–595, 2014.

WINKLER, M. K. H. *et al.* **An integrative review of granular sludge for the biological removal of nutrients and recalcitrant organic matter from wastewater**, 2018.

WINKLER, M. K. H. *et al.* Evaluating the solid retention time of bacteria in flocculent and granular sludge. **Water Research**, [s. l.], v. 46, n. 16, p. 4.973–4.980, 2012a.

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**, [s. l.], 2012b.

WRAGE, N. *et al.* Acetylene and oxygen as inhibitors of nitrous oxide production in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira briensis*: A cautionary tale. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 13–18, 2004.

WUNDERLIN, P. *et al.* Mechanisms of N₂O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. **Water Research**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 1027–1037, 2012.

XAVIER, J. B. *et al.* Multi-Scale Individual-Based Model of Microbial and Bioconversion Dynamics in Aerobic Granular Sludge. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 41, n. 18, p. 6.410–6.417, 2007.

XIE, Y.; ZHANG, D.; LOU, S.; HE, F.; YIN, L. Slowly released carbon source from composite materials system for removing nitrate pollution in groundwater. **RSC Advances**, [s.l.], v. 7, n. 17, p. 10.215-10.220, 2017.

XING, L. *et al.* Nitrogen Removal and N₂O Emission During Low Carbon Wastewater Treatment Using the Multiple A/O Process. **Water, Air, and Soil Pollution**, [s. l.], v. 228, n. 9, 2017.

XU, S. *et al.* Redworm elimination in an integrated fixed-film activated sludge reactor. **Journal of Environmental Engineering and Science**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 44–53, 2018.

YAN, X. *et al.* Effect of influent C/N ratio on N₂O emissions from anaerobic/anoxic/oxic biological nitrogen removal processes. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 30, p. 23.714–23.724, 2017.

ZHAN, Y. *et al.* Explosive propagation of *aeolosoma hemprichi* in an activated sludge-biofilm reactor. **Polish Journal of Environmental Studies**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 2.295–2.302, 2014.

ZHOU, Y. *et al.* Nitrous oxide emission by denitrifying phosphorus removal culture using polyhydroxyalkanoates as carbon source. **Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1.616–1.623, 2012.

ZHU, X.; CHEN, Y. Reduction of N₂O and NO Generation in Anaerobic - Aerobic (Low Dissolved Oxygen) Biological Wastewater Treatment Process by Using Sludge Alkaline Fermentation Liquid. **Environ. Sci. Technol.**[s. l.], v. 45, n. 6, p. 2137–2143, 2011.