



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

Jéssica Antunes Xavier

**Granulação e estabilidade de lodo granular aeróbio desenvolvido em reatores em
bateladas sequenciais operados em diferentes condições operacionais**

Florianópolis
2021

Jéssica Antunes Xavier

**Granulação e estabilidade de lodo granular aeróbio desenvolvido em reatores em
bateladas sequenciais operados em diferentes condições operacionais**

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. Dr^a. Rejane Helena Ribeiro da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Vitor Jorge Pais Vilar

Florianópolis

2021

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

Xavier, Jéssica Antunes

Granulação e estabilidade de lodo granular aeróbio desenvolvido em reatores em bateladas sequenciais operados em diferentes condições operacionais / Jéssica Antunes Xavier ; orientadora, Rejane Helena Ribeiro da Costa, coorientador, Vítor Jorge Pais Vilar, 2021.

168 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Tratamento de esgoto sanitário. 3. Lodo granular aeróbio. 4. Estabilidade granular. 5. Remoção de nutrientes. I. da Costa, Rejane Helena Ribeiro. II. Vilar, Vítor Jorge Pais. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Jéssica Antunes Xavier

**Granulação e estabilidade de lodo granular aeróbio desenvolvido em reatores em
bateladas sequenciais operados em diferentes condições operacionais**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof. João Paulo Bassin, Dr.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

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

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pablo Heleno Sezerino, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia Ambiental.

Prof. Leonardo Hoinaski, Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

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

Orientadora

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais,
Hernani e Ilce Maria.

AGRADECIMENTOS

Uma vez foi me dito, que a dádiva de um ser humano está em pedir e receber ajuda. E não existe no mundo, um pesquisador que não foi auxiliado ao longo de sua carreira acadêmica, eu inclusive. Ao meu ver, essa é a seção mais importante do trabalho, e por mais que eu gostaria de ser breve, essa missão se torna impossível, frente as inúmeras pessoas que contribuíram para que este doutorado fosse concluído. Portanto caro leitor, sente-se e por favor tenha paciência: essa seção está extensa.

Devo assumir que não foram só pessoas que me auxiliaram nessa jornada, eu recebi sempre uma luz, que me guiou neste longo trajeto. Vocês podem achar que é a energia do universo, a aura, mas eu chamo Deus. Obrigada meu Deus pelas bênçãos e por sempre estar comigo, e claro a todos os Santos que intercederam, que ouviram minhas preces, em especial minha Nossa Senhora da Conceição Aparecida.

Se hoje estou aqui, é porque meus pais tiveram a brilhante ideia de me conceber (rsrs), por isso seu Hernani e dona Ilce Maria (carinhosamente chamada de Dona Nega), não tenho como agradecer o suficiente por todo o esforço que fizeram para eu estar aqui. Nesses 29 anos de idade, eu vivenciei um pouco do caminho árduo que foi para alcançar a condição confortável de vida que temos hoje. Meu pai trabalhava em turnos de 24 horas, e nas 48 horas de folga, ele trabalhava de servente de pedreiro para ajudar no sustento da casa. Minha mãe saía de casa às 7 horas para lecionar às crianças em pequenas escolas rurais no interior da cidade de Ibicaré, no calor, no frio, na chuva, às vezes passava o dia todo com roupas molhadas. Vocês dois trabalharam muito e me possibilitaram ter uma formação de alta qualidade, a qual não tiveram. Nem sempre tive “o do bom e do melhor”, mas seria indecência da minha parte dizer que não foi mais do que o suficiente. Quando eu tinha 12 anos (já morando na cidade de Lages), eu disse: “*só vou parar de estudar quando eu tiver o Dra. na frente do meu nome*”. Além disso, de acordo com meu pai, a escolha do meu nome Jéssica foi baseada em como a pronúncia soaria com um “doutora” na frente (rsrsrs). Eu consigo imaginar o orgulho de vocês, portanto, recebam essa minha tese de doutorado como um presente por toda trajetória de vida de vocês.

Parece que foi ontem, quando às 14 horas do dia 10/06/2014, depois de uma troca de e-mails, saí de Lages para ter uma reunião com a Profa. Rejane, na qual ela me aceitou como estagiária voluntária para ajudar os mestrandos e doutorandos do Labeflu (Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos) nas análises. O estágio era requisito para conclusão da graduação em Engenharia Ambiental na UDESC, universidade na qual obtive meu título de bacharel. Obrigada Profa. Rejane por ter dado a oportunidade, para uma jovem menina, que sabia apenas na teoria o que era uma DQO. Obrigada por acreditar que eu seria uma candidata, primeiramente para um mestrado, e depois para o desenvolvimento de um doutorado. Os seus conselhos, a sua calma nos meus momentos de desespero (ah sim, tive vários, rsrs), sempre com palavras certas, seja na vida profissional e também na vida pessoal. Obrigada por sempre ter estado aberta a diálogos, seja em sua sala ou durante os cafezinhos no Labeflu. Obrigada por ter me conduzido para os congressos internacionais, quem diria, eu? Em Tóquio? Em Dubai? Obrigada também por me incentivar a tomar café sem açúcar (rsrs), a apreciar um bom vinho, por ter me mostrado os “Dutty Free da vida” e também pelas “dicas de comprinhas”, vai me custar caro esse bom gosto agora, rsrs. Obrigada também por abrir as portas de sua casa, para receber nós, meros estudantes, em almoços, cafés, sempre regados com ótimas comidas e MUITO espumante!! (rsrs). Não há palavras que possam expressar o meu profundo agradecimento, Profa. Rejane! A confiança depositada em mim, fez eu perceber que sim, sou capaz! A senhora sempre será meu espelho de vida! Obrigada por tudo, minha orientadora, segunda mãe e amiga!

Um agradecimento cheio de carinho também para meus colegas labefluences. Embora alguns não estejam mais presentes no laboratório, sempre dizemos “uma vez Labeflu, sempre será da família Labeflu”. Agradeço pela companhia em nossos cafezinhos diários (era sagrado,

às 9 e às 14 horas, rsrs), o ambiente de trabalho se tornava mais leve com a presença de vocês. No entanto, há “serumaninos” que merecem um agradecimento especial: A minha amiga, agora, Profa. Dra. Bruna Scandolaro Magnus (me enche de orgulho, rsrs), muito obrigada minha amiga por todos os ensinamentos no laboratório e na vida, se minhas triplicatas de DQO tem apenas 5% de desvio, eu devo isso a você! Desde 2014, me impulsionando, acreditando, me aconselhando, dando uns puxõezinhos de orelha quando eu não colocava o jaleco, rsrs. Agradeço muito, que mesmo agora você em Recife, nunca deixou de estar presente na minha vida, sempre torcendo por mim, obrigada do fundo do meu coração! Lóooorena minha mineirinha e futura mamãe, não tenho como agradecer o suficiente por todo conhecimento transmitido. As extensas reuniões por vídeo contribuíram muito para a conclusão da minha tese, bem como as correções dos artigos e principalmente os comentários do porquê você estava corrigindo, assim eu apreendi! Muito, muito obrigada. Wandí querido, seus conhecimentos estatísticos foram muito bem explorados, rsrsr... Muito obrigada pela contribuição, por dispender seu tempo precioso para me ajudar, serei eternamente grata. Bruna, Lorena e Wanderli, vocês contribuíram diretamente para a conclusão desta tese, muito obrigada meus amores! No entanto, há pessoas que contribuíram de forma indireta, como é o caso da minha amiga Maria Joana. MJ às vezes eu penso que você não é humana, tem uma força dentro de você que motiva todos ao seu redor (eu inclusive), a praticidade em lidar com situações adversas da vida me impressiona, obrigada por ter sido meu suporte diário, me mostrando fibra e perseverança. Dayane, você da mesma forma, com mil e uma utilidades, obrigada por sempre buscar solução para tudo, muito ágil, sempre à disposição. Claudinha, aahh Claudinha, mesmo com toda a correria de sua vida, nunca deixou de mandar uma mensagem, um áudio perguntando sobre mim. Sempre com palavras encorajadoras! Muito obrigada pelo apoio durante todo esse tempo. Cassito meu amigo, nos aproximamos muito desde que voltei de Portugal e, desde então, tenho passado uns meses muito divertidos. Obrigada Cássio, por me ouvir horas e horas, minhas lamentações, minhas histórias (às vezes polêmicas, rsrs), discutir resultados, enfim. Os nossos almoços de sábados/domingos, sempre regados com muitas risadas me fizeram/fazem muito bem! Nelson e Natan, da mesma forma, agradeço pelos momentos descontraídos, mas também pelas discussões intelectuais sobre grânulos, vida, paixões e amores, obrigada pelo companheirismo.

Agradeço também às inúmeras pessoas da UFSC que contribuíram diretamente e/ou indiretamente para conclusão deste doutorado: Ao PPGEA, juntamente com o Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental e todos os docentes pelo suporte. Um agradecimento aos laboratórios: LIMA, LAMEB e LCME pela realização de análises e também pelo uso de equipamentos. No LCME fiz até uma amiga, a Susane, depois de horas e horas, dias e dias que passamos juntas em busca de imagens perfeitas no microscópio confocal, rsrsr, muito obrigada. O que seríamos de nós mestrandos/doutorandos sem a ajuda dos bolsistas de iniciação científica (IC)? Esses anjos em forma de bolsistas IC facilitam muito a vida de um mestrando/doutorando e por isso um agradecimento a todos estes que fizeram parte desses quatro anos, em especial as minhas duas anjinhas: Evelyn e Victória, obrigada *girls* pelo cuidado, dedicação, capricho, organização e por passarem os dados a limpo para o caderno usando sempre o mesmo modelo, cor e espessura de caneta, rsrs. Foi um prazer passar esse tempo com vocês, nós nos divertimos e muito! Um “obrigada” do tamanho do mundo para o Sr. SANTO Hélio, eu gostaria de saber quantas vezes eu liguei pra ele durante todo esse tempo, até quando eu estava em Portugal, mais que prontamente me ajudou com dúvidas sobre instalações hidráulicas. Muito obrigada Sr. Hélio, pela assistência nos reatores em todos esses anos!

Um agradecimento ao Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), juntamente com a Profa. Bruna, Prof. Wanderli e os respectivos técnicos, pela realização das análises de PHB. Serei eternamente grata pela ajuda que recebi desses profissionais e desse laboratório.

Aos membros da banca: Prof. Dr. João Paulo Bassin, Prof^ª. Dr^ª. Maria Eliza Nagel Hassemer e o Prof. Dr. Paulo Heleno Sezerino, muito obrigada pelas arguições, com excelentes questionamentos, discussões, contribuindo para que o melhor desta tese fosse extraído.

Aos órgãos financiadores da pesquisa o meu muito obrigada: CNPq, CAPES, FAPESC, Biofractal e SENAI. Em especial ao CNPq pela bolsa de doutorado no Brasil e CAPES pela oportunidade de cursar um ano (+ 2 meses) de doutorado sanduíche em Portugal com bolsa e auxílios. Falando em Portugal...

Muito obrigada ao meu coorientador Dr. Vítor Vilar, por ter me aceitado em seu laboratório (LRSE-LCM) e confiado na minha capacidade em projetar um sistema de lodo granular aeróbio. Obrigada por todo esforço e pelo custeio da pesquisa, foi de grande aprendizado. Tânia, tens meu agradecimento também, por todo o seu tempo precioso para “ter comigo” nos momentos iniciais da pesquisa. Agradeço também a FEUP, ao Departamento de Engenharia Química e aos técnicos pelo suporte. Quatorze meses longe de casa, longe da minha família, amigos e de quebra 5 meses depois de estar em Portugal: *lockdown*, pandemia, caos mundial. Tudo era amplificado e intenso, a saudade, a aflição, a fúria, a carência e por vezes a solidão. No entanto, conheci pessoas maravilhosas, que fizeram com que a amplitude desses sentimentos fosse reduzida e com certeza foram a razão desses 14 meses terem sido tão gratificantes. Agradeço primeiramente as minhas três portuguesinhas: Daniela, Joana e Sara. Dani, obrigada pelos ensinamentos na cromatografia iônica, pelo acompanhamento durante horas no preparo de eluente, curvas de calibração, trocando coluna, análises, leituras de picos, etc. Obrigada por sempre estar disponível para resolver qualquer questão e também pela sua amizade! Joana, a “nossa baby”, obrigada por toda ajuda nas análises, EPS, nitrogênio total, DQO..., mas principalmente obrigada pelo carinho, pela preocupação, até pelos sermões eternos sobre minha alimentação, sobre exercícios, sobre tomar água...sinto falta, viu? Sarinha, ahhh Sarinha, eu ainda estava no Brasil e você já estava toda doida atrás dos reagentes que eu precisaria quando chegasse em Portugal. Muito obrigada por tudo, desde do meu cadastramento no laboratório até os ciclos infinitos em ambos os reatores, com 15 pontos cada e suas respectivas análises! Dani, Joana e Sarinha, obrigada pela parceria, companheirismo, passeios e *brunches* pelas lindas ruas de Porto! Larissa e Pedro, obrigada meus queridos por toda ajuda, seja o empréstimo no cartão de acesso, até carregar bidões com água destilada e pela companhia em momentos de descontração, principalmente em nosso saudoso “100 montaditos”. Aos MatheusES (Caixeta e Pituco) e ao Lúcio pela disposição de sempre ajudar e pelos conhecimentos transmitidos em conversas informais e também nas intelectuais. As portuguesas Ana e Sandrinha, muito obrigada pelos momentos divertidos durante os cafezinhos na relva, e as discussões sobre as palavras diferentes entre PT-PT e PT-BR. Eu nunca vou entender o porquê de “descarga” em Portugal se chamar “autoclismo”, autoclismo?! Quando eu cheguei em Porto, em outubro/2019, o laboratório estava repleto de brasileiros, todos no “mesmo barco”. Me senti logo acolhida, por isso um agradecimento a Bruna Castanheira, Karyn e Reynel pelas noites de galerias (toda sexta e/ou sábado), repletos de muita diversão, Reggaeton e gin tônica, rrsrs. Uns três meses antes de embarcar para Portugal, recebi uma ligação de uma amiga, dizendo que uma menina, a qual ela conhecia, estava em Porto, e que precisava encontrar alguém para ocupar seu quarto em um apartamento, pois retornaria para o Brasil (sim, fiquei com o quarto!). Acontece que essa menina era a Bruna Porto, sim, Bruna Porto, que estava em Porto, rrsrs. E o mais surpreendente, ela estava cursando também doutorado sanduíche justamente no LRSE-LCM, o laboratório que eu também fazia parte! Difícil acreditar, né? Pois então, a Bruna me auxiliou em tudo, explicando como era Portugal, o laboratório, o custo de vida, rotinas, TUDO! Me inseriu no grupo logo de início, ou seja, facilitou meu processo de adaptação e minha vida! Muito obrigada Bru! E hoje, em Florianópolis, moramos 50 m uma da outra e nossa amizade só evoluiu (parceira na compra *whey protein*, creatina e meu incentivo diário a treinar, rrsrs). Por tudo isso e mais um pouco, sempre terá meu eterno agradecimento!

Além da Bruna abrir as portas no laboratório, ela me apresentou para uma das pessoas mais importantes durante a minha estadia em Porto, a minha *Flatmate* Manoela! O “nosso santo” não bateu logo de início, afinal, eu era uma nova integrante na casa, com costumes muito diferentes que sempre morou sozinha, e agora precisava dividir o apartamento. Mas aos poucos e com várias reuniões e muita paciência nos adaptamos e viramos um grude só (irmãs de mães diferentes!). Muito obrigada Manu, pelo incentivo a entrar na vida *fitness*, pelos conselhos, pelas jantinhas com seu risoto maravilho e nosso Matheus (vinho). Obrigada pela parceria de praia (torração no sol!), pela companhia nos pores do sol no Rio Douro e principalmente obrigada pelo suporte durante os dois meses de *lockdown*/quarentena, onde o nosso evento semanal era ir ao Pingo Doce (mercado). Se duvidar, a Manu poderia defender essa tese, de tanto que conversávamos sobre, rrsr! Obrigada por tudo miguis! É claro que outras amizades também foram conquistadas durante esse período em Porto: as brasileirinhas Yasmin, Emanuelle e Paola, obrigada pelas noites divertidas de muitas histórias (segredo!) compartilhadas. De fato, o ano em Portugal não foi nada como planejado, pandemia, *lockdown*, quarentena, mas mesmo assim, me senti muito acolhida, recebi ajuda de muitas pessoas que fizeram de tudo, na medida do possível, para eu concluir meu trabalho na FEUP! Obrigada Portugal, Porto, FEUP, LRSE-LCM, esses quatorze meses foram os mais “FIXE e XPTO” da minha vida.

Como perceberam, momentos de descontração, conversas informais são tão importantes quanto as ajudas diretas no desenvolvimento do trabalho. Muitas vezes estamos dentro do “nosso mundo da tese, da nossa bolha”, que precisamos de amigos de fora da nossa rotina, para nos trazerem uma perspectiva diferente, aliviando a carga que colocamos em nós mesmos involuntariamente. Dessa forma, agradeço ao Rafael, pelos momentos descontraídos e também pelas discussões inteligentes. Por me desafiar a pensar diferente, saindo do “padrão estabelecido pela sociedade”. Obrigada pela disposição em ouvir minhas lamúrias, com muita praticidade em tentar resolver os problemas, com planos A, B, C... Obrigada pelo carinho e apoio, sempre com palavras incentivadoras na medida certa! Um “muito obrigada” aos meus “amigos de corredor” do PPGEA: Carol, Débora, Henrique, Isabela, Juliana e Karina pela troca de conhecimento, pelos momentos divertidos e também pelos “voleizinhos” de final de semana. Um agradecimento especial ao meu amigo Henrique. Obrigada pelas longas conversas nos bancos do ENS e pelas frases encorajadoras, *respeite tua história*, como você mesmo diz! E também um *thanks* para minha amiga “quase” psicóloga Isabela, pelas lições, conversas e “dicas de vida”! As minhas amigas Lageanas, Juliana, Pricila e Fernanda, pelas palavras de conforto e por sempre demonstrarem um orgulho imenso de mim. Obrigada a todos vocês, meus amigos!

Enfim, 4 anos e 4 meses de doutorado, parece que foi uma vida, certamente regados de coisas maravilhosas (exceto a pandemia, é claro). Mas fui agraciada por Deus, por ter tido essa oportunidade, diante da escassez de recursos destinados a ciência no Brasil. Nunca falaram que ia ser fácil: chorei, perdi sono, surtei, tive crise de ansiedade, mas ao mesmo tempo eu adquiri conhecimento, amadureci como pessoa, me diverti e conheci pessoas maravilhosas, que realmente mudaram o rumo da minha vida, da minha história! Então, caro leitor, essa jornada valeu muito a pena!

Se eu faria tudo de novo? Mil vezes com certeza!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

RESUMO

A tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) demonstra grande potencial em escala real no tratamento de efluentes diversos. No entanto, ainda existem questões desafiadoras e limitações relevantes à sua aplicação mais ampla, destacando-se a instabilidade dos grânulos e perda da atividade biológica, levando à consequente desintegração. Deve-se levar em conta nos projetos, que o clima (temperatura e regime de chuvas) e a composição do esgoto local se diferenciam, afetando diretamente o desempenho do sistema. Neste contexto, esta tese de doutorado, realizada na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em cooperação com a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), teve como objetivo principal avaliar o processo de granulação e a estabilidade da biomassa granular, para diferentes condições operacionais, com foco na variação de carga orgânica (COV), relação carbono e nitrogênio (C:N) e fontes de substrato orgânico. No SE-I (reator piloto-alimentado com esgoto sanitário), foram aplicadas duas razões de troca volumétrica (RTV: 50 e 75%). Na RTV mais elevada, a biomassa apresentou uma fração de grânulos > 80% após 4 meses de operação, com morfologia heterogênea e estruturas espalhadas (*finger type*), no entanto boa sedimentabilidade (Índice Volumétrico de Lodo-IVL₃₀ < 70 mL gSST L⁻¹) foi observada. O aumento da RTV de 50 a 75% provou ser uma estratégia importante para a estabilidade do LGA, especialmente durante períodos chuvosos, quando a carga carbonácea é diluída (COV < 0,4 kgDQO₅ m⁻³ d⁻¹). As proteínas (PN) foram a componente predominante das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), com o dobro de concentração comparadas aos polissacarídeos (PS). Na RTV de 75% houve maior conteúdo de EPS, suportado pela maior abundância relativa das famílias *Saprospiraceae* e *Flavobacteriaceae*. O aumento da troca volumétrica não afetou o desempenho do reator, produzindo efluente de acordo com a legislação nacional. A DQO foi removida principalmente na fase anaeróbia do ciclo, em ambas as estratégias (> 90% para RTV=75%). A nitrificação na RTV=50% foi efetuada principalmente por *Nitrospira ssp.*, e na RTV=75% por *Nitrosomonas ssp.* e *Nitrospira ssp.* (em duas etapas). Na segunda etapa da pesquisa, utilizou-se o sistema SE-II, com 2 reatores em paralelo alimentados com efluente sintético (C:N=5 e 10, e fontes de carbono simples e complexa). A granulação foi favorecida na relação C:N=5, na qual 40% dos grânulos apresentaram diâmetro (D) acima de 500 µm. Na C:N=10, os grânulos foram menores (200 µm < D < 500 µm), mas com morfologia uniforme e ótima sedimentabilidade (IVL₃₀ e IVL₅ < 30 mL gSST L⁻¹). A razão PN/PS foi influenciada pela composição do carbono no afluente, devido ao aumento da produção de PS sob relação C:N=5, e o consumo na relação C:N=10. Em ambas as relações C:N e para os diferentes substratos orgânicos foram alcançadas elevadas remoções de carbono (~90%) e nitrificação completa (N-NO₂⁻ < 2 mg L⁻¹ no efluente). A oxidação do nitrogênio amoniacal alcançou 90% para C:N=10. Nesta condição, a ocorrência de organismos como *Zooglea* e *Flavobacterium*, corroborou para a formação de grânulos maduros e estáveis. Em conclusão, a granulação e a manutenção da estabilidade do sistema LGA foram favorecidos com uma maior razão de troca volumétrica (75%). A complexidade do substrato orgânico impactou negativamente às atividades dos microrganismos, devido os produtos intermediários das vias metabólicas da glicose e aminoácidos. Organismos associados à estabilidade da biomassa granular foram favorecidos na C:N=10. No geral, é possível desenvolver biomassa granular com esgoto sanitário, no entanto, o uso de estratégias operacionais para selecionar microrganismos é necessária, para que as principais rotas metabólicas de interesse sejam favorecidas, a fim de manter a operação estável do sistema de tratamento biológico.

Palavras-chave: Tratamento de esgoto sanitário. Reator em bateladas sequenciais. Lodo granular aeróbio. Estabilidade granular. Remoção de nutrientes.

ABSTRACT

Aerobic granular sludge (AGS) technology has been showing a great potential for the treatment of several types of wastewater on full-scale plants. However, there are still challenging issues and limitations to be addressed, e.g. the granules instability and loss of biological activity which leads to disintegration. These drawbacks should be considered since climate (i.e., temperature and rainfall) and the composition wastewater differ from place to place, which affects directly the system performance. In this context, this doctoral thesis conducted at the Federal University of Santa Catarina (UFSC) in cooperation with the Faculty of Engineering of the University of Porto (FEUP), aimed at evaluating the granulation process and the stability of granular biomass under different operational conditions by focusing on the variation of organic loading rate (OLR), carbon to nitrogen ratio (C:N) and organic substrate sources. In the first part of the research, for the pilot reactor fed with municipal wastewater, the highest VER (volumetric exchange ratio) applied of 75% led to increase in the granules fractions over 80% after 4 months of operation. Granules presented a heterogeneous morphology, finger-type structures however good settling properties (Sludge Volume Index-SVI₃₀ < 70 mL gTSS L⁻¹) were observed. The increase in the VER from 50 to 75% proved to be an important strategy for the AGS stability, especially during rainy periods, when the carbon concentration is lower (OLR < 0.4 kgCOD m⁻³ d⁻¹). Proteins (PN) were the predominant component of extracellular polymeric substances (EPS) since concentrations were doubled when compared to the polysaccharides (PS). Under the strategy of VER of 75%, EPS content was higher, which was in accordance with the higher relative abundance of *Saprospiraceae* and *Flavobacteriaceae* families. The VER increase did not affect the effluent quality, which was in accordance with Brazilian regulations. COD was removed mainly in the anaerobic phase in both strategies (> 90% for VER=75%). The nitrification in VER=50% was carried out mainly by *Nitrospira ssp.*, and in VER=75% by *Nitrosomonas ssp.* and *Nitrospira ssp.* (in two steps). In the second part of the research, two reactors were run in parallel fed with synthetic wastewater comprised by different nitrogen ratios (C:N=5 and 10), and simple and complex carbon sources. Granulation was favored in the C:N=5 ratio, in which 40% of the granules showed diameter (D) above 500 μm. Under C:N=10, the granules were smaller (200 μm < D < 500 μm), but presented uniform morphology and excellent settling proprieties (SVI₃₀ and SVI₅ < 30 mL gTSS L⁻¹). Carbon composition in the influent influenced the PN/PS ratio, since there was an increase in PS concentration under the C:N=5 ratio, while a decrease was observed for the C:N=10 ratio. High carbon removals (~90%) and complete nitrification (NO₂⁻-N < 2 mg L⁻¹) were achieved in both C:N ratios. Ammonium oxidation reached 90% for C:N=10. In this condition, the presence of organisms such as *Zooglea* and *Flavobacterium* contributed to the formation of mature and stable granules. In conclusion, the granulation and maintenance of the AGS stability were favored with higher VER (75%). The complexity of the organic substrate hindered the microbiological activity, due to the intermediary products the metabolic pathways of glucose and amino acids. Higher C:N (10) favor the development of organisms associated with the stability of granular biomass. Hence, this work shows that it is possible to successfully cultivate granular biomass with municipal wastewater. However, the factors management to select microorganisms of interest is necessary, in order to foster main metabolic pathways and, thus, maintain a more stable operation of system.

Keywords: Municipal wastewater treatment. Sequencing batch reactor. Aerobic granular sludge. Granules stability. Nutrients removal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Floco de lodo ativado convencional. (B) Grânulo aeróbio. Evidência que as células (vermelho) são integradas em uma grande matriz de polissacarídeos (azul). Barra = 100 μm	48
Figura 2: Representação esquemática do processo de formação de grânulos aeróbios e dos mecanismos envolvidos em cada etapa.	50
Figura 3: Modelo conceitual do ecossistema bacteriano de sistemas LGA, operado com regime anaeróbio-aeróbio.	59
Figura 4: Perfil da concentração de oxigênio dissolvido e de substrato em um grânulo aeróbio.	62
Figura 5: Representação esquemática simplificada do processo de remoção de fósforo pelos grânulos aeróbios. (PP) Polifosfato; (AGV) Ácidos graxos voláteis; (PAO) Organismos acumuladores de fósforo; (BOA) Bactérias oxidadoras de amônia; (BON) Bactérias oxidadoras de nitrito e (DPAO) Organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo.	63
Figura 6: Mecanismo de precipitação de fósforo impulsionado pela limitação à transferência de massa (AGV). Baixas concentrações de agentes quelantes (AGV) em torno da zona central favoreceriam cátions multivalentes, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , para se ligarem a fosfato solúvel (PO_4^{3-}).....	65
Figura 7: Configuração do sistema experimental I (SE-I).....	68
Figura 8: Dimensões esquemáticas (esquerda), aeradores na base (meio) e fotografia (direita) do reator em escala piloto (SE-I).....	69
Figura 9: Representação esquemática da configuração experimental do sistema experimental (SE-II).....	84
Figura 10: Dimensões esquemáticas (esquerda) e fotografia (direita) dos reatores em escala de bancada (SE-II).....	85
Figura 11: Fluxograma que detalha os sistemas experimentais e as estratégias operacionais utilizados em cada estudo apresentado neste item.....	94
Figura 12: Concentração de sólidos (SSV) no reator, índice volumétrico de lodo (IVL) medido após 5 (IVL ₅) e 30 min (IVL ₃₀) de sedimentação em E-1 (A) e E-2 (B); e distribuição de tamanho de partículas em E-1 (C) e E-2 (D).	97
Figura 13: Imagens de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do lodo granular aeróbio em ambas as estratégias: (a-d) representando a E-1 no 136º dia de operação e (e-h) a E-2 no 107º dia.	99

- Figura 14: Perfis de ciclo de DQOs e PHB na E-1 (lado esquerdo) e E-2 (lado direito). Os experimentos foram realizados no 136º e 107º dia de operação para E-1 (a) e E-2 (b), e também após 269 dias para E-1 (c) e 318 dias de operação para E-2 (d), respectivamente. 101
- Figura 15: Composição microbiana em ambas as estratégias operacionais. Diversidade microbiológica em nível de família (a). Outros referem a taxa com abundância máxima <3% ; Hibridização in situ fluorescente (FISH) em fatias de grânulos com EUB_{MIX} coradas em azul, Ntspa662 em verde e NSO190 em vermelho em E-1 (b) e E-2 (c); Licor misto marcado com EUB_{MIX} e NIT3(vermelho) na E-1 (d) e PAE997(vermelho) na E-2 (e). 107
- Figura 16: Gráficos de scores e loadings na E-1 (a e c) e E-2 (b e d) do modelo biplot para análise de componentes principais (ACP) das condições operacionais e características de biomassa. Círculos vermelhos e quadrados pretos estão relacionados ao período de partida do sistema e fase estacionária, respectivamente. Os quadrados cinzentos estão associados ao período instabilidade. 110
- Figura 17: Gráficos de controle T^2 de Hotelling com níveis de confiança de 95% nos cálculos do limite de superior e decomposição do T^2 para amostras fora de controle em E-1 (a e c) e E-2 (b e d). 112
- Figura 18: Distribuição do tamanho das partículas e imagens microscópicas durante o período de experimental em R1 (a e c) e R2 (b e d) nas duas fases operacionais. Barra = 1mm. 118
- Figura 19: Concentração de sólidos (SSV) (a,b); índice volumétrico de lodo (IVL) medido após 5 (IVL₅) e 30 min (IVL₃₀) de sedimentação (c,d); frações de proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) (e, f); e frações LB-EPS e TB-EPS (g, h) em ambas as fases operacionais no R1 (lado esquerdo) e R2 (lado direito). 120
- Figura 20: Perfis das concentrações de DQOs (a-d), compostos nitrogenados (e-f) e fosfato (i-l) no R1 (lado esquerdo) e R2 (lado direito) durante as fases operacionais I e II. 124
- Figura 21: Perfis de ciclo de oxigênio dissolvido (OD) e pH (a, b, c e d); compostos de nitrogenados e amônia livre (AL) (e, f, g e h); e DQOs, P-PO₄³⁻ e alcalinidade (i, j, k e l) em R1 (lado esquerdo) e R2 (lado direito). Os experimentos foram realizados no 49º dia de operação para fase I e também após 147 dias de monitoramento, representando o 49º dia da fase II. As concentrações do afluente não estão plotadas, foi considerado somente as medições na fração líquida dentro dos reatores. Os valores médios de DQOs, N-NH₄⁺ e P-PO₄³⁻ no afluente do R1 foram 255±37 mg L⁻¹, 52 ± 7 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ e 6,2 ± 1,3 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹, respectivamente, enquanto 252 ± 39 mg L⁻¹, 26 ± 6 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ e 6,3 ± 1,3 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ foram mensurados no R2. 126
- Figura 22: Dinâmica da comunidade bacteriana em nível de família nas fases I e II, no R1(lado esquerdo) e R2 (lado direito). OTUs com abundância relativa menor que 3% foram incluídos em “outros”. O gráfico em nível de gênero é fornecido no Apêndice B. 132
- Figura 23: Síntese dos perfis de ciclos observados nas melhores condições encontradas no SE-I (RTV = 75%) (a) e no SE-II (C:N=10 com efluente simples) (b), comparando com as condições desejáveis em um sistema de lodo granular aeróbio (c). As concentrações do afluente não estão plotadas, foi considerado somente as medições na fração líquida dentro dos reatores. 141

Figura 24: Imagens microscópicas da biomassa ao longo do processo de granulação durante os 339 dias (d) da E-1. Durante o período de instabilidade (160º dia), o sistema foi dominado por organismos filamentosos.	165
Figura 25: Imagens microscópicas da biomassa ao longo do processo de granulação durante os 339 dias (d) da E-2. No dia 150, (período de instabilidade) estruturas filamentosas podem ser observada no sistema.	165
Figura 26: Conteúdo da matriz EPS em termos de proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) em ambas as estratégias operacionais.	166
Figura 27: Perfil das concentrações de DQO _s , nitrogênio amoniacal (N-NH ₄ ⁺) e fósforo total (P _T) ao longo dos 339 dias de operação na E-1 (lado esquerdo) e E-2 (lado direito).	166
Figura 28: Carga orgânica volumétrica solúvel (COV) e precipitação diária na E-1 (a) e E-2 (b). Os dados de precipitação diária foram fornecidos pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (EPAGRI / CIRAM) e foram obtidos na estação meteorológica da cidade de Florianópolis, onde o estudo foi desenvolvido.	167
Figura 29: Gráficos de linearização Lineweaver-Burk para determinar a constante de meia saturação (k _{Sobs}) na	168
Figura 30: Dinâmica da comunidade bacteriana em nível de gênero nas fases I e II, no R1 (lado esquerdo) e R2 (lado direito). OTUs com abundância relativa menor que 3% foram incluídos em “outros”	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições operacionais e características do esgoto sanitário aplicadas nas estratégias operacionais E-1 e E-2.....	71
Tabela 2: Parâmetros físico-químicos e os respectivos métodos das análises.	75
Tabela 3: Descrição das sondas utilizadas na detecção dos microrganismos presentes na biomassa pela técnica de FISH.	76
Tabela 4: Composição detalhada dos efluentes simples e complexo nos reatores (R1 e R2) em ambas as fases operacionais.	88
Tabela 5: Parâmetros físico-químicos e os respectivos métodos das análises empregados no SE-II.	90
Tabela 6: Mínimos, máximos e médias dos parâmetros biocinéticos ao longo das estratégias operacionais.	102
Tabela 7: Características do efluente tratado e as respectivas eficiências de remoção para ambas as estratégias operacionais.....	104
Tabela 8: Atividade da biomassa (q) em termos de velocidades de consumo e produção de compostos orgânicos (DQOs), nitrogenados (N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₃ ⁻) e fosfatados (P-PO ₄ ³⁻).....	128
Tabela 9: Resumo das interações encontradas na ecologia microbiana quanto as relações C:N e os diferentes fontes de substrato orgânico.....	135
Tabela 10: Cargas fatoriais usadas para avaliar a variabilidade e detectar comportamento não aleatório em ambas as estratégias operacionais. Cargas absolutas iguais ou superiores a 0,50 (ponto de corte) estão destacadas em negrito.	167

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μOBS: Velocidade Específica Observada de Crescimento de Biomassa
- A/M: Relação Alimento Microrganismos
- ACP: Análise de Componentes Principais
- ACL: Altura da Cama de Lodo
- AEQS: Velocidade de Remoção Específica de DQO na Fase de Aeração
- AGV: Ácidos Graxos Voláteis
- AL: Amônia Livre
- ANQS: Velocidade de Remoção Específica de DQO na Fase de Enchimento
- APHA - *American Public Health Association*
- ATP: Adenosina Tri-fosfato
- BOA: Bactérias Oxidadoras de Amônia
- BON: Bactérias Oxidadoras de Nitrito
- BSA: Albumina Sérica Bovina
- C:N: Relação Carbono e Nitrogênio
- C:P: Relação Carbono e Fósforo
- CASAN: Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
- CLP: Controlador Lógico Programável
- CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CP: Componente Principal
- COP: Carga Orgânica Particulada
- COS: Carga Orgânica Solúvel
- COV: Carga Orgânica Volumétrica
- D>212: Fração de Partículas com Diâmetro acima de 212 μm
- DAPI: 4,6-Diamidino-2-Phenilindol
- DBO_{5,20}: Demanda Bioquímica de Oxigênio referente a 5 dias a 20° C
- DPAO: Organismos Desnitrificantes Acumuladores de Fósforo
- DQO: Demanda Química de Oxigênio
- DQO_s: Demanda Química de Oxigênio Solúvel
- DQO_T: Demanda Química de Oxigênio Total
- E-1: Primeira Estratégia Operacional (troca volumétrica de 50%)
- E-2: Segunda Estratégia Operacional (troca volumétrica de 75%)
- EBPR: *Enhanced Biological Phosphorus Removal*

EDS: Espectroscopia de raios X por energia dispersiva

EPS: *Extracellular polymeric substances*, Substâncias poliméricas extracelulares

FEUP: Faculdade de Engenharias da Universidade do Porto

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

GAO: *Glycogen-Accumulating Organisms*, Organismos acumuladores de glicogênio

H/D: Relação Altura Diâmetro

IVL: Índice Volumétrico de Lodo

LABEFLU: Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos

LB-EPS: *Loosely bound- EPS*, Substâncias poliméricas extracelulares com ligações fracas

LGA: Logo Granular Aeróbio

LSC: Limites Superiores de Controle

LSRE-LCM: *Laboratory of Separation and Reaction Engineering-Laboratory of Catalysis and Materials* - Laboratório de Processos de Separação e Reação - Laboratório de Catálise e Materiais

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MSPC: *Multivariate Statistical Process Control*, Controle Estatístico Multivariado de Processo

NDA: Nitrificação e Desnitrificação Alternada

NDS: Nitrificação e Desnitrificação Simultânea

NOB: Bactérias Oxidadoras de nitrito

OD: Oxigênio Dissolvido

OHO: Organismos Heterotróficos Ordinários

PAO: *Polyphosphate Accumulating Organisms*, Organismos acumuladores de fósforo

PHA: Polihidroxialcanoatos

PHB: Polihidroxibutirato

PN: Proteínas

PRONEX: Programa de Apoio a Núcleos de Excelência

PS: Polissacarídeos

QQ: *Quorum quenching*

QS: *Quorum sensing*

R1: Reator 1, com relação C:N de 5

R2: Reator 2, com relação C:N de 10

RBS: Reator de Bateladas Sequenciais

RBS-LGA: Reator de Bateladas Sequenciais com Lodo Granular Aeróbio

RTV: Relação de Troca Volumétrica

SE-I: Sistema Experimental – I (Reator piloto)

SE-II: Sistema Experimental – II (Reatores em bancada)

SM: *Standard Methods*

SSF: Sólidos Suspensos Fixos

SST: Sólidos Suspensos Totais

SSV: Sólidos Suspensos Voláteis

TB-EPS: *Tightly bound- EPS*, Substâncias poliméricas extracelulares com ligações fortes

TRS: Tempo de Retenção de Sólidos

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	35
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	35
1.2 JUSTIFICATIVA	36
1.3 HIPÓTESES	39
1.4 QUESTÕES DE PESQUISA	40
1.5 OBJETIVOS.....	40
1.5.1 Objetivo geral.....	40
1.5.2 Objetivos específicos.....	40
2. REFERENCIAL TEÓRICO	43
2.1. LODO GRANULAR AERÓBIO	43
2.2 APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE LODO GRANULAR AERÓBIO	44
2.3 FORMAÇÃO DE LODO GRANULAR AERÓBIO	45
2.3.1 Fatores estimulantes e seletivos na granulação aeróbia.....	46
2.3.2 EPS e a granulação	47
2.3.3 Mecanismos propostos de granulação aeróbia	49
2.4 CONDIÇÕES OPERACIONAIS E ESTABILIDADE.....	50
2.4.1 Carga orgânica volumétrica	51
2.4.2 Carga específica ou relação alimento/microrganismo	53
2.4.3 Relação carbono e nitrogênio (C:N).....	54
2.4.4 Tipo de substrato	55
2.4.5 Períodos de alimentação e inanição intermitentes (<i>Feast – famine regim</i>).....	56
2.5 COMUNIDADE MICROBIANA NO LODO GRANULAR AERÓBIO	58
2.6 REMOÇÃO DE CARBONO NITROGÊNIO E FÓSFORO EM GRÂNULOS AERÓBIOS	60
2.6.1 Carbono e Nitrogênio	60
2.6.2 Fósforo	62
3 MATERIAIS E MÉTODOS	67
3.1 SISTEMA EXPERIMENTAL I.....	67

3.1.1 Configuração do sistema experimental	67
3.1.2 Operação do sistema	69
3.1.3 Monitoramento do sistema	70
3.1.3.1 <i>Caracterização da Biomassa</i>	70
3.1.3.2 <i>Análises Físico-Químicas</i>	74
3.1.3.3 <i>Análises microbiológicas</i>	74
3.1.4 Tratamento dos dados	77
3.1.5 Cálculos	79
3.1.5.1 <i>Vazão diária de esgoto (Q_d)</i>	79
3.1.5.2 <i>Carga volumétrica (CV) e relação Alimento/Microrganismo (A/M)</i>	79
3.1.5.3 <i>Velocidade superficial ascensional de ar (V_{ar})</i>	80
3.1.5.4 <i>Velocidade ascensional do afluente ($V_{afluente}$)</i>	80
3.1.5.5 <i>Velocidade de remoção específica de substrato (q_{DQO}, q_{NH_4}, q_{Ptot})</i>	80
3.1.5.6 <i>Tempo de Retenção de Sólidos (TRS)</i>	81
3.1.5.7 <i>Velocidade específica observada de crescimento de biomassa (μ_{obs})</i>	81
3.1.5.8 <i>Constante de meia-saturação observada (K_{Sobs})</i>	82
3.1.5.9 <i>Velocidade de decaimento específico da biomassa (k_d)</i>	82
3.1.5.10 <i>Velocidade específica de hidrólise de material particulado (q_H)</i>	82
3.1.5.11 <i>Tempo de contato de hidrólise (t_H)</i>	83
3.2 SISTEMA EXPERIMENTAL II	84
3.2.1 Configuração do sistema experimental	84
3.2.2 Operação do sistema	86
3.2.3 Monitoramento do sistema	87
3.2.3.1 <i>Caracterização da Biomassa</i>	87
3.2.3.2 <i>Análises Físico-Químicas</i>	89
3.2.3.3 <i>Análises microbiológicas</i>	90
3.2.4 Tratamento dos dados	91
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4.1 COMO A RELAÇÃO TROCA VOLUMÉTRICA E A DISPONIBILIDADE DE CARBONO CONTRIBUEM PARA MELHORAR A ESTABILIDADE DO LODO GRANULAR EM RBS OPERADO EM VOLUME CONSTANTE TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO? ¹	95

4.1.1 Resultados e Discussão	96
4.1.1.1 <i>Aumento da relação troca volumétrica: efeitos a longo prazo nas características da biomassa</i>	96
4.1.1.2 <i>Atividades microbianas e parâmetros biocinéticos</i>	100
4.1.1.3 <i>Características do afluente e efluente</i>	103
4.1.1.4 <i>Ecologia microbiana</i>	106
4.1.1.5 <i>Análise dos dados</i>	108
4.1.1.6 <i>Implicações práticas para estações de tratamento de esgoto sanitário de baixa carga.....</i>	112
4.1.2 Conclusões	114
4.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO CARBONO E NITROGÊNIO E DA FONTE DE CARBONO NO LODO GRANULAR AERÓBIO	115
4.2.1 Resultados e Discussão	116
4.2.1.1 <i>Granulação.....</i>	116
4.2.1.2 <i>Propriedades da biomassa granular</i>	119
4.2.1.3 <i>Desempenho do sistema em termos de carbono nitrogênio e fósforo</i>	123
4.2.1.4 <i>Ecologia microbiana</i>	132
4.2.2 Conclusões	136
4.3 DISCUSSÃO INTEGRADA.....	137
5 CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
LISTA DE PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS .	161
ARTIGOS PUBLICADOS.....	161
ARTIGOS EM PREPARAÇÃO	162
TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS	162
APÊNDICE A	165
APÊNDICE B.....	169

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Os processos biológicos são os mais utilizados e explorados dentre as várias tecnologias existentes para o tratamento de esgoto sanitário, principalmente pela sua eficiência na remoção da matéria orgânica (DBO). No entanto, quando são projetados para remoção de nutrientes, esses demandam grande área de implantação e elevado consumo energético, devido às várias etapas exigidas para o tratamento. Dessa forma, a busca por tecnologias mais compactas, com remoção simultânea de matéria orgânica e de nutrientes, torna-se indispensável, tendo em vista a crescente expansão demográfica nas cidades e consequente aumento na geração de esgoto.

Os sistemas de lodo granular aeróbio (LGA) (comercialmente conhecida como Nereda®) foram desenvolvidos nos últimos 20 anos e são preferencialmente aplicados em reatores operados em bateladas sequenciais (RBS), os quais dispensam o uso de decantadores, bem como o retorno de lodo ao reator biológico, corroborando a necessidade da remoção simultânea de matéria orgânica e nutrientes, em sistemas mais compactos (DE BRUIN et al., 2004; LAYER et al., 2019).

Os grânulos aeróbios são formados a partir da auto agregação de microrganismos e substâncias poliméricas extracelulares (do inglês *extracellular polymeric substances*- EPS), sendo considerados como uma formação especial de biofilme, constituídos por estruturas compactas, regulares e densas, com diâmetro variando entre 0,2 e 3,0 mm (ZHU et al., 2013). No geral, o processo de granulação se inicia pela formação de agregados densos a partir do lodo utilizado como inóculo, posteriormente passando para a forma de lodo granular e finalmente para grânulos maduros e compactos (FRANCA et al., 2018).

Os estudos sobre LGA concentraram-se na compreensão dos fatores que promovem a granulação aeróbia, incluindo: i) condições de partida do reator, com ou sem inóculo (WANG et al., 2018 ; XAVIER et al., 2018); ii) composição do substrato em termos de relação C:N e C:P (ZHANG et al., 2018; MUSZYŃSKI E MIŁOBĘDZKA, 2015), iii) pressão de seleção por meio da variação do tempo de sedimentação (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2002); e ainda iv) estratégias de alimentação, configuração do reator e características hidrodinâmicas (DERLON et al., 2016; SADRI MOGHADDAM; ALAVI MOGHADDAM, 2015).

As pesquisas sobre LGA no Brasil se originaram no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos da Universidade Federal de Santa Catarina (LABEFLU-UFSC). Os estudos sobre

granulação iniciaram em escala piloto utilizando apenas esgoto sintético (JUNGLES et al., 2011), seguido da variação de carga orgânica por meio da adição de esgoto sintético ao esgoto real (JUNGLES; CAMPOS; COSTA, 2014) e com esgoto sanitário real (WAGNER; COSTA, 2015; WAGNER; COSTA, 2013) para diferentes condições de operação. Além das pesquisas em relação à granulação e à eficiência de tratamento, o grupo LABEFLU-UFSC também explorou a modelagem matemática do RBS-LGA e a dinâmica do nitrogênio, incluindo as rotas metabólicas e medições de N_2O (DAUDT et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2017; VELHO et al., 2017).

1.2 JUSTIFICATIVA

Existem questões desafiadoras e limitações relevantes para a aplicação mais ampla da tecnologia com LGA. A principal dificuldade está ligada diretamente à instabilidade dos grânulos e à perda da atividade biológica e, posteriormente, à sua desintegração. O conceito de estabilidade para LGA é aplicado quando não há variação na atividade biológica e na distribuição do tamanho dos grânulos, nem ocorrência de quebra e descarte da biomassa do reator (FRANCA et al., 2018). Porém, a desintegração e a perda dos grânulos aeróbios são relatadas em estudos cuja operação dos reatores ocorreu durante longos períodos (>100 dias), elevando as concentrações de sólidos suspensos no efluente tratado, com redução do desempenho do tratamento e, eventualmente, a falha geral do sistema (DERLON et al., 2016; LEE et al., 2010; WAN et al., 2013). O tempo em que os grânulos permanecem íntegros e saudáveis, em um sistema de tratamento de efluentes, ainda é imprevisível. Os princípios por trás da desintegração e os fatores que influenciam a instabilidade dos grânulos aeróbios, em reatores funcionando por longo período, não estão claramente identificados (LEE et al., 2010; SHOW; LEE; TAY, 2012; ZHANG; HU; LEE, 2016), tornando-se, portanto, um dos desafios atuais para o sucesso da aplicação da tecnologia LGA.

As propriedades físicas do LGA e os parâmetros de monitoramento do sistema têm sido utilizados para analisar e quantificar a estabilidade dos grânulos aeróbios. Como por exemplo, a presença de sólidos suspensos no efluente tratado, deterioração do desempenho de tratamento, índice volumétrico de lodo, coeficiente de integridade do LGA, análise morfológica e ainda avaliação da hidrofobicidade a partir de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (FRANCA et al., 2018).

As EPS são polímeros viscosos de alto peso molecular que são secretados por microrganismos, semelhantes a uma rede, que podem aderir às células formando uma estrutura tridimensional densa, protegendo-as contra o estresse externo (MCSWAIN et al., 2005). Esses polímeros são principalmente polissacarídeos (PS) e proteínas (PN) extracelulares, ácidos húmicos e DNA extracelular. A maioria dos estudos sugere que PS e PN são os principais fatores influenciadores na formação de biofilmes e lodo granular (DONG et al., 2017; TAY; LIU; LIU, 2001c). Entretanto, os mecanismos de produção de EPS e a quantidade necessária para formação de grânulos ainda estão em discussão (NANCHARAI AH e REDDY, 2018), assim como sua importância na biomassa granular é baseada em hipóteses e correlações (DING et al., 2015).

Igualmente, a seleção de bactérias de crescimento lento durante a operação de um sistema LGA tem se mostrado importante para a formação e a estabilidade dos grânulos aeróbios (DE KREUK; PRONK; VAN LOOSDRECHT, 2005). O substrato orgânico facilmente biodegradável, quando fornecido em condições anaeróbias, é convertido parcialmente e armazenado na forma de polímeros intracelulares, como os polihidroxialcanoatos (PHA) pela microbiota, sendo exemplo os organismos acumuladores de fósforo (do inglês *polyphosphate-accumulating organisms*-PAO) e organismos acumuladores de glicogênio (do inglês *glycogen accumulating organisms*- GAO). Na fase subsequente, aeróbia ou anóxica, os microrganismos estão supridos de receptores de elétrons, como oxigênio ou nitrito e nitrato, porém na ausência do substrato orgânico, eles convertem lentamente o PHA intracelular, estocado como fonte de carbono, em CO₂ e novas células. Dessa forma, minimiza a presença de organismos heterotróficos de crescimento rápido, o que resulta em grânulos mais densos e lisos, com elevada densidade específica (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004). Sendo assim, a capacidade das bactérias em armazenar substratos anaerobicamente desempenha um papel importante na formação e na estabilidade do LGA.

Ressalta-se ainda que, a maioria dos estudos sobre granulação aeróbia utiliza reatores de escala laboratorial com efluentes sintéticos, que contêm substratos facilmente biodegradáveis, como carboidratos ou ácidos graxos voláteis (acetato e propionato). Esses efluentes não são representativos dos esgotos sanitários reais. Existem poucos relatos descrevendo o funcionamento do processo LGA em condições reais de baixas cargas (por exemplo, DQO_s afluente inferior a 200 mg L⁻¹ em média) (DERLON et al., 2016; WANG et al., 2018b). Sem condições específicas (por exemplo, fase anaeróbia longa o suficiente para permitir lise dos substratos), alguns substratos se mostram muito difíceis, ou mesmo

impossíveis de serem utilizados anaerobicamente por bactérias, além disso, o impacto de tais substratos na granulação e na estabilidade dos grânulos ainda é desconhecido (PRONK et al., 2015a).

Por outro lado, visto que há uma tendência de aumento do número de ETE que adotarão a tecnologia nos próximos anos, deve-se levar em conta que o clima e a composição do esgoto de cada lugar se diferenciam e podem afetar diretamente a atividade dos microrganismos e como resultado, na eficiência dos processos de remoção dos substratos (BASSIN et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2018; WU et al., 2012). A proporção de carbono e nitrogênio (C:N) de efluentes determina a quantidade de carbono disponível para o organismo funcional, modelando assim o desempenho do reator e a dinâmica populacional microbiana do lodo granular aeróbio. De acordo com Zhang et al. (2018), particularmente em efluentes sanitários, a relação C:N típica é de aproximadamente 10,5 a 12,5 a nível mundial. No entanto, segundo alguns estudos desenvolvidos no Brasil, a C:N poderia apresentar valores menores, uma vez que a DQO solúvel oscila entre 170 e 250 mg L⁻¹ com concentrações de nitrogênio amoniacal próximas de 30 a 50 mg N L⁻¹ (GUIMARÃES et al., 2018; ROLLEMBERG et al., 2020). Portanto, observa-se que esta razão pode variar significativamente em uma ampla faixa. Outro ponto de vista é que os estudos encontrados na literatura avaliando a relação C:N em LGA são desenvolvidos principalmente utilizando apenas ácidos graxos voláteis (AGV) como substrato orgânico (por exemplo, acetato e/ou propionato) (WANG et al., 2018a, 2019; ZHANG et al., 2018). De acordo com Layer et al. (2019), a granulação e o desempenho dos sistemas LGA são comumente limitados pela composição dos efluentes. Estudos anteriores mostraram que a fonte de carbono pode interferir na morfologia, no desempenho do LGA e também nas estruturas internas, como a produção de EPS (CAI et al., 2019; LAYER et al., 2019; ROLLEMBERG et al., 2019). Dessa forma, é intuitivo que diferentes substratos orgânicos podem desenvolver comunidades microbianas diversas, principalmente, devido à competição entre grupos funcionais envolvidos na remoção de compostos carbonáceos, nitrogenados e fosfatados (HE et al., 2018). Portanto, estudos locais e em menores escalas são de extrema importância para uma melhor compreensão dos processos e amparar assim a funcionalidade do sistema em escala real. Em síntese, as condições necessárias para alcançar a granulação aeróbia são bastante diversas. Além dos fatores apresentados, o modo de operação dos reatores pode contribuir para o desenvolvimento do LGA.

Em termos operacionais, os reatores em bateladas sequenciais podem ter volume variável (sobrenadante descartado no nível intermediário do reator) (GUIMARÃES et al., 2018;

ZHANG et al., 2018) ou volume constante (DERLON et al., 2016; WANG et al., 2018b). A operação em volume constante consiste em alimentação do afluente pelo fundo do reator (enchimento ascensional) e, simultaneamente, descarta-se o efluente tratado por uma tubulação de saída localizada na parte superior. Operar um sistema LGA em volume constante é a maneira convencional encontrada em estações de tratamento em escala real. No entanto, as condições para o desenvolvimento dos grânulos e a manutenção da sua estabilidade nesse modo operante, em longo prazo, não estão claramente elucidadas.

A presente pesquisa teve como ponto de partida a problemática da granulação aeróbia, manutenção da estabilidade e perda da atividade biológica, em longo prazo. A primeira etapa do estudo teve como finalidade avaliar o tempo de formação e a estabilidade dos grânulos, suas características físico-químicas e biológicas e a eficiência no tratamento. A investigação ocorreu por meio do efeito da troca volumétrica, alterada a partir da mudança da velocidade ascensional do afluente em reator em bateladas sequenciais operado com volume constante. Para essa etapa, optou-se por realizar a alimentação no reator com esgoto sanitário, de forma a proporcionar uma melhor compreensão, quantitativa e qualitativa, dos processos biológicos que ocorrem neste tipo de sistema em condições mais próximas da realidade. A segunda parte do estudo (doutorado sanduíche), incluiu a avaliação da atividade dos microrganismos e características da matriz EPS para diferentes relações C:N e substratos orgânico (simples e complexos), nessa etapa foi utilizado efluente sintético, em vez de efluente real, possibilitando controle dos parâmetros operacionais para obter informações mais específicas.

1.3 HIPÓTESES

Diante do pressuposto, as seguintes hipóteses para o desenvolvimento da pesquisa de tese foram levantadas:

“A formação, as características e a estabilidade do lodo granular aeróbio, em longo prazo, dependem das condições operacionais do reator, e estão intimamente ligadas à carga orgânica aplicada. ”

“As características físico-químicas e biológicas, bem como a atividade microbiana da biomassa granular variam conforme a relação C:N e fontes de substrato orgânico do afluente. ”

1.4 QUESTÕES DE PESQUISA

Para nortear a pesquisa, as seguintes questões foram estabelecidas:

- Variações nas cargas aplicadas interferem nas características físico-químicas e biológicas do LGA devido à competição entre os microrganismos pelo substrato orgânico?
- Como a variação na relação C:N do afluyente interfere na comunidade microbiana, na granulação e na remoção de nutrientes?
- Substratos mais complexos, de cadeia longa, influenciam na formação, estabilidade, atividade e características dos grânulos?
- A produção de substâncias extracelulares (EPS) varia em função da complexidade do esgoto e, conseqüentemente, interfere nas características do LGA?

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Avaliar o processo de granulação e a estabilidade do lodo granular aeróbio (LGA) em reatores operados em bateladas sequenciais, submetidos a diferentes condições operacionais, com foco na variação de carga orgânica, relação C:N e fontes de carbono.

1.5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o processo de granulação e a estabilidade do LGA durante longos períodos de funcionamento do reator (> 300 dias), para diferentes trocas volumétricas (50% e 75%) no enchimento do ciclo operacional.
- Comparar o efeito da relação C:N (5 e 10), em termos de DQO₅ e N-NH₄⁺, nas características físico-químicas, conversões de substratos e na sucessão da ecologia microbiana da biomassa granular.

- Avaliar o impacto da mudança de fontes de carbono simples (acetato e propionato) para complexo (acetato, propionato, glicose e aminoácidos) na formação, estabilidade, atividade e características dos grânulos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LODO GRANULAR AERÓBIO

O lodo granular aeróbio (LGA) é apresentado como uma variante de lodo ativado desenvolvido em reatores aerados (BEUN et al., 1999; MORGENROTH et al., 1997). Enquanto em sistemas de lodo ativado convencional, os microrganismos formam pequenos agregados ou flocos irregulares com tamanho de aproximadamente 50-300 μm (LEMAIRE; WEBB; YUAN, 2008), os grânulos aeróbios têm por características: superfície esférica, estrutura compacta e densa, e são formados a partir de condições operacionais específicas do reator, com tamanho variando entre 0,2 a 3 mm (FRANCA et al., 2018).

O conceito de grânulo aeróbio foi definido durante o primeiro encontro sobre lodo granular aeróbio ocorrido em 2004 (DE KREUK; DE BRUIN; VAN LOOSDRECHT, 2005) sendo: “agregados de origem microbiana, que não coagulam sob baixa condição de cisalhamento hidrodinâmico, e que sedimentam significativamente mais rápido quando comparados à flocos de lodo ativado” (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007). Mais especificamente, a estrutura compacta e densa proporciona aos grânulos aeróbios alta gravidade específica, resultando em uma excelente capacidade de sedimentação, implicando em resultados muito próximos para o índice volumétrico de lodo (IVL) após 5, 10 e 30 minutos. A diferença entre os valores de IVL registrados após 10 e 30 min de sedimentação tem sido utilizada para diferenciar o lodo ativado convencional de lodo granular aeróbio (DERLON et al., 2016). A rápida sedimentação do LGA permite retenção de biomassa no sistema e altas taxas de conversões volumétricas (MASZENAN; LIU; NG, 2011). Além disso, a flexibilidade dos valores de tempo de retenção de sólidos (TRS) permite o desenvolvimento de uma comunidade microbiana mais diversificada no sistema (LOURENÇO et al., 2015), incluindo microrganismos de crescimento lento, reduzindo a velocidade de produção de lodo (LIU; TAY, 2007). Além dessas características, o tamanho mínimo dos agregados que define grânulos aeróbios foi estabelecido em 200 μm (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007).

De acordo com Beun et al. (1999), os grânulos aeróbios podem ser considerados um caso especial de crescimento de biofilme sem material suporte, uma vez que os agregados são auto imobilizados, densos e compostos principalmente de bactérias e EPS. A estrutura tridimensional dos grânulos forma gradientes de oxigênio dissolvido e de substratos ao longo da direção radial, levando à estratificação em camadas nesses agregados (LIU et al., 2010a;

WINKLER et al., 2013). Dessa forma, essas camadas desenvolvem microambientes que possibilitam a presença de diferentes populações bacterianas, como organismos acumuladores de fósforo (PAO), organismos acumuladores de glicogênio (GAO), bem como bactérias nitrificantes e desnitrificantes (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005; GUIMARÃES et al., 2017). Devido à estratificação da população microbiana, a remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo pode ser alcançada em uma única unidade (BASSIN et al., 2012; DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005). Portanto, decantadores secundários são dispensados, reduzindo significativamente a área de implantação, custos operacionais e investimentos em uma ETE (DE BRUIN et al., 2004; PRONK et al., 2015b).

2.2 APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE LODO GRANULAR AERÓBIO

A pesquisa e o desenvolvimento do LGA iniciaram por volta de 1993 na Universidade de Tecnologia de Delft (TU Delft), sendo que a granulação foi relatada, pela primeira vez, em 1997 (MORGENROTH et al., 1997). Desde então, a Royal HaskoningDHV, em colaboração com as empresas holandesas responsáveis pelo saneamento e a TU Delft, delinearam o processo para atender às aplicações comerciais e desenvolveram a tecnologia LGA, comercialmente denominada Tecnologia Nereda®. Desde 2003, várias plantas piloto estão em operação para tratamento de efluentes industriais e não industriais. O primeiro protótipo Nereda® para tratamento de efluente industrial foi implementado em 2005 na Holanda. Em paralelo, mais duas plantas protótipo foram construídas (África do Sul e Portugal) para o tratamento de efluentes não industriais, bem como o projeto e construção da estação de tratamento de esgoto em escala real na cidade de Epe, na Holanda em 2010-2011 (FRANCA et al., 2018; ROYAL HASKONINGDHV, 2018). Em comparação com os sistemas de lodo ativado convencional, as plantas operadas com LGA demonstraram melhorias significativas em relação à pegada ecológica (do inglês *footprint*), qualidade do efluente e economia de energia (FRANCA et al., 2018). O relatório recente sobre a planta em escala real em Garmerwolde, Holanda, tratando a mistura de efluente de origem industrial e sanitário, indicou que após um período inicial de 5 meses, as exigências dos padrões de lançamentos de efluentes foram atendidas e o uso de energia foi 58-63% menor quando comparado com as médias de estações utilizando lodos ativados na Holanda (PRONK et al., 2015b).

No Brasil, reatores Nereda® estão em sete projetos de ampliação ou construção de novas estações de tratamento de esgoto nos estados de Pernambuco e São Paulo e uma estação já se

encontra em funcionamento na cidade de Rio Janeiro, com capacidade média de tratamento de 64800 m³ por dia (ROYAL HASKONINGDHV, 2018). Contudo, devido às condições climáticas e ao tipo de esgoto sanitário, diferentes da realidade encontrada na Europa, essa tecnologia necessita ser mais bem investigada para sua aplicação com sucesso em clima tropical e subtropical.

2.3 FORMAÇÃO DE LODO GRANULAR AERÓBIO

A formação do LGA é um processo complexo, com interações físico-químicas e biológicas. A auto imobilização microbiana é induzida por condições de estresse ambiental, envolvendo cisalhamento físico, interações físico-químicas ou bioquímicas e ainda por mecanismos de atração microbiana (LIU; TAY, 2002). Considerando a variedade de espécies microbianas que são capazes de formar grânulos, a granulação provavelmente depende das condições de operação do reator, e não somente da presença de populações microbianas específicas (BEUN et al., 1999).

A compreensão dos aspectos por trás da formação do LGA tem sido estudada extensivamente, assim como a otimização das condições operacionais do reator para desenvolvimento dos grânulos aeróbios. Até o momento, o sucesso na formação dos agregados foi alcançado principalmente em reatores operados em bateladas sequenciais (RBS) (SHOW; LEE; TAY, 2012). A operação do RBS é baseada no princípio de enchimento e descarte, consistindo em cinco etapas sucessivas: enchimento, reação, sedimentação, descarte do efluente tratado e repouso. As características do RBS, como a flexibilidade na operação, regulação do descarte de lodo e as forças de cisalhamento hidráulico uniformes, propiciam um ambiente adequado para a granulação aeróbia.

A granulação em RBS é influenciada por uma variedade de fatores e condições operacionais, incluindo: pressão de seleção, obtida por meio da variação do tempo de sedimentação (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2002); estresse de cisalhamento hidráulico ou velocidades superficiais do ar (LIU; TAY, 2002); períodos de inanição no sistema (LIU; TAY, 2008; SADRI MOGHADDAM; ALAVI MOGHADDAM, 2015); tempo de retenção hidráulica (MUDA et al., 2011); variações de pH e temperatura (DE KREUK; PRONK; VAN LOOSDRECHT, 2005); condições de partida do reator, como inóculo (BASSIN et al., 2019; VERAWATY et al., 2013); composição do substrato (PRONK et al., 2015a); e configuração do reator (DERLON et al., 2016; ROCKTÄSCHEL et al., 2013).

2.3.1 Fatores estimulantes e seletivos na granulação aeróbia

As forças de cisalhamento hidrodinâmico e os regimes de alimentação e inanição (do inglês *feast-famine period*) são fatores importantes em RBS. De acordo com Nancharaiah e Kiran Kumar Reddy (2017), as forças de cisalhamento influenciam os aspectos estruturais e funcionais dos grânulos aeróbios, como também a seleção de microrganismos responsáveis pela agregação no biofilme. Por exemplo, maior força de cisalhamento desenvolve grânulos pequenos e densos.

Beun et al. (1999) relataram que um nível suficientemente alto de força de cisalhamento hidrodinâmico durante a aeração, concomitante à alta concentração de oxigênio dissolvido é favorável para granulação aeróbia. Além da atribuição na formação do LGA por meio da estimulação de colisões entre partículas, um regime com alta força de cisalhamento (velocidade ascensional de ar maior que 4 cm s^{-1}), foi proposto para induzir a produção de EPS, que de acordo com Tay, Liu e Liu (2002, 2001) é essencial para a formação de grânulos aeróbios. Sturm e Irvine (2008) desenvolveram um estudo com o objetivo de diferenciar as atribuições da força de cisalhamento e oxigênio dissolvido (OD) na formação de LGA alimentado aerobicamente. Os resultados apontaram que o OD desempenhou um papel mais significativo, já que a granulação não ocorreu em concentrações abaixo de 5 mg OD L^{-1} , mesmo sob alta força de cisalhamento.

Em reatores com LGA, a força de cisalhamento é normalmente representada como velocidade superficial ascensional de ar (NANCHARAIH; KIRAN KUMAR REDDY, 2018). Estudos iniciais mostraram que velocidades superficiais de ar superiores a $1,2 \text{ cm s}^{-1}$ eram fundamentais para a formação de LGA, uma vez que suprimiam o crescimento filamentosos, melhorando a densidade e a estabilidade dos grânulos aeróbios (BEUN et al., 1999; LIU; TAY, 2002). Tay, Liu e Liu (2001a) não observaram formação de LGA quando foi aplicado velocidade superficial do ar de $0,3 \text{ cm s}^{-1}$. Esses autores consideraram que a velocidade superficial do ar aumentou a produção de EPS, a hidrofobicidade da superfície celular e a massa específica dos grânulos aeróbios. Estudos subsequentes mostraram que é possível formar LGA a $0,8 \text{ cm s}^{-1}$, porém os agregados apresentavam instabilidade e estrutura microbiana com baixa coesão (CHEN et al., 2007; LOCHMATTER; HOLLIGER, 2014).

De acordo com Henriët et al. (2016), o efeito da velocidade ascensional do ar está ligado a outros parâmetros como cargas volumétricas ou forma de assimilação dos substratos. Recentemente, Devlin et al. (2017) mostraram que a formação de LGA é possível com baixa

velocidade de ar ($0,41 \text{ cm s}^{-1}$) ao tratar efluentes de baixa carga ($300 \text{ mg DQO}_5 \text{ L}^{-1}$), porém não de média a alta carga (600 ou $1200 \text{ mg DQO}_5 \text{ L}^{-1}$). Corroborando, Pronk et al. (2015a) demonstraram que a assimilação anaeróbia de substratos facilmente biodegradáveis, antes da fase de aeração, e/ou a conversão de substrato por bactérias de crescimento lento durante o período aeróbio, são condições essenciais para alcançar uma granulação estável. Diante disso, a formação de grânulos aeróbios é possível mesmo em baixas velocidades superficiais ascensional de ar, sugerindo que outros parâmetros são igualmente importantes no desenvolvimento do LGA.

A pressão de seleção por meio do controle do tempo de sedimentação tem sido apresentada também como uma estratégia eficaz para desencadear a granulação inicial (LIU; TAY, 2004). Com base na maior velocidade de sedimentação do LGA, em comparação com lodo ativado, o tempo de sedimentação é gradualmente diminuído (por exemplo, de 30 min a 3 min) para favorecer os agregados com sedimentação rápida, uma vez que os que apresentam baixa velocidade de sedimentação são eliminados do sistema junto com o descarte do efluente (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2000).

2.3.2 EPS e a granulação

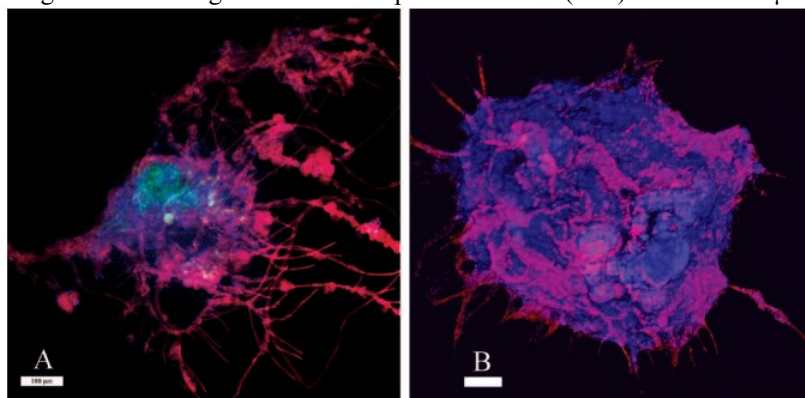
As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) são produtos metabólicos acumulados sobre a superfície das células bacterianas, formando uma matriz heterogênea e complexa. A composição de EPS em sua maioria é constituída de proteínas, polissacarídeos, ácidos húmicos, DNA e lipídios (JAHN; NIELSEN, 1995; TAY; LIU; LIU, 2001c). A matriz EPS age como uma barreira defensiva, protegendo e auxiliando na resistência às condições impostas, como por exemplo, variação da concentração de substratos e presença de componentes tóxicos.

A matriz EPS é uma componente relevante do LGA e desempenha um papel importante na agregação de microrganismos, formação de grânulos e estabilidade estrutural. Tanto na microscopia *in situ* como na análise química *ex situ*, estudos revelaram que as concentrações e a distribuição de constituintes da EPS, como proteínas e polissacarídeos, são diferentes entre flocos de lodo ativado e grânulos aeróbios, além disso, para os grânulos as EPS foram identificadas como mais viscosas (MCSWAIN et al., 2005; SEVIOUR et al., 2010).

McSwain et al. (2005) demonstraram que o teor de proteínas foi superior aos de polissacarídeos em LGA. Os autores também destacaram que a quantidade de proteínas nos grânulos foi 50% maior quando comparado a biomassa do lodo ativado. A visualização de

componentes da matriz polimérica e microrganismos, usando fluoróforos específicos, revelou que as células microbianas e os polissacarídeos estavam principalmente distribuídos na superfície externa dos grânulos, enquanto o centro era desprovido de células e composto principalmente de proteínas (Figura 1). Com base nesses padrões de distribuição, os autores sugeriram que o núcleo dos grânulos contendo proteínas, provavelmente desempenha um papel na formação e estabilidade do LGA.

Figura 1: (A) Floco de lodo ativado convencional. (B) Grânulo aeróbio. Evidência que as células (vermelho) são integradas em uma grande matriz de polissacarídeos (azul). Barra = 100 μ m.



Fonte: Meswain et al. (2005).

Por outro lado, alguns autores relataram que os polissacarídeos contribuíram de forma mais expressiva para a estabilidade estrutural dos agregados quando comparados às proteínas (TAY; LIU; LIU, 2001c). Adav, Lee e Tay (2008) buscaram determinar as contribuições dos componentes individuais de EPS na estabilidade estrutural do LGA. Os autores aplicaram hidrólise seletiva com enzimas específicas e usando fluoróforos específicos foi possível observar mudança estrutural da matriz de EPS. De acordo com o estudo, a estrutura tridimensional dos grânulos permaneceu intacta mesmo após a hidrólise enzimática de proteínas, lipídios e α -polissacarídeos. Entretanto, quando os β -polissacarídeos foram hidrolisados, ocorreu a desintegração dos agregados, sugerindo que a estrutura de grânulos é suportada por uma rede composta principalmente por esses polissacarídeos.

Apesar dos recentes avanços na determinação e caracterização da matriz de EPS, as contribuições das proteínas, polissacarídeos e outros componentes da EPS na estabilidade estrutural no LGA precisam ser determinados. Outro aspecto importante para ser estudado é a correlação entre os componentes da EPS, os microrganismos e as condições de operação do reator.

2.3.3 Mecanismos propostos de granulação aeróbia

O primeiro mecanismo de granulação proposto foi baseado na premissa que fungos filamentosos ou protozoários atuavam como uma matriz para a formação de grânulos (BEUN et al., 1999). Posteriormente, Tay, Liu e Liu (2001a) sugeriram um mecanismo de compactação gradual que seria responsável pela transformação de flocos em grânulos aeróbios e Ivanov et al. (2006) observaram que a agregação de cepas desempenhou um papel importante na formação de LGA. Mais tarde, Pijuan, Werner e Yuan (2011) propuseram a adição de grânulos aeróbios fragmentados para diminuir o tempo de partida para a formação do LGA. Enquanto, Barr, Cook e Bond (2010) argumentaram que, o crescimento de micro colônias dominadas por espécies de microrganismos específicos foi responsável pela granulação no sistema. Segundo os autores, essa forma de desenvolvimento levaria a heterogeneidades na composição de micro colônias e EPS. Contudo, muitas dessas proposições não apresentam evidências diretas apoiadas pelas investigações experimentais.

Verawaty et al. (2012) investigaram os mecanismos responsáveis pela formação de LGA, quando biomassa de lodo ativado e grânulos aeróbios fragmentos foram inoculados simultaneamente. Microesferas fluorescentes foram utilizadas na marcação dos flocos e dos grânulos aeróbios fragmentados, sendo que as interações entre ambos foram visualizadas usando microscópio confocal de varredura a laser. A fixação dos flocos à superfície dos fragmentos dos grânulos levou à redução do descarte da biomassa do sistema, manutenção da remoção de nutrientes durante a granulação e rápida formação de LGA.

Recentemente, Zhang Hu e Lee (2016a) propuseram um mecanismo de granulação mais detalhado que consiste em quatro etapas (Figura 2) sendo: (i) Ligação célula-célula promovidas por mecanismos de translocação de prótons, neutralização de carga na superfície, hidrofobicidade da superfície da célula e forças de Van der Waals; (ii) Desenvolvimento de micro agregados por estas células auto ligadas; (iii) Extensa biossíntese de EPS pelos microrganismos agregados estimulados por *quorum sensing* e estresses ambientais como limitação de nutrientes; e (iv) Maturação de grânulos continuando a síntese de EPS em resposta aos parâmetros hidrodinâmicos externos, aplicados pela configuração do reator e condições de operação.

Figura 2: Representação esquemática do processo de formação de grânulos aeróbios e dos mecanismos envolvidos em cada etapa.



Fonte: Adaptado de Nancharaiyah e Kiran Kumar Reddy (2018), com inclusão de informações de Sarma, Tay e Chu (2017).

A atribuição das interações celulares na formação de grânulos tem sido investigada principalmente pela detecção de moléculas auto indutoras produzidas por bactérias, *quorum sensing* e enzimas de *quorum quenching* (TAN et al., 2014). O *quorum sensing* (QS) caracteriza-se como um mecanismo de comunicação entre bactérias, através da produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras, por meio de membranas bacterianas. Já o *quorum quenching* é o fenômeno oposto ao QS. As moléculas auto indutoras envolvidas no QS são hidrolisadas por certas enzimas secretadas por microrganismos, interrompendo o mecanismo molecular de comunicação (DONG; WANG; ZHANG, 2007; RICKARD et al., 2006). As moléculas auto indutoras podem fornecer uma vantagem importante na investigação da granulação aeróbia e, simultaneamente, com a caracterização da matriz EPS, podendo ampliar a compreensão das interações intermoleculares envolvidas na formação de grânulos.

2.4 CONDIÇÕES OPERACIONAIS E ESTABILIDADE

O desenvolvimento do LGA apresentou avanços significativos desde as primeiras pesquisas sobre essa tecnologia. Contudo, algumas questões desafiadoras e limitações relevantes permanecem comprometendo a aplicação mais ampla desse sistema. As principais dificuldades estão ligadas diretamente ao longo período de partida (do inglês *start-up*) do reator e a instabilidade dos grânulos aeróbios. Nos últimos 20 anos, o período de *start-up* tem sido investigado extensivamente, por meio da avaliação de vários fatores que influenciam a

granulação aeróbia, resultando na otimização do processo. No entanto, a instabilidade dos grânulos aeróbios permanece sem solução, uma vez que questiona a possibilidade de uma operação confiável e estável em escala real (LEE et al., 2010; SHOW; LEE; TAY, 2012; ZHANG; HU; LEE, 2016).

O conceito de estabilidade para LGA é considerado quando a atividade microbiana e a distribuição do tamanho dos grânulos não apresentam variações, dessa forma, não há ruptura dos agregados e o descarte de biomassa do reator é evitado (FRANCA et al., 2018). Estudos relataram a desintegração e a eliminação dos grânulos aeróbios em operação a longo prazo, levando a altas concentrações de sólidos suspensos no efluente tratado, deterioração do desempenho do tratamento e, eventualmente, falha geral do sistema (LEE et al., 2010; WAN et al., 2013). Atualmente, é difícil prever o tempo que os grânulos permanecem íntegros e saudáveis em um sistema de tratamento de efluentes. Os fatores que influenciam a instabilidade e os mecanismos que inferem na desintegração dos grânulos aeróbios não foram claramente desvendados. Nesse sentido, as características físico-químicas e biológicas dos grânulos aeróbios, especificamente relacionadas à sua integridade física, precisam ser exploradas, bem como as condições operacionais que levam à deterioração ou a manutenção da estabilidade de longo prazo.

Parâmetros operacionais do reator, tais como carga orgânica volumétrica (COV), períodos de alimentação e inanição, relação carbono e nitrogênio, tipos de substratos e ainda temperatura são conhecidos por influenciar não apenas tamanho, forma e sedimentação dos grânulos, mas também a distribuição interna de bactérias e sua atividade metabólica (FRANCA et al., 2018). Portanto, um efeito relevante no nível de estabilidade no LGA é esperado a partir de mudanças nesses fatores operacionais.

2.4.1 Carga orgânica volumétrica

Em sistemas LGA, a carga orgânica volumétrica (COV) tem sido relatada como um dos fatores decisivos no processo de granulação. Além de influenciar a distribuição da comunidade microbiana nos grânulos aeróbios, a COV também interfere no tamanho, na capacidade de sedimentação e nas atividades biológicas do sistema (KIM; KIM; JANG, 2008). O esgoto sanitário apresenta baixas concentrações de compostos orgânicos, e estes podem ser reduzidos durante estações chuvosas, resultando em valores menores que $0,6 \text{ kg DQO}_5 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (FRANCA et al., 2018). Peyong et al. (2012) estudaram as mudanças na morfologia microbiana e na

estrutura dos grânulos em reatores submetidos a baixas cargas (0,13 a 1,2 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹). Os autores observaram que os grânulos desenvolvidos em acetato (1,2 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹) apresentaram estruturas porosas e desprendidas, contendo organismos filamentosos. Além disso, a estabilidade dos grânulos maduros (diâmetro médio de 2,2 mm), alimentados com esgoto sanitário real (0,54 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹), deteriorou-se após 2 meses de operação. Os agregados maiores se desintegraram gradualmente em pequenos fragmentos e foram posteriormente descartados do reator. No entanto, após a aplicação subsequente de uma COV de 0,6 kg m⁻³ d⁻¹, a integridade dos grânulos aeróbios pôde ser mantida. Corroborando, Zhang et al. (2011) relataram que os grânulos aeróbios formados em reatores operados com carga de 0,58 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹ apresentaram estrutura oca e se tornaram instáveis quando seu diâmetro alcançou 1 mm. Em paralelo com a deterioração da sedimentabilidade do lodo, o conteúdo de EPS reduziu-se, assim como a resistência da estrutura granular. Diante disso, os autores sugeriram que agregados menores são mais favoráveis para o tratamento de efluentes de baixa carga orgânica.

A maioria dos sistemas de lodos ativados opera com COV relativamente baixa (0,5-2,0 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹). No entanto, a operação com alta COV é necessária em sistemas de tratamento para possibilitar, por exemplo, o desempenho de reatores mais compactos ou o tratamento de efluentes industriais. Neste sentido, devido as características dos grânulos aeróbios, vários estudos concentraram na tentativa de operação destes sistemas com variações de 2,5 a 22,5 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹ de COV (LIU; TAY, 2004).

Beun et al. (1999) relataram que o LGA quando submetido a elevada COV (20 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹) levou ao crescimento de microrganismos filamentosos, resultando em operação instável do sistema. Essa associação foi posteriormente confirmada por Zheng et al. (2006), os grânulos aeróbios compactos (diâmetro de 1 mm) desenvolvidos em 6,0 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹ evoluíram gradualmente para grânulos filamentosos, atingindo 16 mm de diâmetro, o que ocasionou à ruptura dos agregados. Os autores propuseram que o crescimento rápido de microrganismos filamentosos era induzido pela diminuição da relação entre alimento e microrganismo (A/M) devido ao acúmulo de biomassa no reator. Recentemente, um estudo destacou o desenvolvimento de uma estratégia de granulação concluindo que, embora a alta COV tenha sido favorável à rápida granulação, após duas semanas os grânulos apresentaram baixa densidade. A redução da COV de 12 para 6 kg DQO_s m⁻³ d⁻¹ se fez necessária para manter a estabilidade dos grânulos ao longo dos 6 meses do período operacional (LIU; TAY, 2015).

Em geral, a instabilidade dos grânulos aeróbios expostos a alta carga orgânica tem sido atribuída a três principais aspectos: crescimento exacerbado de microrganismos filamentosos (LIU; LIU, 2006), hidrólise e degradação de proteínas intracelulares no interior dos grânulos e redução da produção de EPS (ADAV; LEE; LAI, 2010).

2.4.2 Carga específica ou relação alimento/microrganismo

As variações na estabilidade dos grânulos aeróbios relatadas em diferentes estudos, utilizando a mesma carga orgânica volumétrica, podem ser atribuídas à operação em concentrações distintas de biomassa. De fato, a relação alimento/microrganismo (A/M), que depende tanto da COV quanto da concentração de sólidos suspensos, tem sido associada às propriedades do LGA. Nessa linha, Li, Li e Yu (2011) investigaram os efeitos da A/M na formação, tamanho e estabilidade dos grânulos aeróbios. Os autores observaram uma relação direta e linear entre A/M e o diâmetro dos grânulos. Enquanto a relação A/M de $1,1 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$ promoveu granulação mais rápida e grânulos maiores (diâmetro médio 4,5 mm), uma redução no valor de A/M para $0,3 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$ induziu a formação mais lenta de grânulos aeróbios com diâmetro médio de 1,5 mm. Embora inicialmente os altos valores de A/M acelerassem o início da agregação, os autores sugeriram que a A/M deveria ser posteriormente reduzida para $0,3 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, no intuito de manter grânulos estáveis em operações a longo prazo.

Por outro lado, Zhu et al. (2008) e Liu; Liu (2006) apontaram que uma baixa relação A/M, resultante do aumento na concentração de biomassa, promoveu o rápido crescimento de organismos filamentosos nos agregados. Quando os grânulos atingiram diâmetro médio de 5,5 mm ocorreu a desintegração, após 200 dias de operação (ZHU et al., 2008).

Os valores relativamente baixos de A/M podem auxiliar a manter os grânulos aeróbios pequenos, densos e estáveis, em sistemas operados com longos períodos de inanição. No entanto, há um limiar no qual o aumento de organismos filamentosos pode comprometer a estabilidade do LGA. De acordo com Franca et al. (2018), ainda não estão disponíveis informações sobre o efeito na relação A/M em sistemas com alimentação na fase anaeróbia do ciclo operacional.

2.4.3 Relação carbono e nitrogênio (C:N)

A relação C:N é conhecida como um parâmetro operacional significativo na formação de LGA, pois determina a quantidade de carbono disponível para os organismos, afetando o crescimento da biomassa, a capacidade de sedimentação do lodo e a remoção de nutrientes (WANG et al., 2019). Diante do fato da frequente variação de DQO e nitrogênio nos efluentes, Luo et al. (2014) investigaram o impacto dessa relação na desintegração dos grânulos aeróbios. A diminuição da razão C:N de 4 para 1 causou uma grande mudança na comunidade microbiana e uma diminuição no conteúdo de EPS, levando à redução da oxidação do nitrogênio amoniacal, da resistência física, do tamanho dos agregados e também impactando negativamente a sedimentação da biomassa. Este estudo destacou ainda a importância da produção de tirosina nos EPS, mantendo a estabilidade dos grânulos. Em relação à diminuição da eficiência de nitrificação, embora tenha sido observada maior abundância de bactérias oxidadoras de amônia (BOA), nomeadamente *Nitrosomonas*, em valores mais baixos de C: N, a presença de bactérias oxidadoras de nitrito (BON), *Nitrospira* e *Nitrobacter*, diminuíram quando a razão C: N foi reduzida para 1. Esse comportamento foi atribuído à inibição do crescimento pela amônia livre e redução do tempo de retenção de sólidos (TRS), uma consequência do descarte da biomassa devido à deterioração da capacidade de sedimentação sob diminuição da C:N.

Mais recentemente, Kocaturk e Erguder (2016) indicaram que, embora altos valores de C:N (7,5-30) favorecessem heterotróficos de crescimento rápido, formando grânulos com estruturas soltas e com maior diâmetro, relações menores de C:N (2-5) levaram à estabilidade, com agregados pequenos e densos, enriquecidos de organismos de crescimento lento, como os nitrificantes. No mesmo estudo, a relação C:N ótima, em termos de DQO, remoção de nitrogênio e estabilidade dos grânulos, foi estabelecida como 7,5. Corroborando, Wang et al. (2019) operaram cinco RBS idênticos com C: N de 6, 7, 8, 9 e 10, em que a concentração de nitrogênio amoniacal do afluente foi de 165 mg L⁻¹, variando a concentração de substrato orgânico. Os autores apontaram que sob C:N de 8, os grânulos foram estáveis com boa capacidade de sedimentação, obtendo altas eficiências de remoção de nutrientes e grande diversidade microbiana. O mesmo foi observado por Zhang et al. (2018). Os resultados mostraram que sob C: N de 15, os grânulos se desintegraram após 66 dias de operação, enquanto as partículas com tamanho maior (650 µm) e estrutura compacta foram estáveis quando a razão aplicada foi reduzida para 5.

Por outro lado, Chen et al. (2018) relataram que a diminuição da relação C:N impactou negativamente a remoção de nitrogênio total e fósforo, bem como a morfologia dos agregados. Foi possível a restauração do sistema, quando os autores aumentaram a C:N de 10 para 20. Sem dúvida, muitas conclusões e entendimentos sobre a influência C:N foram extraídos desses estudos, no entanto, a maioria foi conduzido com altas concentrações de DQO (maior ou igual a 1000 mg L^{-1}) e nitrogênio ($\sim 200 \text{ mgN L}^{-1}$), implicando em altas cargas volumétricas. Porém, essas concentrações não caracterizam esgotos sanitários, visto que o maior desafio na operação de um sistema LGA é o tratamento de efluentes de baixa carga, estudos com concentrações que contemplem essa classificação de efluente ainda são necessários.

2.4.4 Tipo de substrato

A composição de efluentes em geral também se apresenta como um fator relevante na estabilidade dos grânulos aeróbios. Mais especificamente, a fonte de carbono influencia a morfologia e a estrutura dos agregados (FRANCA et al., 2017). Por exemplo, grânulos aeróbios alimentados com glicose apresentaram superfícies irregulares e baixa densidade devido à dominância de bactérias filamentosas, enquanto que grânulos alimentados com acetato possuem estrutura compacta, dominada por bactérias tipo bastonete (MOY et al., 2002; TAY; LIU; LIU, 2001b). Isto indica que substratos de cadeias longas (por exemplo, glucose, sacarose) podem induzir a proliferação de bactérias filamentosas. De acordo com Moy et al. (2002), substratos orgânicos complexos, como carboidratos, são degradados por meio de processos de múltiplas etapas, o que caracteriza grânulos aeróbios em camadas com estruturas complexas e grande diversidade de microrganismos, enquanto substratos de carbono simples (acetato, formiato) selecionam microestruturas simples e uniformes.

Os efluentes reais, sejam de origem industrial ou não industrial, compreendem diversas fontes de carbono, juntamente com uma variedade de outros compostos orgânicos e inorgânicos. Essa composição complexa e as diferentes velocidades de degradação dos substratos interferem na estabilidade dos grânulos aeróbios, uma vez que influenciarão a comunidade microbiana e a matriz de EPS produzida nos grânulos aeróbios (LEMAIRE; WEBB; YUAN, 2008; SCHWARZENBECK; BORGES; WILDERER, 2005). Além dos substratos presentes na forma dissolvida nos efluentes reais, uma fração significativa está na forma de coloides e materiais particulados, que por sua vez possuem baixa biodegradabilidade. De fato, instabilidades e deterioração das propriedades físicas dos grânulos aeróbios foram

relatadas para efluentes reais, quando comparadas a estudos utilizando efluentes sintéticos (LIU et al., 2010a, 2010b). Nor-anuar et al. (2012) compararam grânulos aeróbios alimentados com acetato e com esgoto sanitário. Os autores reportaram menor resistência física e menor densidade nos grânulos desenvolvido no efluente real.

Wagner et al. (2015) desenvolveram um estudo ressaltando a influência de matéria orgânica particulada. Os pesquisadores adicionaram amido ao efluente sintético, como material particulado, no intuito de avaliar a formação dos grânulos e a qualidade do efluente. Os resultados indicaram que a granulação aeróbia ocorreu mais lentamente na presença de matéria orgânica particulada. Além disso, os agregados cultivados na presença de amido apresentaram estrutura irregular e filamentosa, a qual afetou a capacidade de sedimentação da biomassa e, conseqüentemente, a qualidade do efluente tratado.

O desenvolvimento de estruturas filamentosas e pouco coesas pode ser explicado pela existência de gradientes de substratos no interior dos agregados devido à difusão (DE KREUK et al., 2010; MARTINS et al., 2004; WEISSBRODT et al., 2012). Sob essas condições, os organismos filamentosos possuem maior velocidade de crescimento devido ao crescimento unidirecional, ao invés das três direções, como as bactérias presentes no interior dos agregados (MARTINS et al., 2004; MARTINS; KARAHAN; VAN LOOSDRECHT, 2011). O material particulado é principalmente hidrolisado na superfície dos grânulos e os produtos da hidrólise (substratos facilmente biodegradáveis) são utilizados localmente, aumentando os gradientes de substrato dentro dos grânulos e estimulando assim o crescimento de estruturas filamentosas (DE KREUK et al., 2010). O maior acúmulo de material particulado na superfície dos agregados, aumentará ainda mais o efeito do fenômeno de assimilação irregular de substrato sobre o grânulo (DE KREUK et al., 2010).

Outra perspectiva foi abordada por Pronk et al. (2015a), cuja pesquisa avaliou o efeito de diferentes fontes de carbono e do regime de alimentação na estrutura dos grânulos aeróbios. Os autores concluíram que as condições de alimentação desempenham um papel fundamental na determinação da estabilidade dos agregados, uma vez que, o mesmo tipo de substrato, em regimes de alimentação distintos, levou a diferentes resultados de integridade dos grânulos.

2.4.5 Períodos de alimentação e inanição intermitentes (*Feast – famine regime*)

O regime de alimentação do reator tem sido demonstrado como um possível fator estimulante para formação de grânulos densos, com estrutura compacta e superfície lisa (DE

KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004; LIU; YANG; TAY, 2004). Esses resultados foram associados à criação de condições sucessivas e distintas onde ocorrem períodos de “saciedade” (*feast*) durante a alimentação do reator e inanição “fome” (*famine*) ao longo de cada ciclo operacional.

No período *feast*, a concentração do carbono orgânico no líquido é alta e, portanto, este substrato se difunde no grânulo completamente. Parte do carbono difundido nas camadas internas é convertido e armazenado anaerobiamente como polihidroxialcanoatos (PHA) pelos organismos heterotróficos. Quando a concentração de matéria orgânica no líquido diminui (período de *famine*), o carbono armazenado como PHA pode ser utilizado como fonte de carbono. Os organismos heterotróficos que utilizam substrato armazenado internamente têm a velocidade de crescimento limitada, quando comparado com o crescimento em substrato facilmente biodegradável, tal como acetato ou glicose (CARTA et al., 2001).

A combinação de difusão de substratos e velocidade de consumo microbiano determinam o gradiente de substrato dentro de um biofilme. Especificamente, estudos mostraram que a seleção de bactérias de crescimento lento poderia suprimir o crescimento filamentosos e melhorar a estabilidade dos grânulos aeróbios, sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido (LIU; YANG; TAY, 2004; WANG et al., 2007b). Além disso, longos períodos de inanição, resultaram em extensas fases de respiração endógena, aumentando a hidrofobicidade superficial, desenvolvendo grânulos aeróbios pequenos e compactos com alta integridade e resistência física (GAO et al., 2011; LIU; TAY, 2002).

Para a seleção de organismos de crescimento lento, duas estratégias principais foram propostas: diminuir a relação C:N na alimentação, no intuito de favorecer o crescimento de bactérias nitrificantes (LIU; YANG; TAY, 2004) ou alternar condições de alimentação e inanição para selecionar organismos acumuladores de fósforo e glicogênio (PAO e GAO), que convertem anaerobicamente substratos facilmente biodegradáveis em polímeros de armazenamento interno (PHA) (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004). Nesse sentido, de Kreuk e Van Loosdrecht (2004) propuseram um regime de enchimento prolongado, precedendo o período de aeração para a seleção de organismos acumuladores de fósforo (PAO) em RBS-LGA. A baixa velocidade ascensional do afluente ($0,5 \text{ m h}^{-1}$) proporcionou um regime hidrodinâmico de fluxo contínuo percorrendo a camada de lodo sedimentada, permitindo que o substrato penetrasse nos grânulos e fosse convertido em PHA pelos PAO. Durante a fase aeróbia subsequente, esses microrganismos se desenvolveram lentamente utilizando a fonte interna de carbono.

Estudos ressaltando os problemas de estabilidade de grânulos aeróbios, pela presença de substratos lentamente biodegradáveis em efluentes reais (colóides, polímeros e materiais particulados), sugeriram uma etapa de hidrólise anaeróbia antecedendo a alimentação de reatores em bateladas, para evitar a proliferação de organismos filamentosos na superfície dos agregados (SCHWARZENBECK; BORGES; WILDERER, 2005). Igualmente, de Kreuk et al. (2010) recomendam a hidrólise extracelular desses substratos para compostos solúveis, antes da assimilação pelos organismos. Nesse sentido, períodos mais longos de alimentação anaeróbia, em ciclos de RBS, podem propiciar a hidrólise e a fermentação de substratos, para serem posteriormente absorvidos pelos organismos presentes no LGA.

2.5 COMUNIDADE MICROBIANA NO LODO GRANULAR AERÓBIO

A comunidade microbiana que compõe o lodo das estações de tratamento biológico de efluentes, em geral, é formada principalmente por bactérias, fungos, protozoários e micrometazoários. As bactérias são as principais responsáveis pela depuração dos substratos orgânicos e nutrientes e também pela estruturação dos flocos. No entanto, os protozoários e micro metazoários também exercem grande influência na manutenção de uma comunidade bacteriana equilibrada (HOFFMANN et al., 2007).

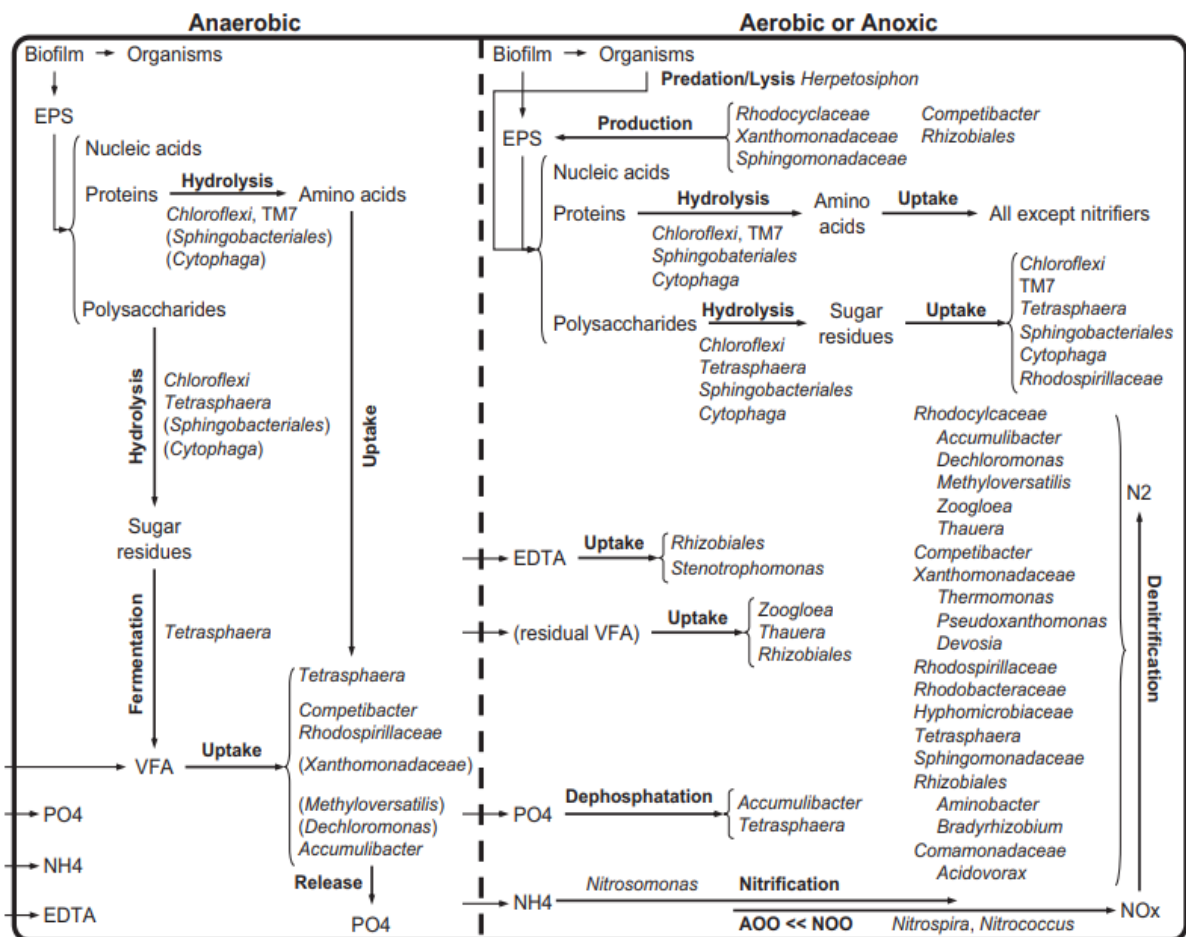
As mudanças estruturais na ecologia dos lodos biológicos, que estão associadas a mudanças nas condições operacionais do sistema, podem ajudar a identificar os membros relevantes desse ecossistema para o tratamento eficiente dos efluentes. Na literatura encontram-se relatos que mostram dependências entre a estrutura de comunidades microbianas e parâmetros operacionais, localização geográfica e composição dos efluentes, tanto em reatores em escala laboratorial como em plantas em escala real (WANG et al., 2012; YE et al., 2011).

As populações bacterianas em sistemas LGA são similares às aquelas predominantes no ecossistema dos lodos ativados. A diferença está em como elas se estruturam no biofilme. Weissbrodt; Shani e Holliger (2014) propuseram um modelo conceitual das interações bacterianas dentro do micro bioma do LGA (Figura 3). Esse modelo foi baseado em Nielsen et al. (2010), que desenvolveram as relações para as comunidades em lodos ativados convencionais.

Em síntese, em condições anaeróbias, ocorrem principalmente os processos de hidrólise de EPS, fermentação dos açúcares e assimilação dos ácidos graxos voláteis com a liberação de fosfato. Membros do filo *Chloroflexi* (bactérias filamentosas) e do gênero *Tetrasphaera*

(família *Intrasporangiaceae*) se mostraram importantes na hidrólise de proteínas, polissacarídeos e fermentação dos açúcares (NIELSEN et al., 2010; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). O gênero *Tetrasphaera* (família *Intrasporangiaceae*) exibe versatilidade, sendo capaz de realizar a assimilação dos AGV e liberação do fosfato. “*Ca. Accumulibacter*” (família *Rhodocyclaceae*) tem se mostrado como o organismo mais representativo na acumulação de fosfato, porém se manifestou em baixa abundância em estações de tratamento em escala real (SEVIOUR; MCILROY, 2008; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014).

Figura 3: Modelo conceitual do ecossistema bacteriano de sistemas LGA, operado com regime anaeróbio-aeróbio.



Fonte: Weissbrodt; Shani; Holliger (2014).

Em condições aeróbias, uma diversidade maior de microrganismos se desenvolve no ecossistema granular. De acordo com Weissbrodt, Shani e Holliger (2014), as bactérias nitrificantes predominantes em LGA são *Nitrosomonas* (BOA), *Nitrospira* (BON) e *Nitrococcus* (BON). Quanto às desnitrificantes, nota-se que muitos organismos são capazes de realizar este processo dentre eles: as famílias *Comamonadaceae*, *Sphingomonadaceae*,

Hyphomicrobiaceae, *Rhodobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Rhodocyclaceae*. Além de pertencer à comunidade das desnitrificantes, as famílias *Rhodocyclaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Sphingomonadaceae* foram também correlacionadas com a produção intensificada de EPS no lodo granular aeróbio (DULEKGURGEN et al., 2008; LIU; TAY, 2002; SEVIOUR et al., 2012). Diante disso, o conhecimento sobre as comunidades produtoras desses polímeros se faz importante para a segurança da aplicação da tecnologia, em virtude da relação direta entre granulação e produção de EPS (GUIMARÃES, 2017).

2.6 REMOÇÃO DE CARBONO, NITROGÊNIO E FÓSFORO EM GRÂNULOS AERÓBIOS

2.6.1 Carbono e Nitrogênio

Carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) são os três principais nutrientes removidos durante o tratamento de efluentes. Em efluentes sanitários, a relação C: N: P geralmente varia de 100:19:6 a 100:17:5 (DAVIES, 2005). No entanto, de acordo com Metcalf & Eddy (2017) a relação 100:5:1 é apresentada como ideal para biossíntese de bactérias aeróbias na degradação de compostos carbonáceos. Dessa forma, observa-se que carbono desempenha um papel relevante na produção de biomassa, uma vez que é o composto dominante nos efluentes sanitários. As condições operacionais aplicadas para o desenvolvimento de lodo granular aeróbio podem reduzir significativamente a quantidade de lodo produzido durante o tratamento, quando comparadas à tecnologia de lodo ativado (LIU; TAY, 2007).

Novas células, dióxido de carbono e água são os principais produtos finais do tratamento biológico de efluentes, incluindo a tecnologia LGA. De acordo com Sarma e Tay (2018) além de biomassa e água, parte do carbono é transformado em compostos inorgânicos. Os autores sugerem que carbonatos, ácido carbônico e bicarbonatos são alguns dos compostos produzidos por sistemas LGA. Contudo, investigações adicionais são necessárias para sustentar essa hipótese (SARMA; TAY, 2018).

Os processos que ocorrem nos grânulos variam nas diferentes fases ao longo do ciclo operacional do reator. Como abordado na Seção 2.4.5, durante o período de alimentação, a concentração de carbono orgânico no meio líquido é substancialmente alta. Esse substrato é difundido para o interior do grânulo, sendo convertido parcialmente e armazenado na forma de polímeros intracelulares, como os polihidroxialcanoatos (PHA). O oxigênio dissolvido (OD) terá menor penetração no interior dos grânulos neste período, em função do seu rápido consumo

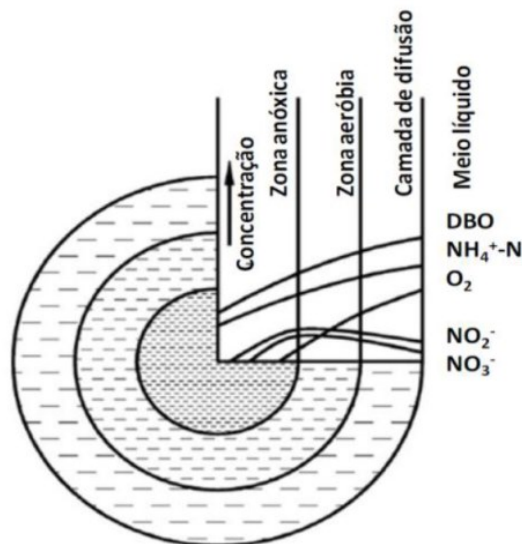
pelos organismos autotróficos e heterotróficos presentes nas camadas externas dos agregados. Neste caso, o OD é usado principalmente para a nitrificação, conversão aeróbia do carbono orgânico e para o crescimento da biomassa. Os produtos da nitrificação (nitrito e nitrato) nas camadas externas se propagam em direção ao centro dos grânulos e também para fase líquida. Quando a concentração de matéria orgânica no líquido diminui (período de inanição), o carbono armazenado como PHA pode ser utilizado como fonte de carbono no processo de desnitrificação. Ainda no período de inanição, a penetração do OD no interior é maior quando comparada a fase de alimentação, pois 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. Diante disso, quando se tem a operação do reator para remoção de carbono e nitrogênio em LGA, a remoção de nitrogênio pode acontecer por meio da nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS), acoplada ao consumo aeróbio e anaeróbio do carbono orgânico (FIGUEROA et al., 2009).

O processo de desnitrificação está diretamente relacionado com o gradiente de OD e carbono nos grânulos (Figura 4) (FIGUEROA et al., 2009). Dessa forma, a eficiência do processo NDS é regulada basicamente por dois fatores: concentração de oxigênio no meio líquido e o tamanho do grânulo. Esses dois aspectos determinam a espessura das zonas aeróbias e anóxicas dos grânulos. Quanto menor a concentração de OD no meio líquido e quanto maior o diâmetro do agregado, mais espessa é a camada anóxica e, conseqüentemente, maior a eficiência do processo de desnitrificação (DI BELLA; TORREGROSSA, 2013). A fim de melhorar a remoção completa de nitrogênio em sistema LGA, Adav, Lee e Lai (2009) introduziram uma fase anóxica no ciclo operacional do reator, após a fase aeróbia, o que levou ao desenvolvimento de uma estratégia de nitrificação e desnitrificação alternadas (NDA). Os autores observaram que a remoção de nitrogênio amoniacal foi mais evidente quando comparado com a estratégia NDS (LOCHMATTER; HOLLIGER, 2014). Entretanto, a implementação da operação NDA é desafiadora, devido a indisponibilidade de DQOs para desnitrificação e também a possível liberação de fosfato no meio líquido. Diante disso, a alternância entre condições anóxicas e aeróbias, juntamente com alimentação escalonada, é uma possível solução para alcançar a remoção completa de nitrogênio em sistemas com grânulos aeróbios (LOCHMATTER; HOLLIGER, 2014).

2.6.2 Fósforo

Os efluentes sanitários contêm fósforo proveniente, por exemplo, dos detergentes, urina e fezes, dessa forma é necessário remover este nutriente antes do descarte nos corpos hídricos para evitar o processo de eutrofização. Os esgotos sanitários podem conter fósforo inorgânico (3 a 10 mg L⁻¹), como ortofosfatos e polifosfatos, fósforo orgânico particulado (1 a 5 mg L⁻¹) e também fósforo orgânico dissolvido (SARMA; TAY, 2018). O fósforo inorgânico comumente se apresenta como ortofosfato solúvel e pode chegar a 75% do fósforo total encontrado em esgotos sanitários. Os mecanismos de remoção desse nutriente pode por via química ou biológica.

Figura 4: Perfil da concentração de oxigênio dissolvido e de substrato em um grânulo aeróbio.



Fonte: He et al. (2009).

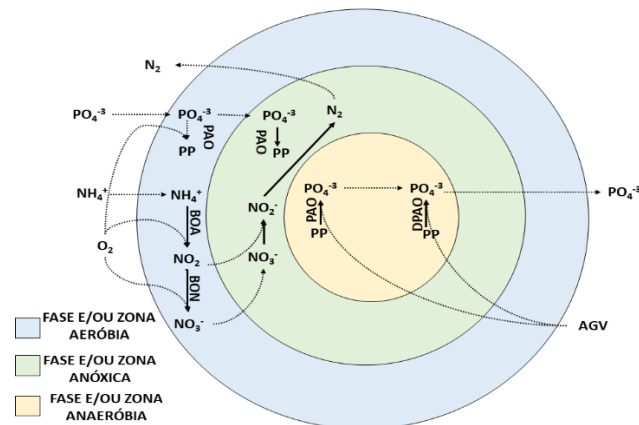
O mecanismo de remoção biológica de fósforo, conhecido como EBPR (do inglês *Enhanced Biological Phosphorus Removal*) já está bem estabelecido. O EBPR envolve organismos com capacidade de acumular fósforo na forma de polifosfato, já mencionado anteriormente como PAO. Os PAO são organismos heterotróficos de crescimento lento e seu metabolismo envolve ciclos de formação e consumo de polímeros intracelulares (polifosfatos, glicogênio e polihidroxialcanoatos) sob condições de oxidação-redução alternadas (MINO; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1998). A seleção desses organismos demanda alternância

de condições anaeróbias e aeróbias ou anóxicas em sistemas de tratamento (BASSIN et al., 2012).

Na fase anaeróbia, os PAO são capazes de assimilar as fontes de carbono na forma de ácidos graxos voláteis (AGV), como acetato e proprionato, polimerizá-los e armazená-los como polihidroxialcanoatos (PHA) intracelulares. Este metabolismo específico fornece aos PAO uma vantagem competitiva diante dos outros organismos que não possuem esta habilidade de estocar substrato orgânico sob condições anaeróbias. A conversão de AGV para PHA demanda energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), a qual é principalmente produzida pela quebra do polifosfato intracelular, ocorrendo a liberação do fosfato no meio líquido. Parte da energia também vem da hidrólise do glicogênio intracelular (MINO; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1998; WENTZEL et al., 1985).

Durante a fase aeróbia ou anóxica subsequente, quando os receptores de elétrons (oxigênio ou nitrito ou nitrato) aparecem na ausência de substrato orgânico na fase líquida, os PAO usam o PHA intracelular estocado como fonte de carbono e energia para manutenção, crescimento, formação de glicogênio e de polifosfato. Para a formação de polifosfato, o ortofosfato é absorvido do meio líquido e transformado em polifosfato. Devido ao crescimento da biomassa PAO nesta fase, a assimilação de fósforo aeróbia é maior do que a liberação de fósforo na fase anaeróbia (conhecido como *luxury uptake*), resultando em uma efetiva remoção de fósforo do meio líquido (Figura 5) (BASSIN et al., 2012; MINO; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1998). Dessa forma, o fósforo presente na biomassa é removido do sistema de tratamento por meio do descarte do lodo.

Figura 5: Representação esquemática simplificada do processo de remoção de fósforo pelos grânulos aeróbios. (PP) Polifosfato; (AGV) Ácidos graxos voláteis; (PAO) Organismos acumuladores de fósforo; (BOA) Bactérias oxidadoras de amônia; (BON) Bactérias oxidadoras de nitrito e (DPAO) Organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo.



Fonte: Adaptado Bassin et al. (2012).

A remoção biológica do fósforo pode ser combinada com a remoção de nitrogênio em condições anaeróbias e anóxicas, como descrito acima. Esses sistemas promovem o crescimento de organismos desnitrificantes acumuladores de polifosfato (do inglês *denitrifying polyphosphate-accumulating organisms*- DPAO), capazes de utilizar nitrito ou nitrato, ao invés do oxigênio para o crescimento anóxico e assimilação de fosfato (Figura 5). Neste caso, os custos de operação reduzem em função, tanto da aeração despendida para a remoção aeróbia de fosfato, quanto de carbono orgânico necessário à desnitrificação. Além disso, menos lodo é produzido sob condições anóxicas, uma vez que a produção de ATP com nitrato é aproximadamente 40% menor quando comparada àquela utilizando oxigênio como acceptor de elétrons (KERRN-JESPERSEN; HENZE, 1993; KUBA; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1996).

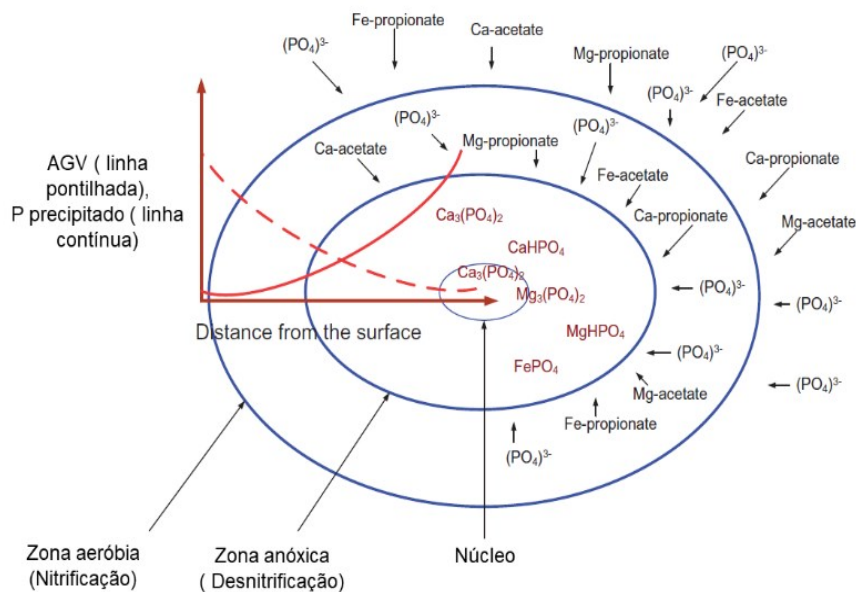
Além do processo EBPR, a precipitação de fósforo como fosfato inorgânico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e MgHPO_4) tem se mostrado um mecanismo relevante de remoção de fósforo em sistemas LGA. Com base na análise de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS), Mañas et al. (2011, 2012) concluíram que aproximadamente 45% do fósforo removido foi encontrado no interior dos grânulos precipitados como compostos inorgânicos. O mecanismo de precipitação de fósforo proposto por Sarma e Tay (2018) envolve a morfologia granular e a distribuição espacial de microrganismos desnitrificantes heterotróficos. Da mesma forma que o OD desenvolve um gradiente no comprimento radial dos grânulos, espera-se que os AGV encontrem resistência devido à morfologia do agregado criando também um gradiente de massa (substrato). A oxidação de AGV e sua baixa concentração permitiriam que os cátions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) e os grupos solúveis (PO_4^{3-}) formassem novos complexos (Ca-fosfato, Mg-fosfato, etc.) e precipitassem no núcleo dos grânulos (Figura 6). Durante o tratamento de esgotos sanitários levemente alcalinos, o Ca^{2+} seria o cátion dominante envolvido no processo, no entanto, na presença Fe^{3+} e Al^{3+} espera-se que esses desempenhem um papel superior na precipitação de fósforo (ARIAS; DEL BUBBA; BRIX, 2001).

Além dos mecanismos de remoção biológica e precipitação, o acúmulo de fósforo pela matriz de EPS nos grânulos aeróbios vem se destacando ultimamente. Estudos recentes mostraram que a produção de EPS em sistemas LGA desempenha um papel significativo nos processos de remoção, tanto de fósforo quanto de nitrogênio. Wang et al. (2014) observaram uma quantidade considerável de fósforo juntamente com cátions como K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} no EPS extraído de grânulos aeróbios. Os autores revelaram que até 30% do total de fósforo

removido foi acumulado na matriz EPS dos organismos acumuladores de fósforo (LI et al., 2015).

Diante disso, Sarma e Tay (2018) desenvolveram uma hipótese do processo de acumulação de fósforo pela EPS. Segundo os autores, sabe-se que cátions multivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} podem formar pontes iônicas para reticular os polissacarídeos tais como o alginato presentes na matriz de EPS (LI et al., 2014a; SARMA; TAY; CHU, 2017). Grupos carboxílicos (COO^-) de moléculas de alginato são responsáveis pela formação dessas pontes envolvendo Ca^{2+} e Mg^{2+} (HUANG; PAL; MOON, 1999; LEE; MOONEY, 2012). Na ocasião de abundância de cátions multivalentes, porém quantidades limitadas de agentes quelantes (por exemplo, AGV), pontes iônicas seriam modificadas para acomodar os cátions adicionais (LI et al., 2014a; SARMA; TAY; CHU, 2017). Entretanto, essa situação ainda é hipotética, necessitando de estudos adicionais para estender essas observações e fornecer informações sobre o surgimento de polifosfato na matriz de EPS.

Figura 6: Mecanismo de precipitação de fósforo impulsionado pela limitação à transferência de massa (AGV). Baixas concentrações de agentes quelantes (AGV) em torno da zona central favoreceriam cátions multivalentes, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , para se ligarem a fosfato solúvel (PO_4^{3-}).



Fonte: Sarma e Tay (2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, em cooperação com o Laboratório de Processos de Separação e Reação - Laboratório de Catálise e Materiais (*Laboratory of Separation and Reaction Engineering-Laboratory of Catalysis and Materials - LSRE-LCM*), no Departamento de Engenharia de Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Portugal.

A pesquisa teve como foco a problemática da granulação aeróbia, manutenção da estabilidade granular e perda da atividade biológica, em longo prazo. A primeira etapa do estudo teve como finalidade avaliar o tempo de formação e a estabilidade dos grânulos, suas características físico-químicas e biológicas concomitantes à eficiência de tratamento. Para essa etapa, utilizou-se o sistema experimental I (SE-I), na qual optou-se por realizar a alimentação em reator RBS piloto (1 m³) com esgoto sanitário, de forma a proporcionar uma melhor compreensão, quantitativa e qualitativa, dos processos biológicos que ocorrem neste tipo de sistema em condições mais próximas da realidade.

A segunda parte desta pesquisa, também sobre a granulação aeróbia, incluiu um estudo mais específico sobre o impacto das relações C:N com diferentes substratos orgânicos (simples e complexo) como fonte de carbono. Para tal, foi utilizado o sistema experimental II (SE-II), construído na FEUP. O sistema foi composto de dois RBS em escala de bancada operados paralelamente, sendo que para essa parte do trabalho foi utilizado efluente sintético, em vez de efluente real. Dessa forma, o controle dos parâmetros operacionais, como temperatura e cargas volumétricas foi alcançado, a fim de obter informações mais específicas da influência das concentrações de nitrogênio e do impacto das fontes distintas de compostos carbonáceos.

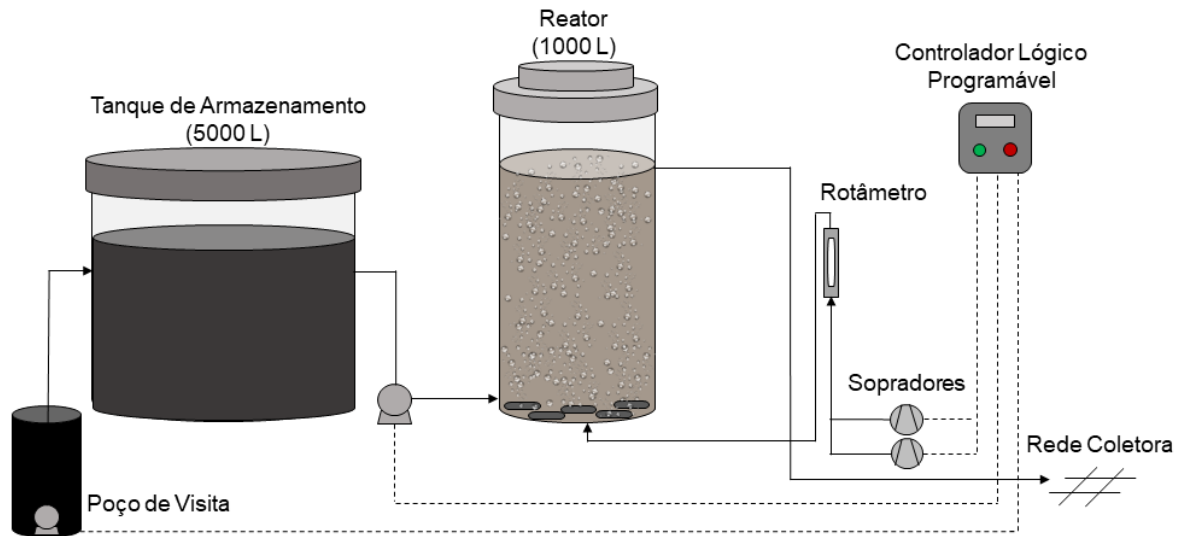
3.1 SISTEMA EXPERIMENTAL I

3.1.1 Configuração do sistema experimental

O sistema em escala piloto foi instalado em uma extensão do LABEFLU, localizado próximo ao Restaurante Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. O efluente sanitário utilizado para alimentação do sistema foi coletado em uma rede de esgoto sanitário da

operadora Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), que atende a bacia do Pantanal/UFSC. Na Figura 7 é apresentada a configuração do sistema experimental SE-I.

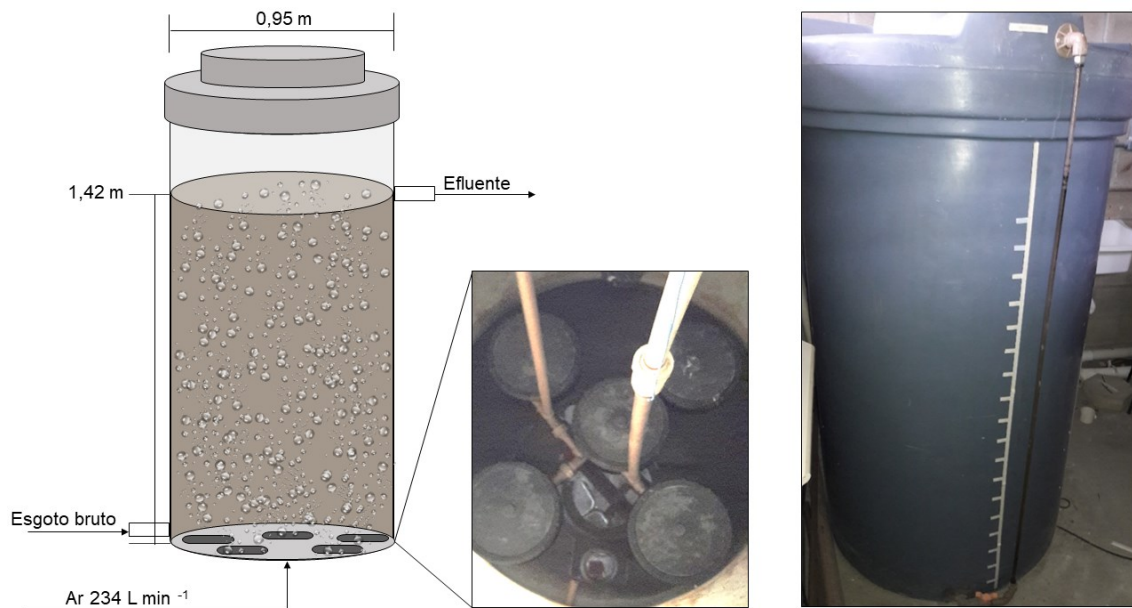
Figura 7: Configuração do sistema experimental I (SE-I).



Fonte: Próprio autor

O efluente bruto era bombeado por meio de uma bomba submersa (Schneider BSC – 94 – $\frac{3}{4}$ CV 60 Hz) para o tanque de armazenamento com capacidade de 5000 L. Deste, o esgoto era direcionado para dentro do reator também por bombeamento (NETZSCH/NEMO®, modelo NM®015BY01L06B). O reator piloto foi construído em polipropileno, com 1,42 m de altura e 0,95 m de diâmetro interno, resultando em uma relação altura/diâmetro (H/D) de 1,5, essa configuração assegurou um volume útil de aproximadamente 1000 L (Figura 8). Durante a fase de aeração, o ar comprimido era enviado por meio de dois sopradores que operaram em paralelo (Thomas AP-120). A linha de ar atravessava 5 difusores circulares de membrana (EPDM HD 340mm – rosqueável $\frac{3}{4}$ "') distribuídos na parte inferior (base) do reator (Figura 8). O sistema de aeração era composto ainda por filtros, válvulas reguladoras de pressão e rotâmetro, sendo este último destinado à medição e ao controle da vazão de ar aplicada ao reator. No final de cada ciclo, o efluente tratado era descartado do sistema e retornava para a rede coletora da CASAN um ponto a jusante da coleta. O controle de cada fase do ciclo, bem como o acionamento dos equipamentos, foi automatizado por meio de um controlador lógico programável (CLP, Siemens).

Figura 8: Dimensões esquemáticas (esquerda), aeradores na base (meio) e fotografia (direita) do reator em escala piloto (SE-I).



Fonte: Próprio autor

3.1.2 Operação do sistema

O sistema operou em regime de bateladas sequenciais com ciclo operacional de 6 horas, compreendendo fases de enchimento ascensional (90 min), reação aeróbia (240 min) e período de sedimentação (30 min). O descarte do efluente tratado era concomitante ao enchimento, dessa forma denomina-se “*reator em bateladas sequenciais com volume constante*”. A longa fase de alimentação foi escolhida visando à hidrólise do material particulado e à utilização do substrato orgânico (WAGNER et al., 2015). Optou-se por um longo período de aeração devido ao acúmulo de nitrito (nitrificação incompleta) constatado em trabalhos anteriores (GUIMARÃES et al., 2018; WAGNER; DA COSTA, 2013; XAVIER et al., 2018).

O sistema foi operado sem controle de oxigênio dissolvido (OD). Os níveis de OD variaram em função dos metabolismos aeróbios ativos, e atingiam a saturação assim que as conversões microbianas eram finalizadas. A aeração em fluxo ascendente correspondeu a uma velocidade superficial do gás de $0,55 \text{ cm s}^{-1}$, sendo obtida por meio de uma vazão de ar de 234 L min^{-1} . A velocidade ascensional de ar foi estipulada baseando-se em estudo realizado por Devlin et al. (2017), onde os autores atingiram granulação com $0,41 \text{ cm s}^{-1}$ no tratamento de efluente de baixa carga ($\text{DQO}_5 < 300 \text{ mg L}^{-1}$).

Para essa parte da pesquisa desenvolvida na UFSC foram definidas duas estratégias operacionais (E-1 e E-2), variando a troca volumétrica do reator por meio do aumento da vazão de enchimento do sistema. O sistema não foi inoculado e, no fim da primeira estratégia, o reator foi totalmente drenado, para então iniciar a segunda estratégia. Na primeira estratégia (E-1), o sistema operou por 339 dias, com troca volumétrica de 50%, correspondendo a uma velocidade ascensional do efluente de 0,48 m/h. Para a segunda estratégia (E-2), também operada por 339 dias, a troca volumétrica e a velocidade ascensional do efluente foram ampliadas para 75% e 0,69 m/h, respectivamente, no intuito de aumentar a carga orgânica, alcançando maior capacidade de conversão e melhor estabilidade da biomassa granular (PEYONG et al., 2012; WAGNER; DA COSTA, 2013). Na Tabela 1 é apresentada uma síntese das condições operacionais e das características do esgoto sanitário para as estratégias E-1 e E-2.

3.1.3 Monitoramento do sistema

Para o monitoramento do reator foram coletadas semanalmente amostras do efluente bruto (entrada do sistema), saída (efluente tratado no fim das 6 h de ciclo), do licor misto após 2 min de aeração (correspondente a 92 min do ciclo) e no final desta mesma fase (equivalendo a 330 min do ciclo). Além destas, no intuito de avaliar as conversões de substratos, foram realizadas coletas de amostras em diferentes pontos ao longo de uma batelada, representando um ciclo completo do reator. Essas amostras foram coletadas a cada 10-60 min.

3.1.3.1 Caracterização da Biomassa

- Granulometria

A granulometria da biomassa era avaliada semanalmente seguindo a metodologia proposta por Bin et al. (2011). A triagem foi realizada com quatro peneiras de aço inoxidável de 20 cm de diâmetro, tendo as respectivas aberturas de malha de 600, 400, 300 e 212 μm , que permitiram cobrir um amplo intervalo de tamanho de grânulo. As peneiras foram montadas verticalmente em ordem decrescente de abertura de malha (de cima para baixo). Um recipiente do mesmo diâmetro das peneiras ficava localizado na parte inferior para recuperar as partículas menores que 212 μm . Antes da análise, 200 mL de licor misto (coletado no fim da fase de

aeração) foram misturados a 800 mL de água da torneira, de forma a facilitar a passagem dos sólidos pelas peneiras, evitando a colmatção.

Tabela 1: Condições operacionais e características do esgoto sanitário aplicadas nas estratégias operacionais E-1 e E-2.

Condições operacionais	Unidade	E-1	E-2
Período de operação	dias	339	339
Troca volumétrica	%	50	75
Enchimento/Descarte	min	90	90
Aeração	min	240	240
Sedimentação	min	30	30
Tempo total de ciclo	min	360	360
Volume de tratamento	L	500	750
Vazão de enchimento	L min ⁻¹	5,55	8,33
Velocidade ascensional do efluente	m h ⁻¹	0,48	0,69
Carga orgânica total	kg DQO _T m ⁻³ d ⁻¹	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,4
Carga orgânica solúvel	kg DQO _S m ⁻³ d ⁻¹	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2
Carga de nitrogênio total	kg N _T m ⁻³ d ⁻¹	0,10 ± 0,03	0,16 ± 0,05
Carga de nitrogênio amoniacal	kg N-NH ₄ ⁺ m ⁻³ d ⁻¹	0,07 ± 0,02	0,14 ± 0,05
Carga de fósforo total	kg P _T m ⁻³ d ⁻¹	0,014 ± 0,004	0,019 ± 0,006
Características do afluente	Unidade	E-1	E-2
Sólidos suspensos totais	mg SST L ⁻¹	117 ± 59	118 ± 65
DQO Total	mg DQO _T L ⁻¹	409 ± 130	398 ± 136
DQO Solúvel	mg DQO _S L ⁻¹	224 ± 105	192 ± 60
DBO _{5,20}	mg DBO L ⁻¹	241 ± 79	233 ± 82
Nitrogênio total	mg N _T L ⁻¹	49 ± 14	54 ± 17
Nitrogênio amoniacal	mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹	37 ± 11	45 ± 15
Nitrito	mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹	0,1 ± 0,6	0,2 ± 0,6
Nitrato	mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,6
Fósforo total	mg P _T L ⁻¹	6 ± 2	6 ± 2
Fosfato	mg P-PO ₄ ³⁻ L ⁻¹	4 ± 2	4 ± 2

*Média ± Desvio Padrão; DQO – Demanda química de oxigênio; DBO_{5,20} – Demanda Bioquímica de Oxigênio após 5 dias em temperatura de 20 °C.

Após a amostra (licor misto + água) passar nas peneiras, as partículas retidas em cada uma delas eram 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 ($D < 212$ (μm); $212 < D$ (μm) < 300 ; $300 < D$ (μm) < 400 ; $400 < D$ (μm) < 600 e $D > 600$ (μm)) representava em função da biomassa total da amostra.

- Índice Volumétrico do Lodo

O índice volumétrico do lodo (IVL) foi determinado semanalmente seguindo a metodologia 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 e 30 min de sedimentação em uma proveta graduada de 1 L, e calculado conforme a equação 1.

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

Equação 1

Onde:

$IVL_{5,30}$ = Índice Volumétrico de Lodo (mL g^{-1} SST);

$H_{5,30}$ = 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 em suspensão totais da amostra (mg L^{-1});

10^6 = Fator de conversão de miligrama para grama e de litro para mililitro.

- Morfologia

O acompanhamento da formação e da morfologia dos grânulos também foi realizado semanalmente, por meio da utilização de microscópio ótico (marca Olympus BX-41).

No intuito de observar a microestrutura dos grânulos também foi efetuada análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para análise foram selecionados grânulos do licor misto dos dias correspondentes a granulação completa em ambas as estratégias. Os grânulos foram previamente fixados com glutaraldeído (2,5%), e após 2 h em refrigeração (4°C) foram desidratados em banho sucessivos de etanol 50, 70 e 100%. Para a obtenção das micrografias,

as amostras foram fixadas em suportes de alumínio (*stubs*) com cola de prata, posteriormente metalizadas com ouro e analisadas no equipamento JEOL JSM-6390LV.

- Substâncias poliméricas extracelulares (EPS)

As EPS foram extraídas semanalmente a partir de um volume de 5 mL de amostras do licor misto (fim da aeração) do reator piloto, sob condições alcalinas ($\text{pH} > 10$) pela adição de 5 mL de NaOH a 1 mol L^{-1} e alta temperatura (30 min a $80 \text{ }^\circ\text{C}$), seguido de sonicação (5 min a 55 kHz) (TAY; LIU; LIU, 2001c). Para este estudo foi determinado que as EPS compreendiam as frações de polissacarídeos e proteínas. O teor de polissacarídeos (PS) foi determinado como equivalente de glicose usando o método fenol-sulfúrico de acordo com Dubois et al. (1956), enquanto que a fração de proteínas (PN) foi mensurada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

- Polihidroxibutiratos (PHB)

O metabolismo de vários organismos, incluindo os acumuladores de fósforo (PAO) e de glicogênio (GAO), envolve a assimilação de fontes de carbono na forma de ácidos graxos voláteis e a transformação em reservas energéticas em polihidroxialcanoatos (PHA) intracelulares. Dependendo do substrato utilizado e do metabolismo do microrganismo, diferentes polímeros e copolímeros podem ser obtidos. O polihidroxibutirato (PHB) foi definido para essa pesquisa como o polímero para caracterizar o armazenamento e o consumo dos PHA. Partiu-se do pressuposto que quando o acetato é o substrato mais abundante, os organismos armazenam até 90% dos PHA como PHB (QUINES et al., 2015; SMOLDERS et al., 1994).

A análise de PHB foi realizada de acordo com metodologia proposta por Karr; Waters e Emerich (1983), a qual baseia-se na medição do ácido crotônico que é formado pela catálise ácida durante a despolimerização química do PHB. Para o procedimento, 20 mg de licor misto, previamente liofilizado, foi ressuspensionado em 2 mL de H_2SO_4 concentrado (98%). Os tubos de ensaio (10 mL) contendo a suspensão foram inseridos no bloco digestor a uma temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos e em seguida resfriados em banho de gelo por aproximadamente 10 minutos. Essas amostras foram diluídas em proporção 1:3 com solução de H_2SO_4 5 mM. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose ($0,45 \text{ } \mu\text{m}$) e

injetadas no HPLC. A coluna analítica utilizada foi de exclusão iônica Aminex® HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm (D.I) x 9,8 µm da Bio-Rad.

3.1.3.2 Análises Físico-Químicas

Análises periódicas (semanais) da concentração de sólidos, compostos carbonáceos, nitrogenados e fosfatados foram realizadas a fim de monitorar o desempenho do reator. As amostras do esgoto sanitário (afluente) e do efluente do sistema foram avaliadas em termos de sólidos suspensos totais (SST), DBO₅, DQO total (DQO_T), nitrogênio total (N_T) e fósforo total (P_T). Para determinação dos compostos solúveis, as amostras foram filtradas usando filtro de acetato de celulose (0,45 µm) e analisadas em termos DQO solúvel (DQO_S) e nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺). A detecção de ânions como nitrito (N-NO₂⁻), nitrato (N-NO₃⁻) e fosfato (P-PO₄⁻³) foi medida por cromatografia iônica (Dionex Corporation, EUA), para tal as amostras foram previamente filtradas em filtro de acetato de celulose de 0,22 µm. Na Tabela 2 está apresentada a síntese das análises e os respectivos métodos empregados para essa etapa do estudo.

3.1.3.3 Análises microbiológicas

A avaliação da comunidade microbiana do sistema foi realizada por meio de técnicas de biologia molecular: sequenciamento de nova geração e *FISH* (do inglês *fluorescence in situ hybridization*). Para ambas as análises, foram coletadas alíquotas de 1,5 mL (em duplicatas) do lodo sedimentado e homogeneizado após o ensaio de IVL. Para a análise de sequenciamento as amostras foram armazenadas a -20 °C e as alíquotas destinadas ao FISH foram estocadas por no máximo 24 horas em geladeira, até serem fixadas.

O sequenciamento de nova geração foi realizado por meio da extração do DNA genômico de cinco amostras de cada estratégia, utilizando o Kit de extração *DNA MoBio Power Soil TM* (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. O preparo das bibliotecas para a identificação das bactérias seguiu o protocolo da Neopropecta Microbime Technologies, Brasil. A amplificação da região V3/V4 do gene 16 rRNA foi efetuada com primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG; QIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (CAPORASO et al., 2012). As bibliotecas foram sequenciadas por meio do MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300

ciclos e sequenciamento single-end. Todas as leituras foram submetidas individualmente a um filtro de qualidade baseado na soma dos erros de probabilidades das bases do DNA, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina foram removidas. As sequências resultantes que apresentaram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/clusters e utilizadas para identificação taxonômica usando o banco de dados Silva.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos e os respectivos métodos das análises.

Parâmetros físico-químicos	Métodos
Oxigênio dissolvido, pH e temperatura	Sonda multiparâmetros (<i>Environmental Monitoring Systems</i> – YSI pro 1020)
Sólidos Suspensos Totais (SST), Voláteis (SSV) e Fixos (SSF)	Método gravimétrico em membrana de fibra de vidro (0.60 µm). SM* 2540
Demanda Química de Oxigênio (DQO _T e DQO _S)	Método colorimétrico de refluxo fechado. Leitura em espectrofotômetro HACH®, modelo DR-4000. SM* 5220D
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ₅)	Método manométrico com incubação de 5 dias a 20°C (em base agitadora HACH®, modelo BOD-TRACK).SM* 5210D
Nitrogênio Amoniacal (N-NH ₄ ⁺)	Método do salicilato com cianureto- kit Hach (731)
Nitrogênio Total (N _T)	Método da digestão com persulfato- kit Hach (822)
Nitrito (N-NO ₂ ⁻), Nitrato (N-NO ₃ ⁻) e Fosfato (P-PO ₄ ³⁻)	Cromatografia Iônica (DIONEX ICS-5000, Thermo Scientific). SM* 4110C

*SM = *Standard Methods* (AWWA, APHA, 2017).

No intuito de obter mais informações sobre os microrganismos ativos envolvidos nesse estudo, a análise de FISH foi realizada como complemento. A metodologia da análise de *FISH* pode ser dividida em três etapas: (i) fixação das amostras de biomassa em paraformaldeído 4%; (ii) hibridização das amostras com oligonucleotídeos marcados com fluóforos (chamados de sondas) com o rRNA complementar às sequências que se pretende identificar; e (iii) visualização em microscópio com fluorescência (AMANN, 1995). A etapa que compreende a

fixação das amostras (i) foi realizada semanalmente, e após a avaliação dos parâmetros físico-químicos foram selecionadas duas datas que compreendiam a granulação completa em ambas as estratégias para seguir com as etapas (ii) e (iii).

A técnica de FISH foi utilizada com o propósito de determinar a população microbiana relacionada à remoção de nitrogênio. As sondas específicas foram marcadas com CY3 e todas as células microbianas foram coradas com 1% 4,6-diamidino-2-phenilindol (DAPI), o qual foi utilizado como referência. As especificidades das sondas e suas respectivas sequências estão detalhadas na Tabela 3. Os detalhes das sondas estão disponíveis no site do Probase.

Tabela 3: Descrição das sondas utilizadas na detecção dos microrganismos presentes na biomassa pela técnica de FISH.

Sonda	Especificidade	Sequência (5' - 3')
EUB338I	Maioria das Eubactérias	GCT GCC TCC CGT AGG AGT
EUB338II	<i>Planctomycetales</i>	GCA GCC ACC CGT AGG TGT
EUB338III	<i>Verrucomicrobiales</i>	GCT GCC ACC CGT AGG TGT
PAO _{MIX} (462 ¹ +651 ² +846 ³)	Maioria dos membros Candidatus <i>Accumulibacter</i>	¹ -CCG TCA TCT ACW CAG GGT ATT AAC ² - CCC TCT GCC AAA CTC CAG ³ - CCC TCT GCC AAA CTC CAG
GAO _{MIX} (431 ⁴ +989 ⁵)	Maioria dos membros Candidatus " <i>Competibacter phosphatis</i> "	⁴ -TCC CCG CCT AAA GGG CTT ⁵ -TTC CCC GGA TGT CAA GGC
NSO190	Oxidadoras de amônia β -Proteobacteria	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C
Ntspa662	<i>Nitrospira</i>	GGA ATT CCG CGC TCC TCT
PAE997	<i>Pseudomonas spp.</i>	TCT GGA AAG TTC TCA GCA

Além da detecção dos microrganismos, a análise de FISH foi utilizada também para avaliação da distribuição espacial nos grânulos dos microrganismos envolvidos na nitrificação. Para tal, foi realizada hibridização mista nas amostras, com sondas de NSO190, Ntspa662 e EUB_{MIX} (EUB338I, EUB338II e EUB338III). Os grânulos foram selecionados a partir das amostras do licor misto, fixados e incorporados em Tissue-Tek® O.C.T. Os cortes transversais

com 20 μm de espessura foram realizados em criostato (CM 1850, Leica, Alemanha) a -40°C pertencente ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC. As bactérias totais foram hibridizadas com a sonda EUB_{MIX} marcada com o fluóforo CY5, como referência, e os oligonucleótidos específicos para NSO190 e Ntspa662 foram marcados com os fluóforos CY3 e Fluorescein dT, respectivamente.

3.1.4 Tratamento dos dados

O software Microsoft Excel® foi utilizado para descrever, analisar e interpretar os dados numéricos das amostras coletadas ao longo do período de monitoramento. Na análise exploratória dos dados, utilizou-se a estatística descritiva (valores de média, desvio padrão), para a análise inicial dos dados. O software OriginPro 2017 foi utilizado na construção dos gráficos ao longo do tempo, dessa forma, possibilitou uma análise geral da variabilidade dos dados coletados.

Além da análise descritiva dos dados, para essa etapa do estudo foram aplicadas técnicas de controle estatístico multivariado de processo, do inglês *Multivariate Statistical Process Control* (MSPC), utilizando o software Statistica 7.0 (STATSOFT, Inc.). De acordo com Montgomery (2009), a MSPC tem como principal objetivo monitorar o desempenho de processos ao longo do tempo e detectar eventos incomuns que exerçam influência nas propriedades determinantes da qualidade do produto final, neste caso a estabilidade de operação do sistema. Em um primeiro momento, foi realizada a análise de componentes principais (ACP) para o conjunto de dados formado a partir do número de observações (37) em cada estratégia. A ACP é uma técnica da estatística multivariada que consiste em realizar uma combinação linear de um conjunto de dados composto por diferentes variáveis numéricas, isto é alta dimensionalidade de representação. A ACP, portanto reduz o número de variáveis ao eliminar informações não correlatas entre os dados, mantém a máxima variabilidade dos dados originais no intuito de observar com mais clareza tendências, padrões e/ou *outliers* do conjunto de dados (COSTA; ALVES; FERREIRA, 2009). Dessa forma, a ACP fornece uma aproximação de um conjunto de dados em um espaço modelado de menor dimensão trazendo duas matrizes em resposta: a matriz de *scores* e a matriz de *loadings*.

Os *scores* fornecem a composição das componentes principais (CP) em relação às amostras, enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Traçando-se as colunas da matriz de *scores* na direção das componentes principais, gera-se um

gráfico chamado *scores plot*, onde a relação entre as observações é exibida e assim clusters podem ser identificados. Similarmente, a interpretação geométrica dos valores dos *loadings* em um gráfico de duas dimensões (CP1 x CP2) é denominada *loading plot*, onde a relação entre as variáveis é mostrada (COSTA; ALVES; FERREIRA, 2009; LEITE et al., 2018).

Uma vez que o modelo ACP foi realizado, os gráficos de controle de Hotelling T^2 foram configurados para detectar *outliers* multivariados, desvios médios e outros desvios de distribuição do esquema em controle. O gráfico de controle de Hotelling T^2 é a versão multivariada da estatística t-Student, baseado em estimativas amostrais da matriz de covariância. Neste caso, a estabilidade e o controle de operação do reator biológico são definidos pelo vetor do valor médio de todas as variáveis medidas. Um ponto fora dos limites do controle é interpretado como evidência de que o processo está fora de controle (MONTGOMERY, 2009). Os limites superiores de controle (LSC), foram determinados usando níveis de confiabilidade de 95% para cálculos de limites de T^2 (MONTGOMERY, 2009).

Apesar do gráfico de controle T^2 de Hotelling ser uma técnica muito útil para que sejam monitoradas simultaneamente várias características de qualidade dos processos, a estatística T^2 indica que um processo está fora de controle estatístico, porém não gera informação sobre qual variável ou conjunto de variáveis está influenciando para tal comportamento. Dessa forma, os pontos fora do controle foram detalhados por meio da decomposição T^2 , possibilitando definir quais variáveis deslocaram o sistema para fora da estabilidade (MASON; TRACY; YOUNG, 1996).

As variáveis escolhidas para a aplicação da MSPC foram: concentração de sólidos suspensos voláteis no reator (SSV), razão IVL_{30} / IVL_5 (IVL), altura da cama de lodo no reator (ACL), carga orgânica particulada (COP) e solúvel (COS), velocidade de remoção específica de DQO na fase de enchimento (ANQS) e durante a aeração (AEQS), velocidade específica observada de crescimento de biomassa (μ OBS) e a fração de partículas com diâmetro acima de $212 \mu\text{m}$ ($D > 212$). Os dados referentes SSV, IVL, μ OBS e $D > 212$ foram coletados no final da fase de aeração, enquanto COP e COS foram calculados com base na concentração de DQO do afluente do sistema e a vazão de enchimento em ambas as estratégias. As concentrações iniciais ($t = 0$) para os cálculos da ANQS foram baseadas em concentrações teóricas se o reator fosse alimentado de uma só vez, ao invés de fluxo em pistão ao longo de 90 min. AEQS foi calculada a partir das concentrações reais medidas no fim da fase de enchimento e da saída do reator (efluente tratado) e a ACL foi estimada a partir da extrapolação dos valores IVL_{30} , considerando

o mesmo tempo de sedimentação configurado no reator. Dessa forma, foi possível envolver parâmetros de operação do sistema e bem como características da biomassa. A distribuição normal foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para garantir a aplicabilidade do teste de hipóteses estatísticas ao longo do estudo.

3.1.5 Cálculos

3.1.5.1 Vazão diária de esgoto (Q_d)

$$Q_d = n_c \times V_e$$

Equação 2

Onde:

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

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

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

3.1.5.2 Carga volumétrica (CV) e relação Alimento/Microrganismo (A/M)

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

Equação 3

Onde:

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

C_{afluente} é a concentração de DQO, $N-NH_4^+$ ou P_T no afluente ($mg\ L^{-1}$),

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

V_r é o volume útil do reator (L).

Para o cálculo da relação alimento/microrganismo (A/M) utilizou-se a carga volumétrica aplicada por dia e a concentração de biomassa no reator ($mg\ DQO$ ou $N-NH_4^+$ ou $P_T\ g^{-1}SSV\ d^{-1}$), conforme equação 4.

$$A/M = \frac{CV}{X_{SSV}}$$

Equação 4

Onde:

CV é a carga volumétrica aplicada por dia (mg DQO ou N-NH₄⁺ ou P_T L⁻¹ d⁻¹),

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

3.1.5.3 Velocidade superficial ascensional de ar (*V_{ar}*)

$$V_{ar} = \frac{Q_{ar}}{A_b} \times 100$$

Equação 5

Onde:

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

Q_{ar} é a vazão de ar aplicada (m³ s⁻¹),

A_b é a área da base do reator (m²).

3.1.5.4 Velocidade ascensional do afluente (*V_{afluente}*)

$$V_{afluente} = \frac{Q_e}{A_b}$$

Equação 6

Onde:

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

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

A_b é a área da base do reator (m²).

3.1.5.5 Velocidade de remoção específica de substrato (*q_{DQO, NH₄ PO₄}*)

$$q_{DQO, NH_4 PO_4} = \frac{(C_i - C_e) V_e / t_c}{V_r X_{SSV}}$$

Equação 7

Onde:

q_{DQO, NH_4, PO_4} é a velocidade de remoção específica de substrato (mg DQO ou N-NH₄⁺ ou P-PO₄³⁻ d⁻¹ g⁻¹SSV),

C_i é a concentração afluente de substrato (mg DQO ou N-NH₄⁺ ou P-PO₄³⁻ L⁻¹),

C_e é a concentração efluente de substrato (mg DQO ou N-NH₄⁺ ou P-PO₄³⁻ L⁻¹),

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

t_c é o tempo de um ciclo operacional do reator (d),

V_r é o volume útil do reator (L),

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

3.1.5.6 Tempo de Retenção de Sólidos (TRS)

$$TRS = \frac{X_{SSV} \times V_R}{(X_d V_d + X_e V_e) / t_c}$$

Equação 8

Onde:

TRS = Tempo de retenção de sólidos ou idade do lodo (dia);

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

V_r é o volume útil do reator (L),

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

V_d é o volume do descarte manual (L),

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

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

t_c é o tempo de um ciclo operacional (d).

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

A velocidade específica observada de crescimento da biomassa μ_{obs} (d⁻¹) é inversamente relacionada com o tempo de retenção de sólidos. Assim, o coeficiente μ_{obs} foi determinado utilizando-se a equação 9.

$$\mu_{obs} = \frac{1}{TRS}$$

Equação 9

3.1.5.8 Constante de meia-saturação observada (K_{Sobs})

A constante de meia-saturação observada (K_{Sobs}) ($\text{mg DQO}_S \text{ L}^{-1}$) é a concentração de substrato na qual a velocidade de crescimento corresponde à metade do $\mu_{\text{máx}}$. De acordo com o gráfico Lineweaver-Burk (ou gráfico duplo recíproco), K_{Sobs} pode ser obtido plotando $1/\mu_{\text{obs}}$ versus $1/C_i$, com uma inclinação de $K_{Sobs} / \mu_{\text{máx}}$ e interceptação do eixo y de $1/\mu_{\text{máx}}$, conforme apresentado na equação 10.

$$\frac{1}{\mu_{\text{obs}}} = \frac{K_{Sobs}}{\mu_{\text{máx}}} \times \frac{1}{C_i} + \frac{1}{\mu_{\text{máx}}}$$

Equação 10

Onde:

$\mu_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima de crescimento específico da biomassa (d^{-1});

C_i é a concentração de substrato no afluente ($\text{mg DQO}_S \text{ L}^{-1}$).

3.1.5.9 Velocidade de decaimento específico da biomassa (k_d)

A velocidade de decaimento específico da biomassa (k_d) (d^{-1}) foi obtida plotando μ_{obs} versus q_{obs} , com uma inclinação de Y e interceptação do eixo y de k_d a partir da equação 11.

$$\mu_{\text{obs}} = Y \times q_{\text{obs}} - k_d$$

Equação 11

Onde:

Y é o coeficiente de produção teórico de biomassa ($\text{gSSV g}^{-1}\text{DQO}_S$);

q_{obs} velocidade de remoção específica de substrato ($\text{g DQO}_S \text{ g}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$).

3.1.5.10 Velocidade específica de hidrólise de material particulado (q_H)

O processo da hidrólise torna disponível o substrato de difícil biodegradabilidade, ou seja, o particulado (X_s), contido no afluente (GUJER et al., 1999). A velocidade específica de hidrólise de material particulado foi calculada utilizando a equação 12.

$$q_H = k_H \times \frac{X_S/X_H}{K_X + X_S/X_H} \times X_H$$

Equação 12

Onde:

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

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

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

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

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

A constante da velocidade da hidrólise (k_H) é variável com a temperatura e foi calculada de acordo com a equação 13.

$$K_H(T) = k(20^\circ\text{C}) \times e^{(\theta_T \times (T - 20^\circ\text{C}))}$$

Equação 13

Onde:

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

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

Equação 14

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

3.1.5.11 Tempo de contato de hidrólise (t_H)

$$t_H = \frac{X_S/V_r}{q_H}$$

Equação 15

Onde:

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

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

V_r é o volume do reator (L),

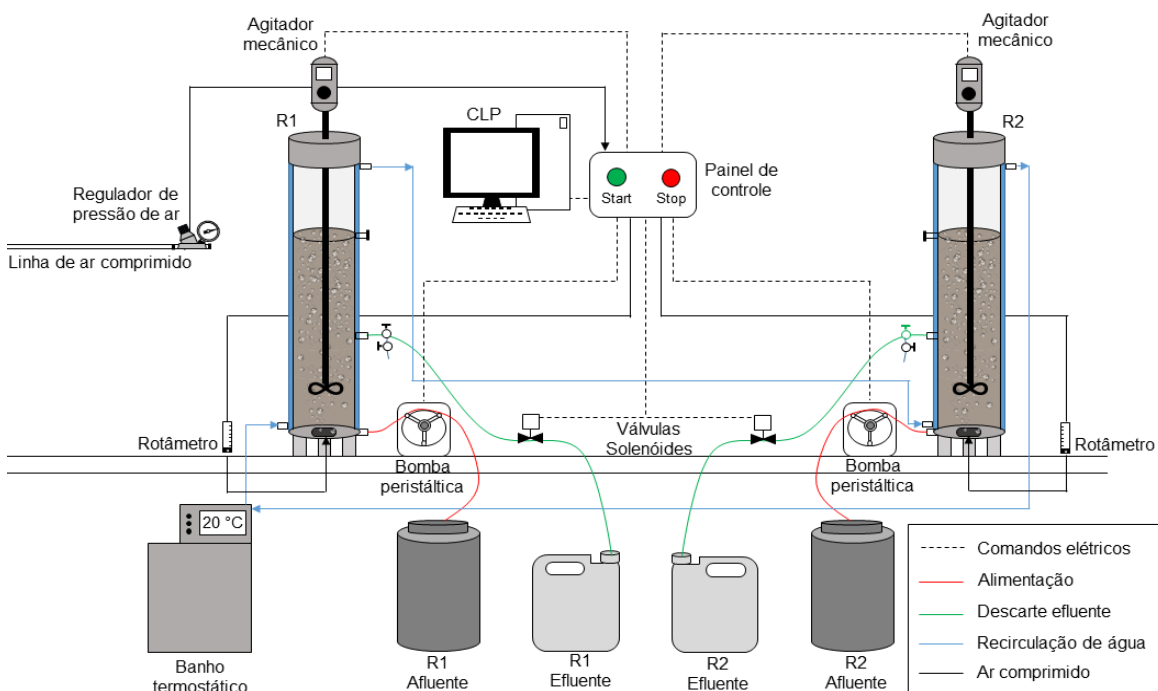
q_H é a velocidade específica da hidrólise do material particulado ($\text{g } X_S \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

3.2 SISTEMA EXPERIMENTAL II

3.2.1 Configuração do sistema experimental

O sistema experimental II foi construído e instalado nas dependências do Laboratório de Processos de Separação e Reação - Laboratório de Catálise e Materiais (LRSE-LCM) no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal. Para essa etapa da pesquisa optou-se por utilizar efluente sintético, a fim de controlar as condições operacionais do sistema, avaliando a influência das diferentes relações C:N, bem como a complexidade da fonte orgânica do substrato no desenvolvimento da biomassa granular. A representação esquemática da configuração do sistema está apresentada na Figura 9.

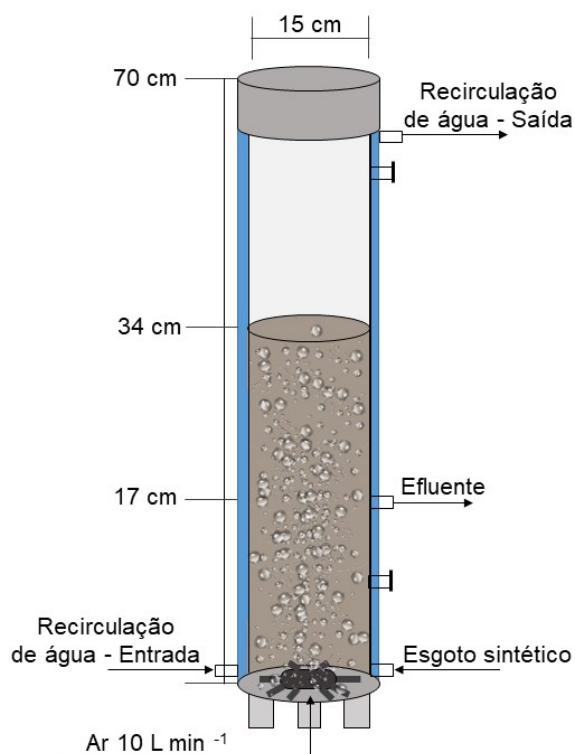
Figura 9: Representação esquemática da configuração experimental do sistema experimental (SE-II).



Fonte: Próprio autor

O efluente sintético era bombeado através de duas bombas peristálticas análogas (Watson-Marlow, modelo 120S/DV) a partir de dois reservatórios de 120 L para o dentro dos reatores. Os dois reatores (R1 e R2) em escala bancada foram construídos em acrílico transparente com parede dupla apresentando as seguintes dimensões: altura total de 70 cm e 15 cm de diâmetro interno. A altura do líquido dentro do reator foi de 34 cm, resultando em um volume útil de 6,0 L e relação altura diâmetro (H/D) de 2,3. Outros detalhes das dimensões dos reatores estão apresentados na Figura 10. De forma a controlar a temperatura dentro do sistema, o banho termostático com recirculação foi ajustado para 20°C. A linha de ar comprimido atravessava 8 difusores (pedra porosa, modelo AS-1) distribuídos de forma uniforme na base dos reatores. O sistema de aeração era composto ainda por válvulas reguladoras de pressão, válvulas solenoides e rotâmetro, de forma a controlar a vazão de ar inserida do sistema. No final de cada ciclo, o efluente tratado era coletado em dois reservatórios de 50 L, e descartado diariamente. O controle de cada fase do ciclo, bem como o acionamento dos equipamentos, foi automatizado por meio de um controlador lógico programável (Delta modelo DVP-SS2), e um computador foi utilizado como interface gráfica do sistema.

Figura 10: Dimensões esquemáticas (esquerda) e fotografia (direita) dos reatores em escala de bancada (SE-II).



Fonte: Próprio autor

3.2.2 Operação do sistema

Os reatores operaram em paralelo com regime de bateladas sequenciais. De forma a complementar os estudos desenvolvidos na primeira etapa desse estudo (SE-I), optou-se por manter os tempos das fases dos reatores o mais próximo possível: enchimento ascensional (90 min), reação aeróbia (240 min), período de sedimentação (25 min) e descarte de efluente tratado (5 min). Porém, diferente do SE-I, os reatores apresentavam volume variável, ou seja, no fim de cada batelada as válvulas solenoides eram acionadas e o efluente tratado escoava por gravidade sendo recuperado nos respectivos galões, conforme apresentado na Figura 9.

Os reatores foram alimentados em fluxo ascendente com uma vazão de $0,034 \text{ L min}^{-1}$ e operaram com troca volumétrica de 50%. No instante em que o enchimento iniciava, dois agitadores mecânicos idênticos (VWR, modelo - VOS Power Control) posicionados dentro de cada um dos reatores eram acionados e permaneciam em agitação (50 min^{-1}) durante os 90 min de alimentação. Além do enchimento lento, a agitação proposta durante esta fase tinha como objetivo favorecer o contato entre biomassa e substrato, para assegurar o consumo completo do material orgânico antes de mudar para a aeração. De acordo com De Kreuk et al. (2007), essa configuração é pré-requisito para favorecer o desenvolvimento de organismos de crescimento lento e suprimir o crescimento de organismos heterotróficos ordinários (OHO).

O sistema operou sem controle de oxigênio dissolvido, ou seja, durante a fase de aeração foi mantida uma vazão constante de ar de 10 L min^{-1} para cada reator, correspondendo a uma velocidade superficial do gás de $0,94 \text{ cm s}^{-1}$.

Os dois reatores foram inoculados simultaneamente com 3 L de lodo ativado a $2,2 \text{ gSSV L}^{-1}$ de uma estação de tratamento esgoto da cidade do Porto, Portugal, e operados por 152 dias consecutivos. As relações C:N do efluente sintético foram estabelecidas em 5 para reator 1 (R1) e 10 para reator 2 (R2). A escolha destas razões foi baseada na literatura, que de acordo Zhang et al. (2018), os valores típicos para esgoto sanitário são entre 10,5-12,5. No entanto, em estudos prévios desenvolvidos no Brasil foi constatado que a C:N pode apresentar valores menores, variando entre 3 e 5 (GUIMARÃES et al., 2018; XAVIER et al., 2018). Dessa forma, a DQOs foi estipulada em 300 mg L^{-1} e o nitrogênio amoniacal em 60 e $30 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ para R1 e R2, respectivamente.

Além da influência da razão C:N, o estudo foi dividido em duas fases diferenciadas em relação ao substrato orgânico adicionado ao efluente sintético. Durante a fase I (1 - 84 dias), o sistema operou com 100% de ácidos graxos voláteis (AGV) como fonte de carbono (1/2 acetato

e 1/2 propionato), nomeado de efluente simples. Durante o período de 85 a 152 dias (fase II) o meio sintético foi definido como complexo, pois 50% da DQO era constituída AGV e 50% por substratos fermentáveis solúveis (glicose e aminoácidos), fracionados em 1/4 acetato, 1/4 propionato, 1/4 glicose e 1/4 aminoácidos. Os aminoácidos foram compostos por L-alanina, L-arginina, ácido L-aspartico, ácido L-glutâmico, L-leucina, L-prolina e glicina em iguais equivalentes de DQO (LAYER et al., 2019). Na Tabela 4 é apresentada a composição detalhada dos efluentes simples e complexo, que alimentaram os reatores nas duas fases da pesquisa.

3.2.3 Monitoramento do sistema

No intuito de acompanhar a evolução do sistema, amostras do efluente sintético, licor misto (início e fim da aeração), bem como do efluente tratado foram coletadas semanalmente em ambos os reatores. Além disso, amostras ao longo das 6 horas de ciclo (distribuídas em 15 pontos) também foram analisadas, em intervalo variando entre 15 e 60 min, após 49 dias de funcionamento em cada fase do estudo, com objetivo de avaliar as conversões de substratos em ambos os reatores.

3.2.3.1 Caracterização da Biomassa

A distribuição do tamanho das partículas foi obtida semanalmente pelo método de peneiramento (BIN et al., 2011), da mesma forma que o SE-I (Seção 3.1.3.1). Porém para essa etapa do estudo foram selecionadas peneiras com abertura da malha de 850 μm , 500 μm e 200 μm . O acompanhamento da formação dos grânulos também foi sustentado pela visualização em microscópio óptico (Optika B-69, Itália), no intuito de obter informações quanto a morfologia dos agregados. Além disso, a capacidade de sedimentação do lodo foi determinada por meio do índice volumétrico de lodo (IVL), medido após 5 e 30 minutos de sedimentação da biomassa (IVL₃₀ e IVL₅) (SCHWARZENBECK; ERLEY; WILDERER, 2004).

A extração da matriz EPS também foi realizada semanalmente, porém para essa etapa do estudo priorizou-se a distribuição das EPS nas camadas dos grânulos. Nesse sentido, foi avaliado as EPS que estão na superfície dos grânulos e por isso tem maior facilidade de perder a ligação com as células (do inglês *loosely bound EPS* - LB-EPS) e as que estão estreitamente ligadas no interior dos agregados (do inglês *tightly bound EPS* - TB-EPS) (LI; YANG, 2007).

Tabela 4: Composição detalhada dos efluentes simples e complexo nos reatores (R1 e R2) em ambas as fases operacionais.

	Fase I		Fase II	
	(Efluente simples)		(Efluente complexo)	
	R1	R2	R1	R2
DQOs (mg L⁻¹)	300	300	300	300
Acetato de Sódio (mg L ⁻¹)	192,3	192,3	96,1	96,1
Propionato de Sódio (mg L ⁻¹)	128,7	128,7	64,3	64,3
Glicose (mg L ⁻¹)	-	-	70,3	70,3
Alanina (mg L ⁻¹)	-	-	9,9	9,9
Arginina (mg L ⁻¹)	-	-	10,6	10,6
Ácido Aspártico (mg L ⁻¹)	-	-	14,8	14,8
Ácido Glutâmico (mg L ⁻¹)	-	-	10,9	10,9
Glicina (mg L ⁻¹)	-	-	16,7	16,7
Leucina (mg L ⁻¹)	-	-	5,8	5,8
Prolina (mg L ⁻¹)	-	-	6,9	6,9
Nitrogênio amoniacal (mg N-NH₄⁺ L⁻¹)	60	30	60	30
NH ₄ Cl (mg L ⁻¹)	229,5	114,7	229,5	114,7
Fósforo (mg P-PO₄³⁻ L⁻¹)	7	7	7	7
K ₂ HPO ₄ (mg L ⁻¹)	23,6	23,6	23,6	23,6
KH ₂ PO ₄ (mg L ⁻¹)	12,3	12,3	12,3	12,3
Nutrientes				
MgSO ₄ · 7H ₂ O (mg L ⁻¹)	70	70	70	70
KCl (mg L ⁻¹)	30	30	30	30
CaCl ₂ (mg L ⁻¹)	60	60	60	60
Elementos traços				
*C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O (mg L ⁻¹)	50	50	50	50
*ZnSO ₄ · 7H ₂ O (mg L ⁻¹)	22	22	22	22
*MnCl ₂ · 6H ₂ O (mg L ⁻¹)	5,1	5,1	5,1	5,1
*FeSO ₄ · 7H ₂ O (mg L ⁻¹)	5,0	5,0	5,0	5,0
*(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O (mg L ⁻¹)	1,1	1,1	1,1	1,1
*CuSO ₄ · 5H ₂ O (mg L ⁻¹)	1,8	1,8	1,8	1,8
*CoCl ₂ · 6H ₂ O (mg L ⁻¹)	1,6	1,6	1,6	1,6

*Solução preparada de acordo com Vishniac e Santer (1957).

A extração da matriz EPS foi realizada de acordo com Li e Yang (2007), a qual se baseia em alta temperatura e a utilização de solução salina (NaCl 0,05%). Para tal, 10 mL do licor misto, coletado no fim da aeração em cada um dos reatores, foi desidratado por centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi então ressuspensão com

a solução de NaCl 0,05% até seu volume original de 10 mL. A solução de NaCl foi pré-aquecida a 70 ° C para garantir que a suspensão da biomassa atingisse uma temperatura imediata de 50 °C. A amostra contendo biomassa e a solução salina foi cisalhada em vortex (6PRO, RSLab), por 1 min, seguido por centrifugação a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e definido como LB-EPS.

Para a extração do TB-EPS, o *pellet* foi novamente ressuspensão com a solução salina de NaCl 0,05% até seu volume original de 10 mL. A suspensão foi agitada no vortex por 1 min, aquecida a 80 ° C em banho-maria por 30 min, e submetida a centrifugação a 4000 rpm por 15 min. E por fim, o sobrenadante coletado foi considerado a extração de TB-EPS. Ambas as extrações LB-EPS e TB-EPS foram analisadas em triplicatas para polissacarídeos (PS) e proteínas (PN). As metodologias de quantificação de PS e PN seguiram as mesmas aplicadas no SE-I, nas quais polissacarídeos foram determinados como equivalentes de glicose usando o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), enquanto a fração de proteína foi baseada no método de Lowry, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão (LOWRY et al., 1951).

3.2.3.2 Análises Físico-Químicas

O desempenho dos dois reatores foi avaliado semanalmente por meio de análises físico-químicas seguindo em sua maioria metodologias propostas pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AWWA, APHA, 2017). Os parâmetros analisados e as metodologias empregadas estão sumarizadas na Tabela 5.

Amostras do efluente sintético que alimentava cada reator, bem como alíquotas do início da aeração (91 min de ciclo) e efluente tratado foram filtradas utilizando filtro de poliamida (0,45 µm) para a determinação dos compostos solúveis, como DQO solúvel e os íons. As concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺), nitrito (N-NO₂⁻), nitrato (N-NO₃⁻) e fosfato (P-PO₄⁻³) foram analisados por cromatografia iônica (Dionex Corporation, EUA), enquanto o nitrogênio total foi determinado utilizando kit colorimétrico, com leituras em espectrofotômetro (Merck-Lange, Alemanha).

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos e os respectivos métodos das análises empregados no SE-II.

Parâmetros físico-químicos	Métodos
Oxigênio dissolvido e temperatura	Sonda multiparâmetro (HQ40D, Hach)
pH	Sonda multiparâmetros (HI2020, Hanna Instruments)
Sólidos Suspensos Totais (SST), Voláteis (SSV) e Fixos (SSF)	Método gravimétrico em membrana de fibra de vidro (0.60 μ m). SM* 2540
Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQO _s)	Método colorimétrico de refluxo fechado. Leitura em espectrofotômetro MERCK®, Spectroquant® Prove 300. SM* 5220D
Nitrogênio Total (N _T)	Método da digestão com persulfato com kit Merck (HC996034), seguido da determinação de nitrato também com kit Merck (HC992294).
Nitrogênio Amoniacal (N-NH ₄ ⁺),	Cromatografia Iônica (Dionex™ DX-120, Thermo Scientific).
Nitrito (N-NO ₂ ⁻), Nitrato (N-NO ₃ ⁻) e Fosfato (P-PO ₄ ³⁻)	Cromatografia Iônica (Dionex™ ICS-2100, Thermo Scientific). SM* 4110C

*SM- Standard Methods

3.2.3.3 Análises microbiológicas

Para essa etapa do estudo a comunidade microbiana foi avaliada somente pela técnica do sequenciamento de nova geração. Para tal, alíquotas de 10 mL do lodo sedimentado após o ensaio de IVL foram coletadas ao longo do estudo e armazenadas a -20 °C. Foram escolhidas quatro amostras da Fase I e duas amostras da Fase II, totalizando 6 amostras para cada reator, e 12 amostras no total. As amostras foram submetidas a liofilização por 48 horas e armazenadas em frascos herméticos. Da mesma forma que o SE-I, o sequenciamento de nova geração foi realizado seguindo o protocolo Neopropecta Microbime Technologies, Brasil. Para a identificação das sequências resultantes também foi utilizado o banco de dados Silva, como descrito na Seção 3.1.3.3.

3.2.4 Tratamento dos dados

A análise descritiva foi utilizada para analisar e interpretar os dados numéricos das amostras coletadas em ambas as estratégias operacionais. A partir de tabelas e valores de média bem como desvio padrão obtidos no Microsoft Excel®, o software OriginPro 2017 foi utilizado na construção dos gráficos ao longo do tempo, possibilitando uma análise geral da variabilidade e a exploração dos dados coletados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

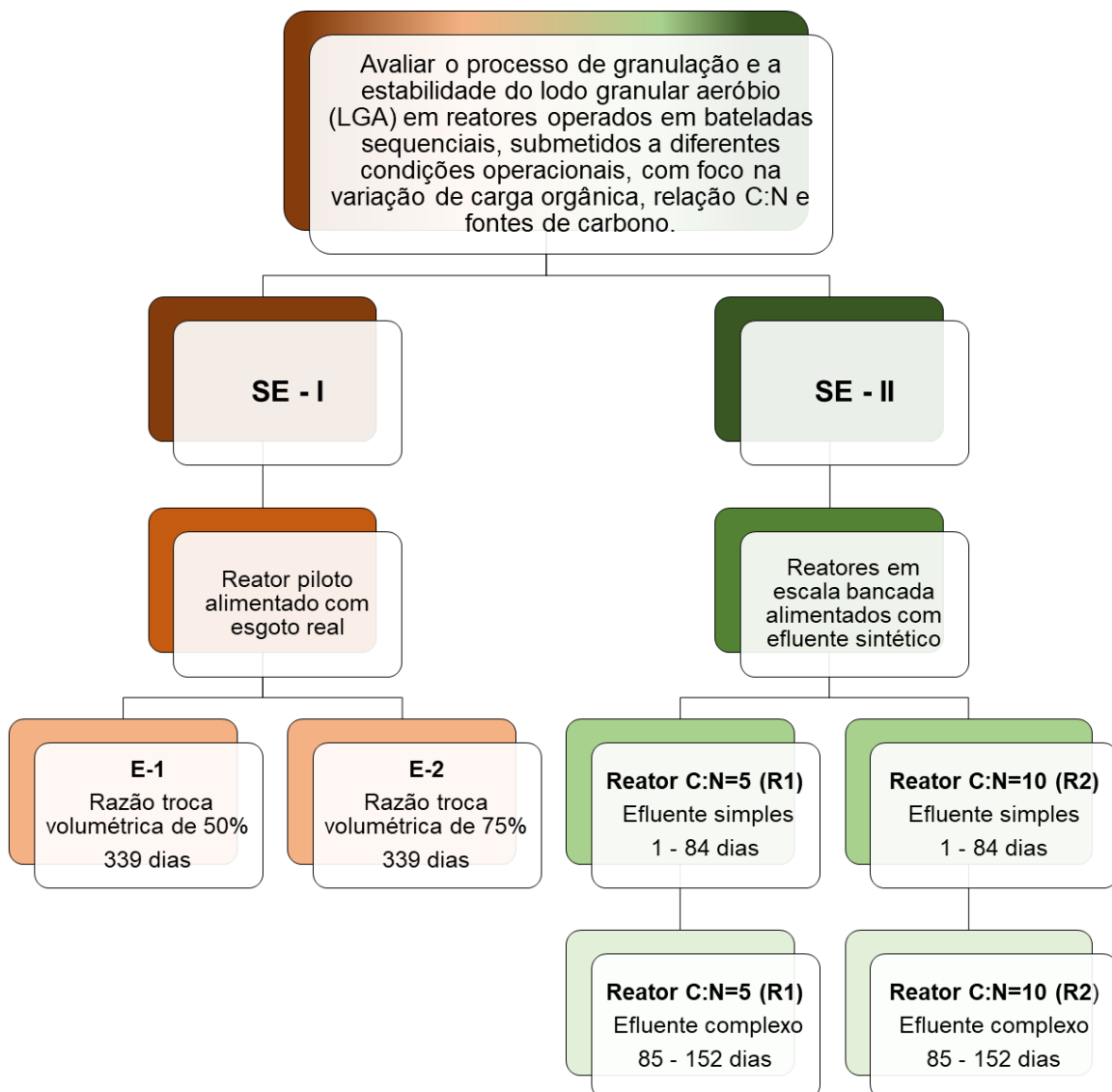
Os resultados desta pesquisa que serão apresentados foram subdivididos em dois itens, os quais se encontram em forma de artigos científicos, no entanto apenas os resultados e discussões bem como a conclusão destes estudos serão expostos nessas seções. Estes estudos foram necessários para confirmar as hipóteses e responder as perguntas desta tese. As pesquisas possuem a abordagem da granulação aeróbia, com o intuito de elucidar os fatores que contribuem para estabilidade no sistema bem como para as atividades biológicas.

O primeiro estudo desenvolvido no sistema experimental I (SE-I) (descrito na Seção 3.1 dos Materiais e Métodos) teve como objetivo a avaliação em longo prazo (> 650 dias) do processo de granulação e estabilidade do lodo granular aeróbio (LGA) em um reator ($1,0 \text{ m}^3$) operado em volume constante tratando esgoto sanitário. Para tal, duas relações de troca volumétrica (RTV) foram testadas (50 e 75%), no intuito de comparar a influência da carga orgânica volumétrica nas características e atividade da biomassa por meio do desempenho do sistema, concomitante à avaliação da ecologia microbiana. A novidade deste trabalho surgiu da combinação e discussão integrada, abrangendo os diferentes tópicos que envolvem o tratamento biológico de efluentes usando o sistema LGA, desde parâmetros físico-químicos e cinéticos até técnicas de biologia molecular. Além disso, o controle estatístico multivariado do processo, como modelos ACP combinados com gráfico de controle T^2 de Hotelling, foi utilizado a fim de avaliar a estabilidade do sistema e detectar comportamento não aleatório, uma vez que a variabilidade de um sistema só pode ser descrita em termos estatísticos.

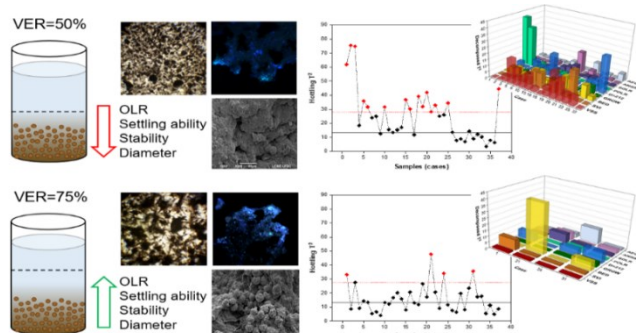
Por outro lado, a fim de obter respostas mais intrínsecas no comportamento do LGA sob diferentes substratos orgânicos, o objetivo do segundo estudo foi principalmente investigar o efeito da relação C:N nas características físico-químicas, como capacidade de sedimentação, morfologia dos agregados, incluindo composição da matriz EPS e a conversão de substratos. Além disso, foi avaliada a sucessão da comunidade microbiana, no intuito de validar o papel dos microrganismos no processo de granulação sob as diferentes condições aplicadas. A novidade nesta abordagem residiu no fato de que após 84 dias de funcionamento do sistema, o substrato orgânico em ambos os reatores foi alterado para uma fonte mais complexa, onde apenas 50% do carbono era composto de AGV (acetato e propionato) e os outros 50% de compostos orgânicos fermentativos (glicose e aminoácidos). Para essa etapa da pesquisa foi utilizado o sistema experimental II (SE-II) detalhado na seção 3.2 dos Materiais e Métodos. O fluxograma apresentado na Figura 11, esquematiza uma síntese da forma em que os sistemas

experimentais (SE) foram comparados a partir do objetivo geral desta tese, no intuito de gerar os estudos apresentados neste item.

Figura 11: Fluxograma que detalha os sistemas experimentais e as estratégias operacionais utilizados em cada estudo apresentado neste item.



4.1 COMO A RELAÇÃO TROCA VOLUMÉTRICA E A DISPONIBILIDADE DE CARBONO CONTRIBUEM PARA MELHORAR A ESTABILIDADE DO LODO GRANULAR EM RBS OPERADO EM VOLUME CONSTANTE TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO? ¹



Este trabalho avaliou o processo de granulação e a estabilidade do lodo granular aeróbio em um reator piloto (1 m³), em longo período de operação (> 650 dias) tratando esgoto sanitário de baixa carga. Duas estratégias operacionais, diferenciadas pela relação de troca

volumétrica (RTV= 50 e 75%), foram testadas permitindo maiores cargas orgânicas (COV) no sistema. Diferentes tópicos envolvendo o tratamento biológico de efluentes foram avaliados desde parâmetros físico-químicos e biocinéticos, bem como resultados de biologia molecular. Como a variabilidade do processo só pode ser descrita em termos estatísticos, o controle estatístico multivariado de processo foi aplicado no intuito de verificar e integrar os resultados encontrados. A granulação foi alcançada com sucesso em termos de sedimentabilidade (índice volumétrico de lodo - $IVL_{30} < 70 \text{ mL gSST L}^{-1}$ e $IVL_{30}/IVL_5 \sim 0,70$) e fração de grânulos (> 80%) quando o sistema operou com RTV de 75%. A análise multivariada corroborou que o aumento da RTV de 50 a 75% pode ser uma estratégia importante para a estabilidade de sistemas com lodo granular aeróbio (LGA), especialmente durante os períodos chuvosos onde a disponibilidade de carbono é menor ($COV < 0,4 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). Os compostos carbonados solúveis foram removidos principalmente durante a fase de enchimento (sem a presença de oxigênio dissolvido (OD)), no entanto, a presença de material particulado levou à hidrólise destes na fase aerada. A nitrificação foi observada em ambas as estratégias. *Nitrospira spp.* foi predominante quando o sistema foi submetido a menor RTV, enquanto *Nitrosomonas spp.* foi detectada no aumento da RTV. Embora a desnitrificação parcial e a baixa remoção de fósforo foram constatadas em ambas as estratégias operacionais, esses fatores poderiam ser aperfeiçoados, controlando o excesso de OD na fase de aeração, bem como melhorando a disponibilidade de substrato orgânico na fase de alimentação.

¹ Esse item gerou a seguinte publicação:

XAVIER, J. A., GUIMARÃES, L. B., MAGNUS, B. S., LEITE, W. R., VILAR, V. J., DA COSTA, R. H. How volumetric exchange ratio and carbon availability contribute to enhance granular sludge stability in a fill/draw mode SBR treating domestic wastewater? *Journal of Water Process Engineering*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101917>

HOW VOLUMETRIC EXCHANGE RATIO AND CARBON AVAILABILITY CONTRIBUTE TO ENHANCE GRANULAR SLUDGE STABILITY IN A FILL/DRAW MODE SBR TREATING DOMESTIC WASTEWATER?

This work evaluated the granulation process and the stability of aerobic granular sludge in a pilot-scale reactor (1 m³), during a long-term operation (> 650 days) treating real low-strength domestic wastewater. Two operational strategies, distinguished by volumetric exchange ratio (VER: 50 and 75%), were tested enabling higher organic loading rates. Different topics involving wastewater biological treatment was evaluated from physical-chemical and kinetic parameters to molecular biology techniques. Since process variability can only be described in statistical terms, multivariate statistical process control was applied to verify and integrate the results found. Successful granulation in terms of settling properties (Sludge volumetric index - SVI₃₀ < 70 mL gTSS L⁻¹ and SVI₃₀/SVI₅ ~ 0.70) and granules fraction (>80%) were achieved when applying VER = 75%. Multivariate analysis supported that an increment in VER from 50 to 75% is an important strategy for AGS stability, especially during rainy periods where the carbon availability is lower (OLR < 0.4 kgSCOD m⁻³ d⁻¹). Carbon compounds were mainly removed during anaerobic feeding phase, however, the presence of particulate matter led to hydrolysis in the aerated phase. Nitrification was observed in both strategies. *Nitrospira spp.* was predominant under lower VER, whereas *Nitrosomonas spp.* overcame increasing VER. Although partial denitrification and low phosphorus removal were achieved under both strategies, these factors could be target by controlling the excess of DO in aeration phase and improving the availability of readily organic substrate in feeding phase.

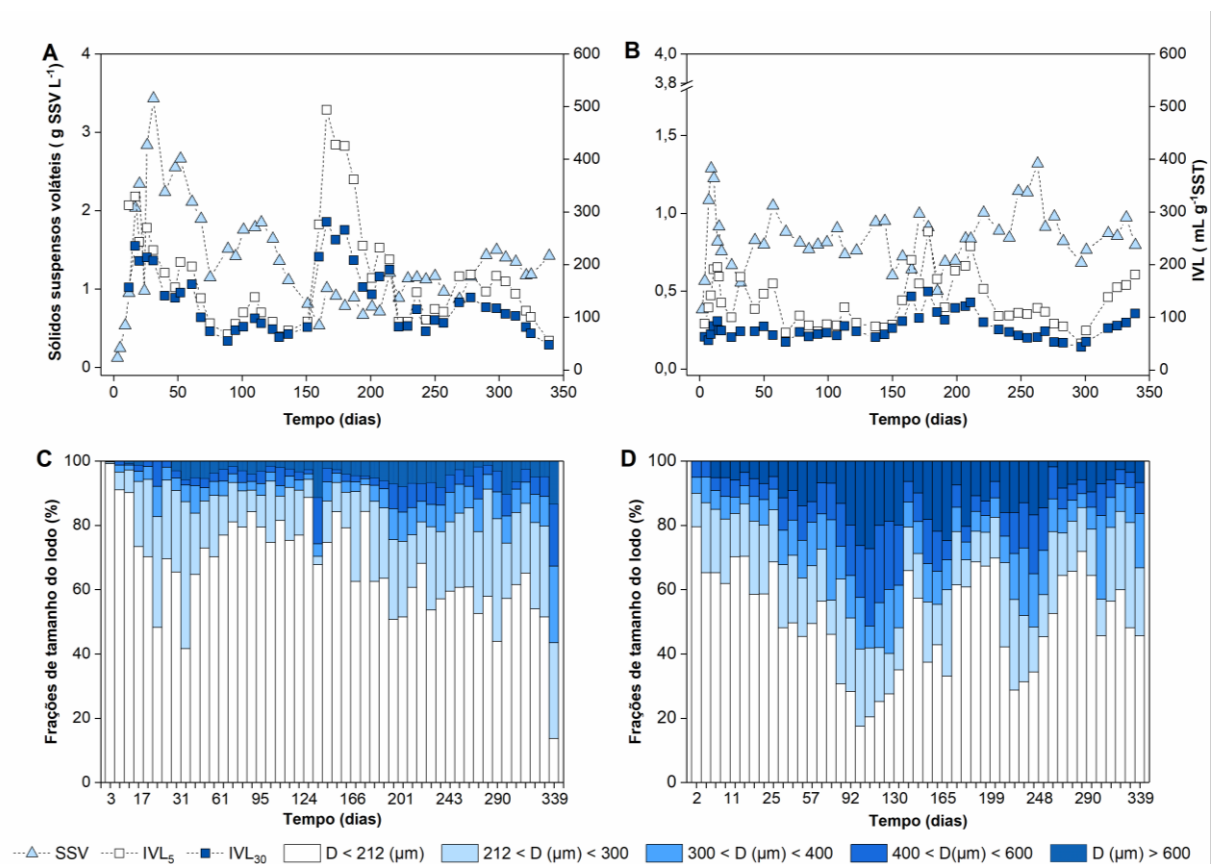
4.1.1 Resultados e Discussão

4.1.1.1 Aumento da relação troca volumétrica: efeitos a longo prazo nas características da biomassa

Durante o primeiro mês, o comportamento da biomassa apresentou o mesmo padrão crescente em ambas as estratégias operacionais, E-1 (troca volumétrica de 50%) e E-2 (troca volumétrica de 75%), atingindo maiores concentrações sob E-1 (3,5 g SSV L⁻¹) (Figura 12A). Após esse período, as estratégias mostraram uma distinção na evolução da biomassa. A E-1 apresentou redução na concentração de sólidos até 160 dias de operação (0,5 g VSS L⁻¹), e posteriormente, o sistema recuperou a capacidade de acumulação de biomassa mantendo uma

média de $1,2 \pm 0,2$ gSSV L^{-1} até o fim do período experimental. Por outro lado, a concentração de sólidos na E-2 apresentou menor variabilidade, ou seja, menor perda de biomassa (20 dias), contudo, o sistema não atingiu um acúmulo substancial de biomassa em quase um ano de operação, mantendo um valor médio de $0,8 \pm 0,2$ g SSV L^{-1} (Figura 12B). Esse comportamento poderia ser atribuído aos parâmetros biocinéticos, que serão melhor discutidos na Seção 4.1.1.2.

Figura 12: Concentração de sólidos (SSV) no reator, índice volumétrico de lodo (IVL) medido após 5 (IVL₅) e 30 min (IVL₃₀) de sedimentação em E-1 (A) e E-2 (B); e distribuição de tamanho de partículas em E-1 (C) e E-2 (D).



Quanto à sedimentabilidade do lodo, a E-2 foi mais vantajosa, proporcionando um lodo granular com melhores propriedades de sedimentação, alcançando IVL₃₀ de 73 ± 23 $mL\ g^{-1}$ SST, e IVL₅ de 130 ± 48 $mL\ g^{-1}$ SST, enquanto na E-1 os valores médios de IVL₃₀ e IVL₅ foram de 97 ± 39 e 180 ± 104 $mL\ g^{-1}$ SST, respectivamente (Figura 12A e Figura 12B). A relação IVL₃₀/IVL₅ tem sido apresentada como um indicador de granulação em sistemas com lodo granular aeróbio (LGA) (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007; ETTERER; WILDERER, 2001). Portanto, considerando esse critério, a granulação completa foi alcançada após 136 e 92 dias de operação ao longo da E-1 e E-2 respectivamente, quando a

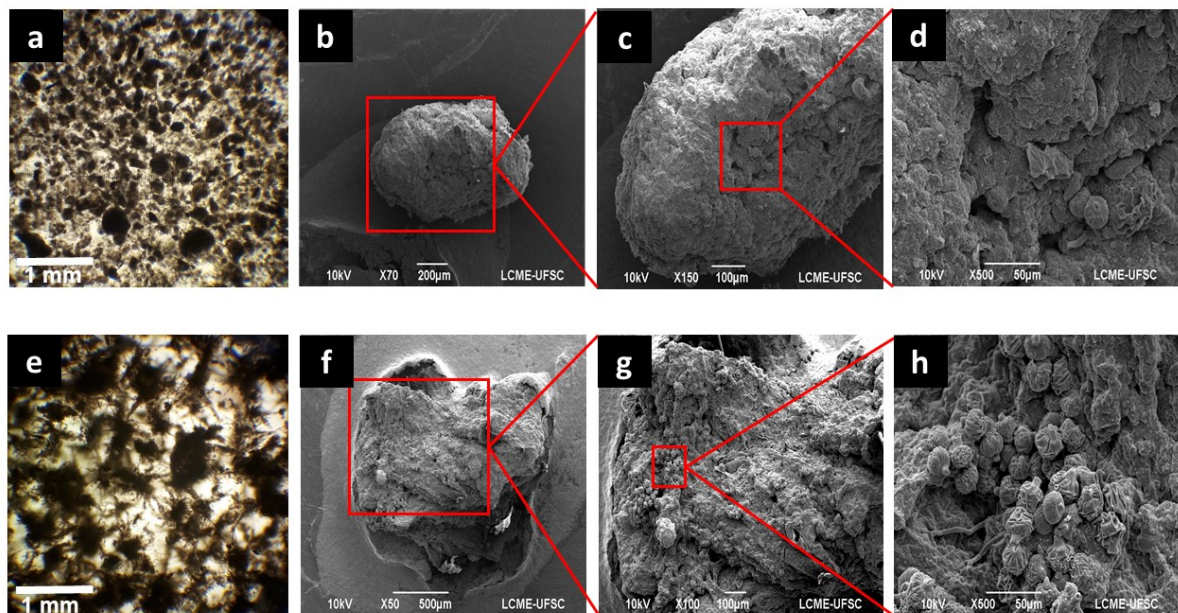
razão IVL_{30}/IVL_5 atingiu 0,9. Após 150 dias, o lodo apresentou variações na capacidade de sedimentação em ambas as estratégias operacionais. Essa variabilidade foi mais evidente na E-1, aumentando IVL_5 e IVL_{30} para aproximadamente 500 e 200 mL g^{-1} SST, enquanto na E-2 os valores foram mantidos mais baixos, em torno de 250 e 150 mL g^{-1} SST, respectivamente. No geral, as duas estratégias apresentaram perfil semelhante na capacidade de sedimentação ao longo do tempo, porém uma diferença crucial foi observada quando a concentração de biomassa é comparada nos períodos em que foram obtidos os melhores valores de IVL. Após a instabilidade, a E-2 foi capaz de recuperar o acúmulo de biomassa com boas propriedades de sedimentação (até 300 dias) e menor variabilidade, enquanto a E-1 apresentou elevados valores de IVL acompanhados de maior concentração de sólidos.

Referente a distribuição do tamanho das partículas, uma rápida formação dos agregados (20 dias) com diâmetro acima de 212 μm foi constatada na E-1 (Figura 12C). No entanto, este tamanho de grânulos foi mantido somente nos primeiros 40 dias, e após o 47º dia observou-se uma redução acentuada, na qual 75% da fração do lodo permaneceu com diâmetro abaixo de 212 μm até 200 dias de operação do sistema. Posteriormente, aproximadamente 50% das partículas apresentaram diâmetro acima de 212 μm , com a maior parte dos agregados medindo entre 212 e 300 μm , alcançando 85% no final do experimento. Diferentemente da E-1, na E-2, o tamanho das partículas aumentou progressivamente durante 107 dias (Figura 12D), atingindo 83% da fração do lodo com diâmetro acima de 212 μm . Após esse período, flutuações no tamanho dos grânulos foram observadas até o dia 339. Os agregados com diâmetro acima de 212 μm oscilaram entre 40 e 70% da fração do lodo, sendo o diâmetro majoritário entre 300 e 600 μm . Como resultado da relação de troca volumétrica (RTV) mais alta aplicada na E-2, o desenvolvimento de grânulos maiores foi favorecido, sustentado pela maior disponibilidade de substrato como consequência da mudança na carga orgânica (GAO et al., 2011; JUNGLES et al., 2011). Gao et al. (2011) relataram que o aumento da carga orgânica de 0,45 para 1,5 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$, elevou o diâmetro dos grânulos para 1 mm. Da mesma forma, Jungles et al. (2011) descreveram que o incremento da COV acelerou a formação de grânulos aeróbios, os quais apareceram após 6 dias de operação com média de 3,5 mm de diâmetro.

A morfologia dos agregados também apresentou diferenças significativas entre as estratégias operacionais (Figura 13). Embora o tamanho dos agregados fosse maior na E-2, quando comparado a E-1, os grânulos exibiram superfícies irregulares, com estruturas espalhadas (*finger type*) como pode ser observado na Figura 13e. Estudos anteriores sugeriram que a presença de material particulado no afluente resulta no crescimento exacerbado de

organismos filamentosos nos grânulos (FIGUEROA et al., 2015; WAGNER et al., 2015). De fato, cerca de 50% da carga orgânica total era composta por material particulado, especialmente durante a E-2, na qual os valores determinados foram duas vezes maiores que na E-1 (Tabela 1). De acordo com Martins et al. (2004), os organismos filamentosos possuem maior velocidade de crescimento devido ao crescimento unidirecional, ao invés das três direções, como as bactérias presentes no interior dos agregados. A análise de MEV no LGA constatou a presença de colônias de ciliados, representadas principalmente por *Epistylis sp.* na estrutura granular (Figura 13h), o que contribuiu para a irregularidade da superfície observada na E-2. A presença de protozoários ciliados tem sido relatada em estudos com grânulos aeróbios cultivados em efluente real (GUIMARÃES et al., 2017; PRONK et al., 2015b), os quais são primeiramente responsáveis pela assimilação das pequenas partículas orgânicas (SCHWARZENBECK; ERLEY; WILDERER, 2004), bem como pequenos flocos.

Figura 13: Imagens de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do lodo granular aeróbio em ambas as estratégias: (a-d) representando a E-1 no 136º dia de operação e (e-h) a E-2 no 107º dia.



A fim de complementar as características da composição do lodo granular, as frações de proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) foram quantificadas. PN foi a componente predominante, com o dobro de concentração quando comparada às quantidades de polissacarídeos (PS) em ambas as estratégias (Apêndice A). Os resultados mostraram uma média de 228 ± 33 mgPN g^{-1} SSV e 97 ± 19 mgPS g^{-1} SSV na E-1, e 289 ± 57 mgPN g^{-1} SSV e 124 ± 31 mgPS g^{-1} SSV em E-2. De acordo com Tu et al. (2012), a matriz EPS torna-se mais hidrofóbica ao longo do

processo de granulação, devido às proteínas hidrofóbicas envolvidas na agregação e densificação dos grânulos, contribuindo para a formação e estabilidade do núcleo proteico não celular (CAUDAN et al., 2012; MCSWAIN et al., 2005). Por outro lado, a elevada quantidade de polissacarídeos pode levar ao aumento na estabilidade estrutural e resistência física dos grânulos (TAY; LIU; LIU, 2004). Desta forma, as maiores concentrações de PN e PS quantificadas na E-2 podem ser correlacionadas com a maior estabilidade encontrada nesta estratégia (SCHAMBECK et al., 2020).

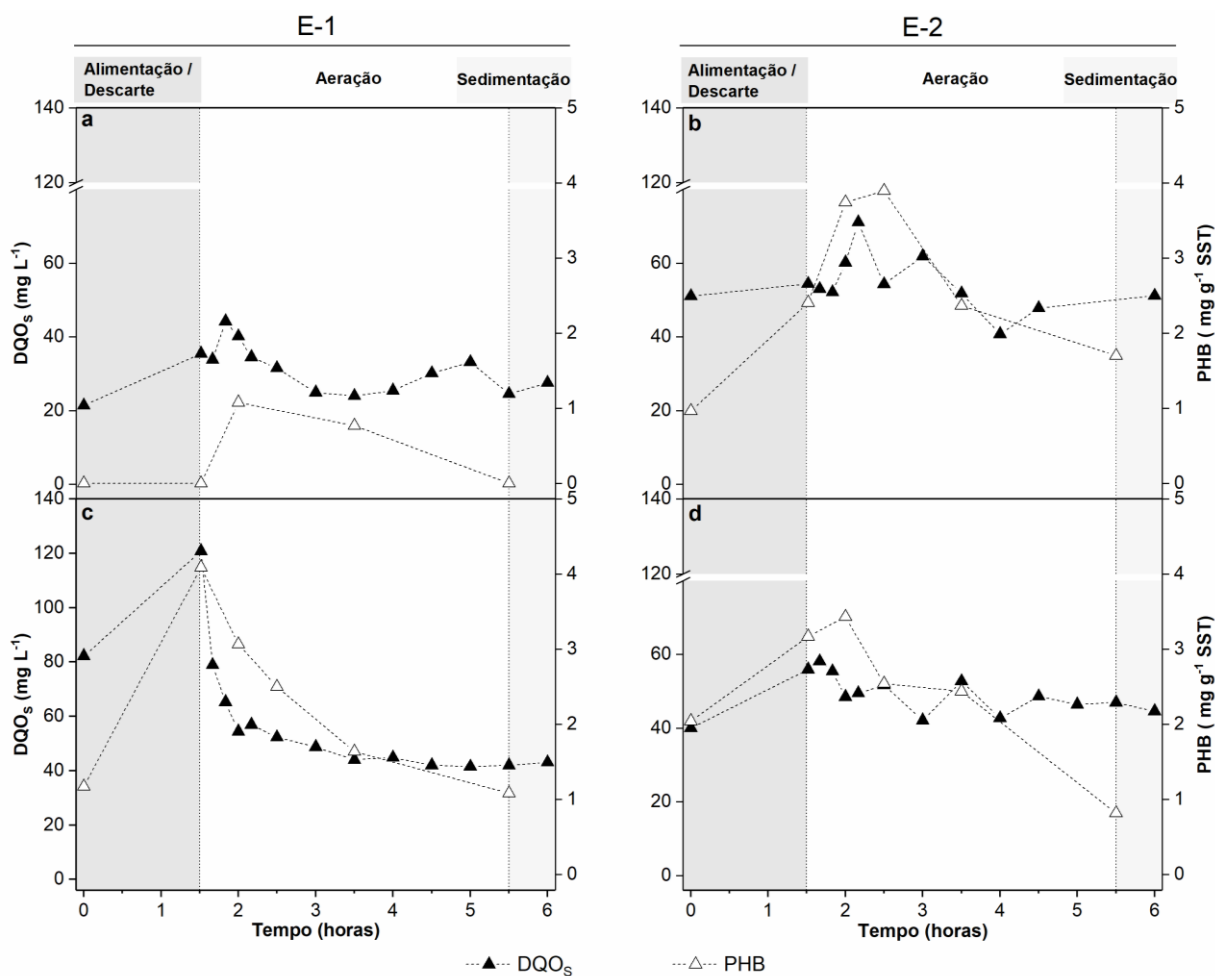
4.1.1.2 Atividades microbianas e parâmetros biocinéticos

No intuito de acompanhar as conversões de carbono e entender o metabolismo heterotrófico, foram monitorados ciclos operacionais em termos de DQO_s e polihidroxibutirato (PHB), quando a granulação foi dada como concluída em ambas as estratégias. Exemplos do perfil dos substratos ao longo das 6 horas estão apresentados na Figura 14. Os ciclos mostrados na Figura 14a e Figura 14b correspondem aos 136° e 107° dias de operação na E-1 e E-2, enquanto o 269° dia da E-1 e o 318° dia da E-2 aparecem na Figura 14c e Figura 14d, respectivamente. O enchimento lento e estático foi aplicado com o objetivo de promover a hidrólise da matéria orgânica particulada e o consumo anaeróbico de DQO solúvel em ambas as estratégias (DERLON et al., 2016). Na E-1, ocorreu um consumo parcial de DQO, cerca de 70% da remoção total, durante a fase de alimentação, e o restante do carbono solúvel foi consumido nos primeiros 30 minutos da fase de aeração (Figura 14a e Figura 14c). Diferentemente, como mostrado nas Figura 14b e Figura 14d, 98% da DQO_s foi consumida na fase de enchimento ao longo da E-2. Entretanto, durante a fase subsequente (aeração), foram observados picos de DQO_s, sugerindo hidrólise do material particulado, seguido de liberação de compostos solúveis para a fração líquida e consumo aeróbio. A produção de PHB, simultaneamente com a assimilação da DQO, pode ser observada em ambas as estratégias operacionais, alcançando cerca de 4 mg g⁻¹SST no fim da fase de alimentação, enquanto durante a fase de aeração o PHB foi consumido até aproximadamente 1 mg g⁻¹SST.

Os parâmetros biocinéticos foram calculados com base nas medições após o período de partida do sistema, ou seja, entre 40 e 339 dias de operação em ambas as estratégias (Tabela 6). De acordo com Beltran-Heredia et al. (2000), esses parâmetros proporcionam detalhes sobre a história celular, as características intrínsecas dos organismos e as condições ambientais existentes. Assim, a utilização da cinética de conversão de substratos é indispensável para um

novo projeto ou, por exemplo, para o aumento da escala de uma estação de tratamento de efluentes (AFFAM et al., 2014).

Figura 14: Perfis de ciclo de DQO₅ e PHB na E-1 (lado esquerdo) e E-2 (lado direito). Os experimentos foram realizados no 136º e 107º dia de operação para E-1 (a) e E-2 (b), e também após 269 dias para E-1 (c) e 318 dias de operação para E-2 (d), respectivamente.



A relação alimento-microrganismo (A/M) fornece informações sobre a disponibilidade de substrato no sistema (VON SPERLING, 2007), essa por sua vez, foi duas vezes maior na E-2 ($0,76 \text{ kgDQO}_5 \text{ kg}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$) quando comparada a E-1 ($0,33 \text{ kgDQO}_5 \text{ kg}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$) (Tabela 6). Segundo Li et al. (2011), uma maior relação A/M contribui para o crescimento microbiano e proporciona o aumento do tamanho dos grânulos. No mesmo contexto dos parâmetros biocinéticos, a constante de meia-saturação (K_S) também fornece informações entre a disponibilidade do substrato e a velocidade de crescimento microbiano. De acordo com a linearização Lineweaver-Burke, o valor observado de $K_{S\text{obs}}$ foi maior para E-1 (72 mg L^{-1}) que para E-2 (47 mg L^{-1}) (Apêndice A). O R^2 obtido pela linearização representou 50% dos dados.

Os coeficientes de correlação variaram significativamente em função das características do esgoto sanitário (Tabela 1), das propriedades da biomassa em ambas as estratégias operacionais, bem como das imprecisões do modelo (NAKHLA; LIU; BASSI, 2006). Contudo, esses resultados mostraram que o substrato e os microrganismos podem apresentar um efeito significativo na determinação dos coeficientes biocinéticos. Quanto menor o valor de K_{Sobs} , maior a afinidade da biomassa com o substrato, resultando em maiores velocidades de crescimento em condições de baixa disponibilidade, neste caso de carbono (ARNALDOS et al., 2015; SPERLING; LEMOS CHERNICHARO, 2005). De fato, a velocidade específica observada de crescimento da biomassa (μ_{obs}) apresentou maiores valores na E-2 ($0,08 \text{ d}^{-1}$) que na E-1 ($0,06 \text{ d}^{-1}$). No entanto, a velocidade específica de decaimento (k_d) foi duas vezes maior para E-2 ($0,07 \text{ d}^{-1}$) quando comparado a E-1 ($0,03 \text{ d}^{-1}$), corroborando o baixo acúmulo de biomassa na E-2.

Tabela 6: Mínimos, máximos e médias dos parâmetros biocinéticos ao longos das estratégias operacionais.

Parâmetros	Unidades	E-1			E-2		
		Min	Max	Média	Min	Max	Média
A/M	kgDQO _S kg ⁻¹ SSV d ⁻¹	0,14	0,84	0,33	0,32	2,17	0,76
K_{Sobs} ^a	mgDQO _S L ⁻¹			72			40
μ_{obs}	d ⁻¹	0,01	0,10	0,06	0,03	0,46	0,08
k_d ^a	d ⁻¹			0,03			0,07
$q_{DQO\text{-enchimento}}$ ^b	gDQO _S d ⁻¹ g ⁻¹ SSV	0,04	0,31	0,11	0,01	0,56	0,32
$q_{DQO\text{-aeróbio}}$ ^c	gDQO _S d ⁻¹ g ⁻¹ SSV	0,00	0,09	0,02	0,00	0,35	0,05
$q_{NH_4^+}$	gN-NH ₄ ⁺ d ⁻¹ g ⁻¹ SSV	0,004	0,110	0,050	0,001	0,233	0,129
$q_{NO_x\text{-consumo}}$ ^b	g N-NO _x d ⁻¹ g ⁻¹ SSV	0,000	0,020	0,004	0,000	0,025	0,004
$q_{NO_2^- \text{-produção}}$ ^c	g N-NO ₂ ⁻ d ⁻¹ g ⁻¹ SSV	0,000	0,032	0,003	0,000	0,082	0,010
$q_{NO_3^- \text{-produção}}$ ^c	g N-NO ₃ ⁻ d ⁻¹ g ⁻¹ SSV	0,001	0,050	0,017	0,001	0,163	0,034
q_{PT}	g P _T d ⁻¹ g ⁻¹ SSV	0,000	0,011	0,003	0,000	0,014	0,005

^a Não há máximo e mínimo pois K_{Sobs} e k_d foram obtidos plotando uma curva linear e os valores foram obtidos a partir da inclinação da reta e da interceptação do eixo y.

^b Velocidade de remoção específica durante a fase de alimentação. As concentrações iniciais ($t = 0$) para os cálculos foram baseadas em concentrações teóricas se o reator fosse alimentado de uma só vez, ao invés de fluxo em pistão ao longo de 90 min. Para tal, foram utilizadas concentrações medidas no esgoto sanitário e no efluente tratado.

^c Velocidade de remoção específica durante a fase de aeração. Essas foram calculadas a partir das concentrações reais medidas no fim da fase de enchimento e da saída do reator (efluente tratado).

Apesar da maior parte da DQOs ter sido assimilada durante a fase de alimentação na segunda estratégia, o tempo de contato entre o afluente e a biomassa não foi suficiente para atingir a conversão total de DQO ($\sim 4 \text{ mgPHB g}^{-1}\text{SSV}$). A fase subsequente compreendendo 240 min de aeração com baixo nível de substrato pode ter resultado na respiração endógena, também observada por Guimarães et al. (2018) em sistemas LGA tratando esgoto sanitário. De acordo com Hao et al. (2010), em período de inanição, as bactérias oxidam suas próprias células, a fim de fornecer energia para manutenção. Nessas circunstâncias, nota-se um crescimento negativo da biomassa concomitante ao consumo de aceptores de elétrons, principalmente oxigênio. O perfil dos ciclos na E-2 confirmaram a liberação de DQOs (Figura 14b e Figura 14d) ao longo da fase de aeração, sugerindo hidrólise das partículas. Além disso, ao contrário da E-1, a E-2 também pode ser caracterizada pela predação, devido ao grande número de colônias de protozoários fixadas nas superfícies dos grânulos, que também pode estar correlacionado ao baixo acúmulo de biomassa nesta estratégia.

O aumento na troca volumétrica de 50 para 75%, resultou também no aumento das remoções volumétricas de carbono, nitrogênio e fósforo (Tabela 6). Durante a E-1, as velocidades de remoção específica de DQO ($q_{\text{DQO}} - \text{enchimento} + q_{\text{DQO}} - \text{aeróbio}$), NH_4^+ ($q_{\text{NH}_4^+}$) e P_T (q_{P_T}) foram de $0,13 \text{ gDQOs d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, $0,050 \text{ gN-NH}_4^+ \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$ e $0,003 \text{ gP}_T \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, respectivamente, enquanto $0,37 \text{ gDQOs d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, $0,129 \text{ gN-NH}_4^+ \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$ e $0,005 \text{ gP}_T \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$ foram determinados na E-2. Valores semelhantes de $0,10\text{--}0,18 \text{ gN-NH}_4^+ \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$ e $0,005\text{--}0,008 \text{ gP}_T \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$ foram obtidos em estudo prévio em reator RBS em escala piloto operado com volume variável e alimentado com esgoto sanitário de baixa carga (GUIMARÃES et al., 2018). No entanto, os autores relataram valores mais elevados para velocidade de remoção específica de DQO ($0,51\text{--}0,58 \text{ gDQOs d}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$). No geral, apesar da segunda estratégia apresentar baixo acúmulo de sólidos, a biomassa mostrou-se bastante ativa nas condições aplicadas, com alta afinidade ao substrato disponível, exibindo capacidade de conversão aproximadamente 40% maior quando comparada à E-1.

4.1.1.3 Características do afluente e efluente

O efluente sanitário aplicado em ambas as estratégias apresentou características semelhantes, quanto às médias dos compostos. No entanto, constatou-se variabilidades das concentrações por meio do alto valor de desvio padrão tanto na E-1 quanto na E-2 (Tabela 1). Essas oscilações eram previstas, visto que o estudo foi conduzido em condições reais, e podem

ser atribuídas às infiltrações de águas pluviais e às variações da contribuição de esgoto na rede coletora. As características do efluente tratado bem como as eficiências de remoção estão resumidas na Tabela 7.

Tabela 7: Características do efluente tratado e as respectivas eficiências de remoção para ambas as estratégias operacionais.

Parâmetros	E-1		E-2	
	RTV=50%		RTV=75%	
	Média ± DP (n)	ER	Média ± DP (n)	ER
	(mg L ⁻¹)	(%)	(mg L ⁻¹)	(%)
SST	31 ± 24 (42)	71 ± 23	35 ± 22 (39)	68 ± 23
DQO ₅	48 ± 20 (42)	77 ± 9	54 ± 23(39)	70 ± 11
DBO ₅	27 ± 15 (41)	88 ± 8	38 ± 26 (37)	83 ± 18
N-NH ₄ ⁺	7,2 ± 6,3 (40)	80 ± 19	9,0 ± 5,5 (37)	76 ± 18
N-NO ₂ ⁻	1,4 ± 1,0 (37)	-	16 ± 12 (37)	-
N-NO ₃ ⁻	29 ± 9 (37)	-	11 ± 8 (37)	-
N _T	35 ± 9 (37)	27 ± 19	36 ± 10 (37)	31 ± 16
P _T	4,5 ± 1,7 (42)	29 ± 19	4,8 ± 1,1 (37)	25 ± 17
P-PO ₄ ³⁻	4,4 ± 3,2 (37)	14 ± 4	4,4 ± 1,9 (37)	11 ± 3

DV: desvio padrão; n= número amostral; ER: eficiências de remoção.

Altas eficiências de remoção de carbono (> 70%) foram alcançadas em ambas as estratégias operacionais. As concentrações de matéria orgânica e nitrogênio amoniacal atenderam aos padrões de lançamentos brasileiros da Resolução 430 (CONAMA, 2011) e do estado de Santa Catarina (CONSEMA-SC, 2009) em ambas as estratégias. As médias anuais alcançadas na E-1 foram 48 e 27 mg L⁻¹ em termos de DQO₅ e DBO₅, enquanto que 54 e 38 mg L⁻¹ foram obtidas na E-2, respectivamente. A oxidação do nitrogênio amoniacal foi bastante semelhante nas estratégias. Embora no decorrer da E-2, a concentração de biomassa e o tempo de retenção de sólidos (TRS) (13 ± 7 d) apresentaram valores menores que durante a E-1 (23 ± 16 d), o sistema foi capaz de manter uma alta remoção de amônio (aproximadamente 80%), com concentração média de efluente de 9 mg N-NH₄⁺ L⁻¹. No entanto, a formação de amônia livre (AL) foi mais evidente na E-2, atingindo 1,2 ± 0,2 mg L⁻¹, enquanto 0,8 ± 0,1 mg L⁻¹ foi detectada na primeira estratégia. Apesar da alternância de fases anaeróbias/aeróbias aplicadas no sistema, no intuito de favorecer o processo de desnitrificação e o desenvolvimento de organismos heterotróficos de crescimento lento, a remoção do nitrogênio total e a

liberação/assimilação de fosfato não foram notórias durante o estudo. As remoções médias foram de aproximadamente 30% para o nitrogênio total e 25% para o fósforo total em ambas as estratégias operacionais (Tabela 7).

O processo de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) não foi alcançado, mesmo a desnitrificação durante a fase de alimentação foi mínima, com velocidade de consumo de NO_x específico de biomassa de $0,004 \text{ g N-NO}_x \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$ em ambas as estratégias (Tabela 6). Isso pode ser atribuído à alta concentração de OD na fração líquida, uma vez que o sistema operou sem controle de deste parâmetro. De acordo com Layer et al. (2020), a NDS não ocorre em sistemas LGA se a concentração de OD for mantida constante durante a fase de aeração, mesmo com agregados de tamanho maior e granulação completa. Assim, o nível de saturação de OD durante a aeração foi favorável para nitrificação, porém impediu o processo de desnitrificação simultânea. A presença de aceptores de elétrons (O_2 e NO_x) durante a fase de alimentação, remanescente do ciclo anterior, também pode ter contribuído para a baixa remoção de fósforo. Os compostos de nitrogenados são geralmente conhecidos por terem um efeito adverso na capacidade de remoção de fósforo em sistemas de tratamento biológico (VABOLIENÉ et al., 2007). De acordo com Zou et al. (2006), esses compostos poderiam reduzir a quantidade de substrato disponível para os organismos acumuladores de fósforo (PAO) e, portanto, reduzir a liberação de fosfato durante a fase de enchimento e consequentemente impedir a assimilação na fase aerada.

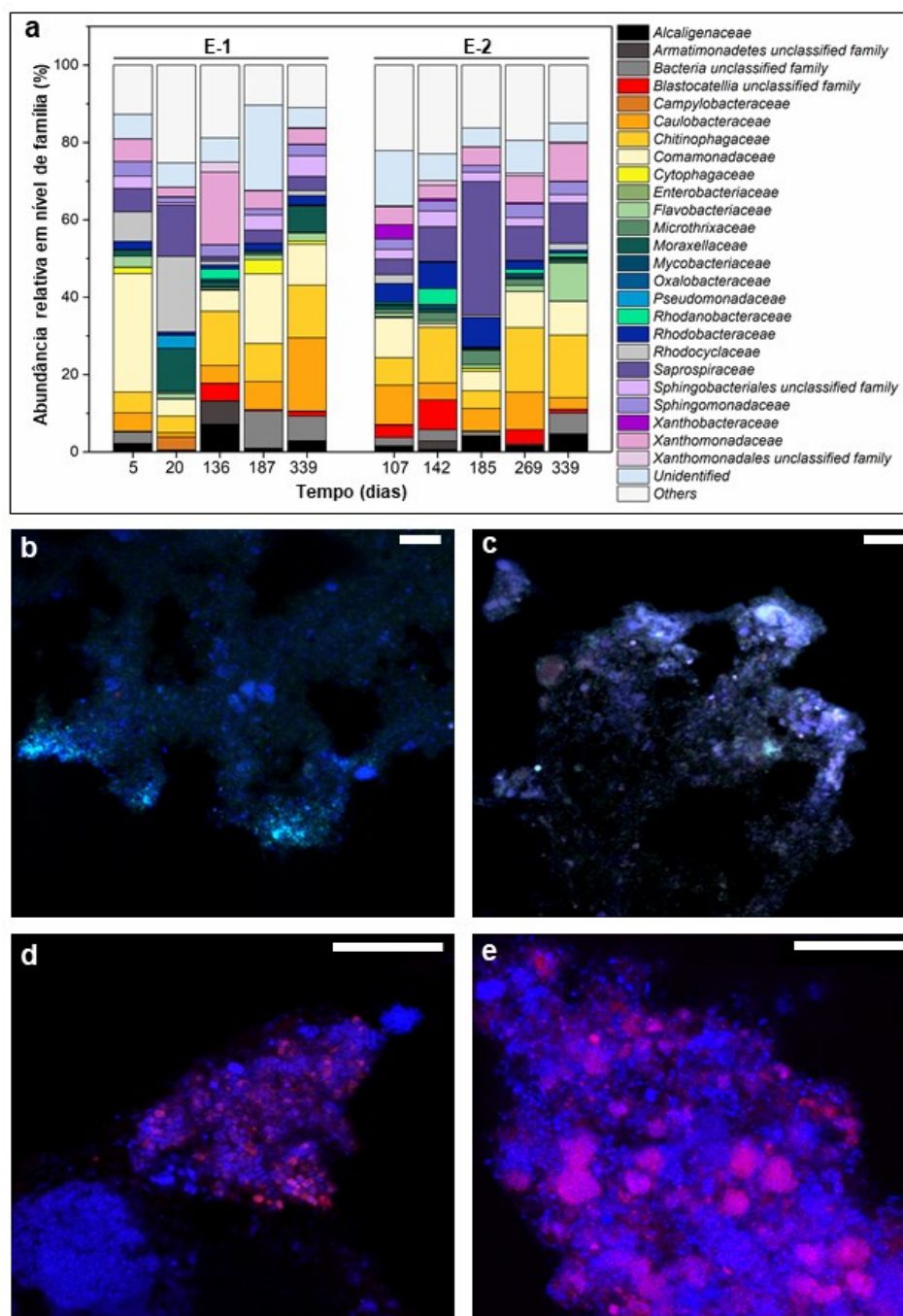
Apesar da razão C:P de aproximadamente $30 \text{ gDQO}_S \text{ g}^{-1} \text{P-PO}_4^{3-}$, obtida em ambas as estratégias, tenha colaborado para a seleção de PAO no sistema, bem como a DQO_S ter sido praticamente removida durante a alimentação do sistema (BASSIN et al., 2012), a quantidade de ácidos graxos voláteis (AGV) existente nos efluentes sanitário representam apenas uma pequena porção do carbono disponível (15% da DQO_S), fator exposto como desafio em estudos prévios (GUIMARÃES et al., 2018; WANG et al., 2017). Além disso, o tempo de contato entre a biomassa e o substrato ($E-1 = 26 \pm 10 \text{ min}$ e $E-2 = 10 \pm 2 \text{ min}$) durante o enchimento do sistema não foi suficiente para a produção de AGV através da hidrólise do material particulado (GUIMARÃES et al., 2018). Desta forma, a pequena conversão de DQO na forma de PHB ($\sim 4 \text{ mg PHB g}^{-1} \text{SSV}$) pode ser correlacionado com outro organismo de crescimento lento, mas supostamente não com os organismos acumuladores de fósforo.

4.1.1.4 Ecologia microbiana

Análises da estrutura microbiana também foram realizadas ao longo das duas estratégias operacionais (Figura 15). Na Figura 15a pode-se observar que, além das flutuações das comunidades microbianas, houve diferenças entre organismos quando as duas estratégias são comparadas, sugerindo que as diferentes condições operacionais aplicadas foram capazes de selecionar populações microbianas distintas. Durante as primeiras semanas de operação da E-1, a microbiota foi dominada por microrganismos característicos de esgotos sanitários e comuns no período de partida de sistemas LGA (SCHAMBECK et al., 2020), como os gêneros *Commamonas*, *Acinetobacter* e *Zooglea* membros das famílias *Commamodaceae* (31%, dia 5), *Rhodocyclaceae* (20%, dia 20) e *Moraxellaceae* (12%, dia 20), respectivamente. A família *Saprospiraceae* também foi detectada com alta abundância relativa durante o período inicial na E-1 (20º dia com 13%), porém a população reduziu gradativamente ao longo período experimental. Por outro lado, essa família foi selecionada na E-2, alcançando 34% de abundância relativa. As condições aplicadas na E-1 favoreceram membros das famílias *Caulobacteraceae*, *Chitinophagaceae* e *Xanthomonadaceae*, enquanto E-2 apresentou maior abundância de *Rhodobacteraceae* (dia 185, 9%), *Flavobacteriaceae* (dia 339, 10%) e *Saprospiraceae* (dia 185, 34%).

Essas populações abundantes podem estar relacionadas às vias metabólicas da matriz EPS (MILLS et al., 2008), especialmente *Saprospiraceae* e *Flavobacteriaceae*, que já foram reportadas como produtoras de EPS em sistemas de lodo granular (SCHAMBECK et al., 2020; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). Dessa forma, a maior produção de EPS na E-2 poderia ser atribuída a esses organismos. Membros da família *Chitinophagaceae* foram detectados em ambas as estratégias, aumentando sua abundância relativa de 5% nas primeiras semanas para 17% no fim do experimento. De acordo Awang et al. (2017), essa família é responsável por hidrolisar diversos substratos, sendo microrganismos chaves na hidrólise de compostos com cadeias de carbono complexas, incluindo os presentes nos efluentes sanitários. No geral, a maioria das populações encontradas em ambas as estratégias pela análise de sequenciamento de nova geração foram organismos heterotróficos ordinários de crescimento rápido (OHO) com metabolismo aeróbio. Presume-se que esses organismos formam matrizes de EPS, que podem incorporar micro colônias de organismos de crescimento lento como os acumuladores de fósforo (PAO) e glicogênio (GAO), bem como nitrificantes autotróficos (WEISSBRODT et al., 2013).

Figura 15: Composição microbiana em ambas as estratégias operacionais. Diversidade microbiana em nível de família (a). Outros referem a taxa com abundância máxima <3% ; Hibridização in situ fluorescente (FISH) em fatias de grânulos com EUB_{MIX} coradas em azul, Ntspa662 em verde e NSO190 em vermelho em E-1 (b) e E-2 (c); Licor misto marcado com EUB_{MIX} e NIT3(vermelho) na E-1 (d) e PAE997(vermelho) na E-2 (e). Barra = 20 µm.



A técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH) foi utilizada para identificar colônias subestimadas pela análise de sequenciamento, como os organismos nitrificantes. Aparentemente, a oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito durante a E-1 ocorreu por outra via metabólica, a qual não envolveu as bactérias oxidadoras de amônia (BOA), representada

pela família *Nitrosomonadaceae*, uma vez que esses organismos não foram detectados nesta primeira estratégia. No entanto, um número expressivo de aglomerados de *Nitrospira spp.* pode ser observada na camada externa do grânulo, conforme mostrado na Figura 15b em azul claro. No sequenciamento de DNA, a família *Nitrospiraceae* foi detectada com abundância relativa inferior a 0,3% em E-1. Por outro lado, *Comammmodaceae* apareceu com 31% no período inicial e cerca de 20% de abundância em toda a estratégia, a qual já foi reportada como organismos nitrificantes heterotróficos (LI et al., 2008). Além disso, Daims et al. (2016) mostraram que *Nitrospira spp.* pode codificar ambas as vias para a oxidação de nitrogênio amoniacal e do nitrito. No entanto, análises ecofisiológicas e genômicas mais específicas seriam necessárias para elucidar o metabolismo desses organismos neste sistema.

Na segunda estratégia, a distribuição espacial na fatia do grânulo exibiu maior número de colônias de BOA e menos de *Nitrospira spp.* (Figura 15c), esse fato pode estar relacionado à amônia livre (AL), cuja concentração atingiu $1,2 \pm 0,2 \text{ mg AL L}^{-1}$, conforme apresentado na seção 4.1.1.3, implicando em nitrificação parcial. Concentrações entre 0,1 e 1,0 mgAL L⁻¹ inibem a atividade de bactérias oxidadoras de nitrito (BON), neste caso, representada por *Nitrospira spp.*, enquanto as BOA são inibidas quando submetidas a concentrações mais altas de 10-150 mgAL L⁻¹ (ANTHONISEN et al., 1976). O acúmulo de nitrito antes da formação de nitrato foi detectado em período iniciais de sistemas LGA, correlacionando-se com a evolução sequencial das BOA e BON (WEISSBRODT et al., 2013).

Colônias de *Nitrobacter spp.* e *Pseudomonas spp.* também foram encontrados em ambas as estratégias operacionais (Figura 15d e Figura 15e). No entanto, aglomerados de *Nitrobacter spp.* se destacaram ao longo da E-1, com várias colônias detectadas e distribuídas na amostra (Figura 15d), corroborando o acúmulo de nitrato nesta estratégia (Tabela 7). Na Figura 15e pode ser observada um grande número de *Pseudomonas spp.* na E-2, embora o processo de desnitrificação não tenha sido evidenciado.

4.1.1.5 Análise dos dados

O controle estatístico multivariado de processo (MSPC) foi aplicado para avaliar a variabilidade e detectar comportamento não aleatório em ambas as estratégias operacionais. A análise de componentes principais (ACP) reduziu o espaço multidimensional em 3 componentes principais significativas (CP) explicando 67% da variância total na E-1 (38, 17 e 12% para CP1, CP2 e CP3, respectivamente); enquanto representaram 65% na E-2 (29, 23 e

13% para CP1, CP2 e CP3 respectivamente). As cargas fatoriais estão apresentadas no Apêndice A. Visto que cada variável está associada a um valor de carga (*loadings*), os resultados podem ser interpretados como correlações entre as variáveis e cada CP.

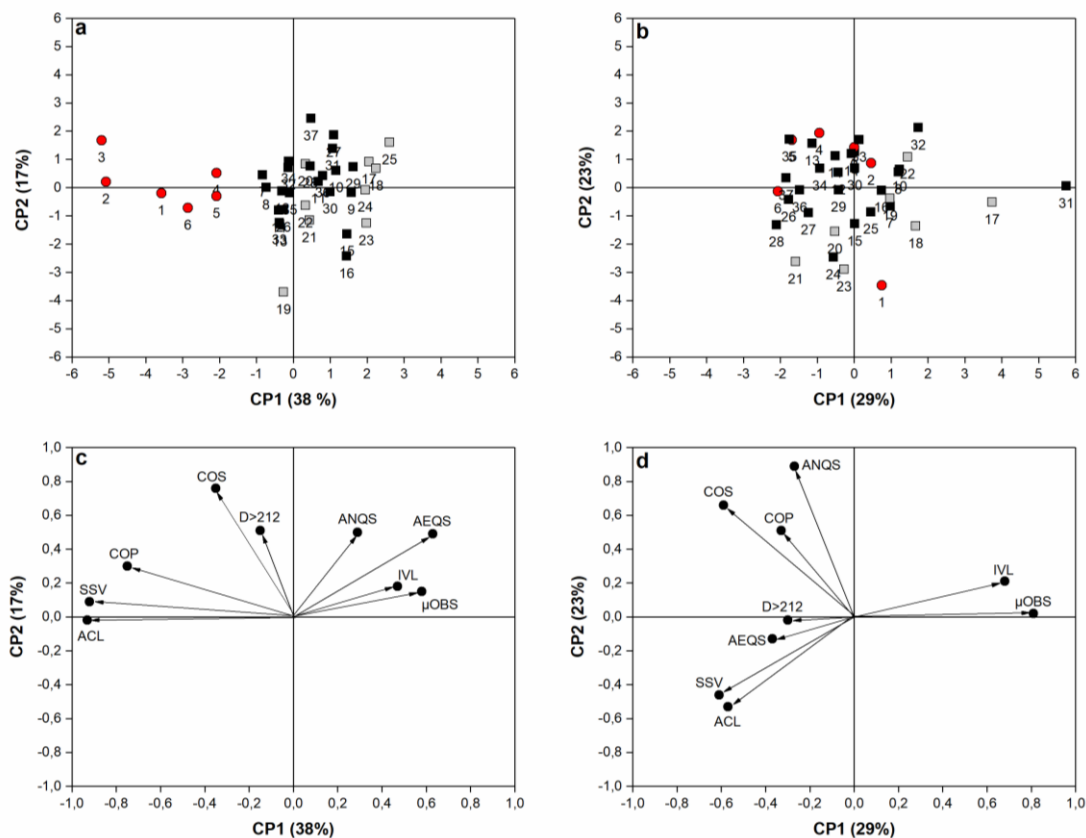
Os biplots de *scores* e *loadings* das duas primeiras CP foram utilizados no intuito de visualizar o comportamento combinado das variáveis significativas, que afetaram ambas as estratégias operacionais (Figura 16). Na E-1, a CP1 compilou o conjunto de dados em dois grupos (Figura 16a): no início da operação do sistema (*scores* em círculos vermelhos), maiores valores da altura da cama de lodo no reator (ACL), SSV e carga orgânica particulada (COP) foram descritos durante esse período. Posteriormente, o subconjunto (*scores* quadrados) representou maiores valores de velocidade de remoção específica de DQO na fase de enchimento (ANQS) e velocidade específica observada de crescimento de biomassa (μ OBS). Este padrão sugeriu um comportamento contrastante entre as condições operacionais do sistema e as características da biomassa (Figura 16c). Os *scores* foram bastante projetados nos lados positivo e negativo da CP2, onde os dados do final do experimento (*scores* 25-37) foram agrupados principalmente no lado positivo, revelando que o reator operou com carga orgânica solúvel (COS) mais alta, beneficiando a granulação da biomassa.

O período de partida no sistema foi mais acelerado na E-2, uma vez que os *scores* em vermelho estavam mais agrupados no espaço modelado (Figura 16b). Além disso, os *scores* de 15 a 29 apresentaram valores de SSV e ACL maiores que suas médias (*scores* projetados principalmente no lado negativo do CP2). Embora o reator tenha trabalhado com baixo COP e COS neste período (*scores* projetados no lado oposto de COP e COS), a concentração de biomassa não foi afetada (Figura 16d). Uma menor variação foi observada a partir desse período, indicando que as condições operacionais aplicadas na E-2 forneceram uma operação e desempenho no sistema mais homogêneos quando comparado a E-1.

Os resultados da ACP confirmaram que, durante o período de instabilidade, a carga orgânica desempenhou um papel importante. O período de desestabilização foi caracterizado por uma diminuição na carga orgânica no sistema ($< 0,4 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) em ambas as estratégias (período chuvoso de verão), principalmente na E-1 (Apêndice A). Na E-2 (*scores* em cinza - Figura 16b), as cargas orgânicas particulada e solúvel estavam abaixo de suas médias neste período (*scores* foram projetados no lado negativo de CP2), contudo maiores que aquelas encontradas em E-1, principalmente entre 170 e 200 dias de operação (Apêndice A). Na E-1, a COP foi definitivamente menor em toda a fase instável (*scores* do quadrado cinza – Figura 16a), uma vez que o conjunto de dados foi projetado no lado positivo do CP1. Como

consequência, organismos filamentosos superaram as bactérias formadoras de flocos, pois são mais competitivos em absorver nutrientes de meios com baixos níveis de substrato (LIU; TAY, 2006; PEYONG et al., 2012). De fato, os resultados da ACP confirmaram esse comportamento, uma vez que maiores valores de μ OBS foram constatados nesse período, principalmente na E-1. Resultados semelhantes foram relatados em termos de carga orgânica por Li et al. (2010). Os autores atribuíram a dominância de organismos filamentosos quando a carga orgânica no sistema foi reduzida para $0,5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Peyong et al. (2012) descreveram os grânulos como porosos, apresentando estruturas com baixa coesão e contendo organismos filamentosos, quando o sistema também foi operado com efluente sanitário real a $0,54 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Os autores ainda relataram que os grânulos se desintegraram em pequenos fragmentos, e foram posteriormente lavados do reator com 60 dias de operação.

Figura 16: Gráficos de *scores* e *loadings* na E-1 (a e c) e E-2 (b e d) do modelo biplot para análise de componentes principais (ACP) das condições operacionais e características de biomassa. Círculos vermelhos e quadrados pretos estão relacionados ao período de partida do sistema e fase estacionária, respectivamente. Os quadrados cinzentos estão associados ao período instabilidade.



Os resultados da ACP também descreveram uma correlação interessante entre a estabilidade dos grânulos e o metabolismo do substrato. Na E-1, quase todos os *scores*

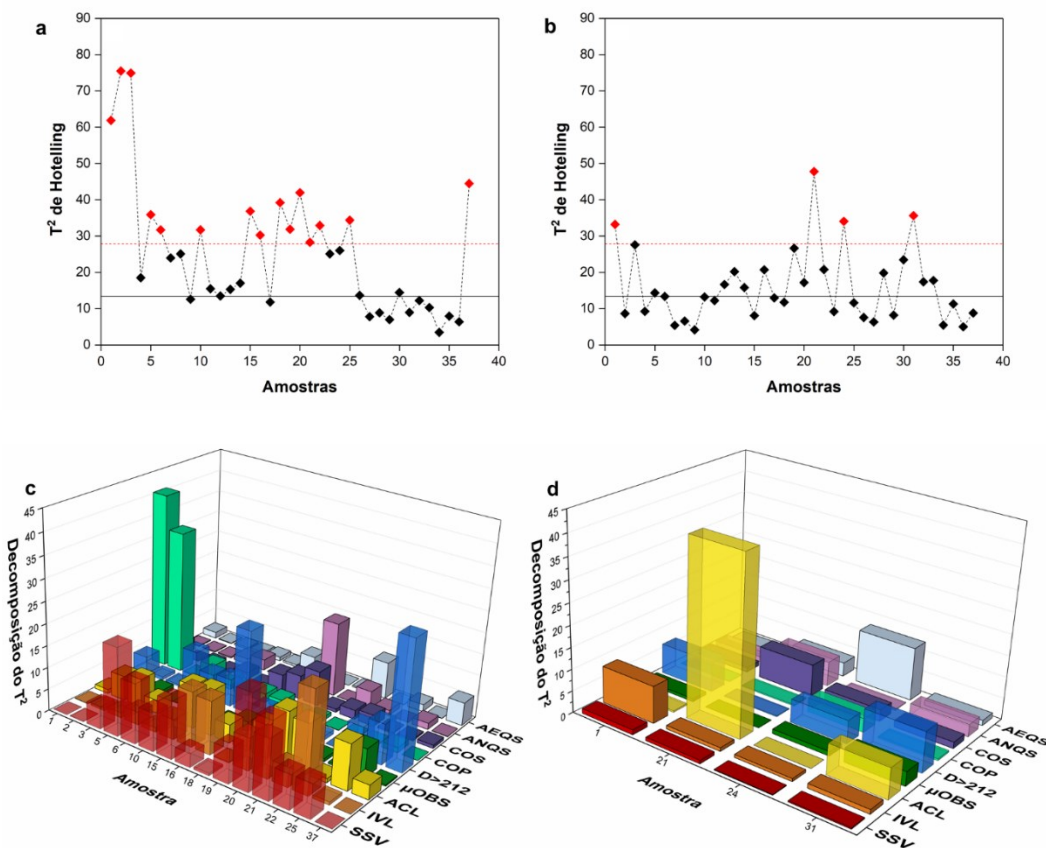
atribuídos ao período de instabilidade foram projetados sobre o lado positivo do CP1, onde a biomassa apresentou alta atividade de consumo aeróbio de DQO (AEQS). Embora na E-2, a AEQS tenha apresentado menor variância explicada tanto na CP1 quanto na CP2, durante o período de instabilidade, esta foi inversamente correlacionada à conversão anaeróbia DQO, inferindo baixa oxidação por essa via. Dessa forma, em ambas as estratégias operacionais, a ACP sugeriu que a atividade aeróbia se relacionou principalmente com o período de instabilidade. De acordo com De Kreuk e Van Loosdrecht (2004) quando o oxigênio é utilizado como aceptor de elétrons na remoção de matéria orgânica, ocorre o predomínio de organismos heterotróficos de crescimento rápido, como os organismos filamentosos, resultando na instabilidade de sistema.

A fim de analisar a variabilidade e as distribuições anormais das variáveis e, assim, verificar se os processos (estratégias) estavam sob controle ou fora de controle estatístico, foram gerados gráficos de controle T^2 de Hotelling (Figura 17a e Figura 17b). Quinze sinais (amostras) fora de controle representados pelo gráfico de Hotelling ocorreram ao longo da E-1 (Figura 17a), enquanto apenas quatro casos excederam o limite na E-2 (Figura 17b). Embora pontos fora de controle tenham ocorrido em ambas as estratégias operacionais, o comportamento constatado na E-2 evidenciou que esta estava mais sob controle estatístico quando comparada a E-1. Além disso, durante a primeira estratégia, o sistema levou cerca de 200 dias para atingir um padrão sólido, enquanto na E-2 o sistema alcançou o controle desde o início. As amostras da primeira estratégia corroboraram os resultados, uma vez que as mudanças na distribuição dos dados foram claramente observadas desde a partida do sistema até um período prévio a fase estacionária no modelo da ACP (Figura 16a). De acordo com Franca et al. (2018), o período longo de partida em sistema LGA é frequentemente descrito como um dos limitantes para a aplicação desta tecnologia, juntamente com a instabilidade do processo. Dessa forma, os resultados encontrados na E-2 mostraram melhor desempenho nesses aspectos.

A decomposição de T^2 (Figura 17c e Figura 17d) revelou o poder de cada variável nas amostras fora de controle. Quanto maior o valor decomposto, maior a contribuição de uma variável individual para a estatística T^2 . Em geral, na E-1, a concentração de biomassa contemplou a maioria dos pontos que excederam o limite superior (Figura 17c). Além disso, os primeiros sinais fora de controle foram atribuídos principalmente às características do efluente sanitário, uma vez que a carga orgânica particulada representou a maioria destes. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na ACP, visto que a COP correspondeu a terceira maior carga fatorial na CP1 (Apêndice A). As características da biomassa, entre elas o diâmetro

das partículas e a relação IVL_{30}/IVL_5 , foram as principais responsáveis pelos pontos fora do limite no final do período experimental. Por outro lado, as amostras fora de controle na E-2 estavam relacionados principalmente às condições operacionais (amostra 21 - ACL) e às características da biomassa (amostra 24 - AEQS) (Figura 17d). Dessa forma, a detecção e o diagnóstico de falhas são ferramentas cruciais, não apenas para validar a condição ideal do processo a fim de alcançar a estabilidade do sistema LGA, mas também para traçar uma análise confiável de vulnerabilidades, explorando a relação entre troca volumétrica, atividade e composição da biomassa, concomitante às características do efluente sanitário.

Figura 17: Gráficos de controle T^2 de Hotelling com níveis de confiança de 95% nos cálculos do limite de superior e decomposição do T^2 para amostras fora de controle em E-1 (a e c) e E-2 (b e d).



4.1.1.6 Implicações práticas para estações de tratamento de esgoto sanitário de baixa carga

A estabilidade de um sistema com LGA foi estudada por meio de duas estratégias operacionais, diferenciadas pela relação de troca volumétrica (RTV) durante quase dois anos, a fim de aumentar a carga orgânica aplicada, e os efeitos positivos na estabilidade dos grânulos e na capacidade de conversão como consequência (GAO et al., 2011; PEYONG et al., 2012). De

fato, a carga orgânica volumétrica (COV) se mostrou o fator mais decisivo encontrado neste estudo, induzindo a estabilidade do sistema. Propostas para aumentar a COV reduzindo o tempo total do ciclo podem muitas vezes não ser aplicáveis, visto que afluentes com altas concentrações de nitrogênio amoniacal podem não ter a remoção esperada. Outra abordagem seria a extensão da fase de alimentação, que pode também implicar na redução da fase aeróbia ou no aumento do tempo total de ciclo, conseqüentemente reduzindo a capacidade de tratamento.

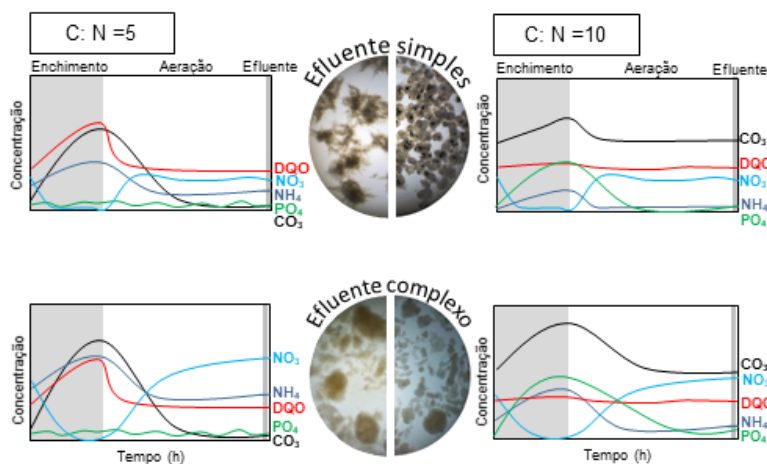
O efluente tratado do sistema atendeu os padrões de lançamentos brasileiros em ambas as estratégias operacionais deste estudo, entretanto critérios mais restritivos são impostos por alguns estados, municípios e outros países. A fim de aumentar a desnitrificação e a remoção de fósforo, uma fase anaeróbia eficiente deve ser adicionada, considerando uma distribuição uniforme do afluente no reator, bem como um controle do OD na fase de aeração. Em sistemas RBS operado com volume constante, a altura da cama de lodo deve ser ponderada, de forma a monitorar o acúmulo de biomassa e a eventual perda de sólidos no sistema. No presente estudo, embora a RTV tenha sido de 75%, a limitação na acumulação de biomassa e a pequena altura da cama de lodo produziram um efluente com baixa concentração de sólidos ($\sim 30 \text{ mg L}^{-1}$). No entanto, para garantir a segurança do tratamento, pode ser necessário aplicar um sistema de recirculação interna (de cima para baixo no reator), a fim de evitar o escoamento das partículas e assegurar a eficiência de tratamento.

Em relação ao controle estatístico multivariado de processo, apesar das abordagens amplamente utilizadas incluírem métodos que visam reduzir a dimensionalidade de grandes conjuntos de dados, como o ACP, um método combinado, conforme proposto neste estudo (modelos de ACP + gráficos de controle), pode ser usado para avaliar a variabilidade e detectar comportamento não aleatório em sistema LGA. Neste estudo, as análises multivariadas revelaram claramente a influência da matéria orgânica particulada no sistema LGA, que deve ser evitada, a fim de desenvolver grânulos aeróbios mais compactos, livres de estruturas espalhadas (*finger-type*). Para tal, um tratamento primário adequado, seguido de um tempo de contato suficiente para hidrolisar o material particulado durante a fase de enchimento, ou ainda um tanque de hidrólise a montante do reator é determinante para o desenvolvimento e estabilidade dos grânulos: esse é o alicerce no tratamento de efluente sanitário de baixa carga.

4.1.2 Conclusões

- O reator com LGA operado em volume constante com alta RTV (75%) desenvolveu uma fração significativa de grânulos (> 80%), com sedimentabilidade satisfatória ($IVL_{30} < 70 \text{ mL gSST L}^{-1}$ e relação IVL_{30} / IVL_5 em torno de 0,70). As proteínas foram a componente predominante na matriz EPS, com o dobro de concentração quando comparadas aos polissacarídeos, estas por sua vez, foram sustentadas pela maior abundância relativa das famílias *Saprospiraceae* e *Flavobacteriaceae*.
- A análise multivariada respaldou o aumento da troca volumétrica de 50 para 75%, provando ser uma estratégia importante para a estabilidade de sistemas LGA, especialmente durante períodos chuvosos onde a disponibilidade de carbono é menor ($COV < 0,4 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), exigindo um maior volume de afluente, a fim de manter o mínimo de substrato para a manutenção dos grânulos.
- A biomassa apresentou alta atividade em ambas as estratégias, produzindo um efluente que atendeu os padrões de lançamentos brasileiros. O carbono foi removido principalmente via anaeróbia, com ênfase na troca volumétrica de 75% (> 90%). Porém, a presença de material particulado levou à hidrólise na fase aerada, submetendo ao metabolismo aeróbio. Portanto, um tratamento primário adequado é recomendado a fim remover sólidos em suspensão e evitar este comportamento.
- A nitrificação foi alcançada com sucesso durante E-1, desenvolvida principalmente pela *Nitrospira ssp.* (em uma única etapa, aparentemente), e na E-2 por *Nitrosomonas ssp.* e *Nitrospira ssp.* (em duas etapas), porém a desnitrificação e a remoção de fósforo não foram evidentes em nenhuma das estratégias operacionais.

4.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO CARBONO E NITROGÊNIO E DA FONTE DE CARBONO NO LODO GRANULAR AERÓBIO



O objetivo do estudo foi investigar o efeito da relação carbono/nitrogênio (C:N) (5 e 10) nas características físico-químicas da biomassa granular, conversões dos substratos, bem como na sucessão da comunidade microbiana. A novidade nesta abordagem

residiu no fato de que após 84 dias de funcionamento do sistema, o substrato orgânico em ambos os reatores foi alterado para uma fonte mais complexa, onde apenas 50% do carbono era composto de ácidos graxos voláteis (AGV) e os outros 50% de compostos orgânicos fermentativos. A granulação foi favorecida sob relação C:N de 5, na qual 40% dos grânulos apresentaram diâmetro (D) acima de $500 \mu\text{m}$. No entanto, grânulos menores ($200 \mu\text{m} < D < 500 \mu\text{m}$) que foram desenvolvidos na C:N de 10 exibiram morfologia uniforme, com melhores propriedade de sedimentação (índice volumétrico de lodo - IVL_{30} e $IVL_5 < 30 \text{ mL gSST L}^{-1}$). A razão proteínas/polissacarídeos (PN/PS) foi influenciada pela composição do carbono no afluente, devido ao aumento da produção de PS sob relação C:N de 5, e o consumo na relação C:N de 10, implicando também nas frações de TB-EPS (*tightly bound-EPS*) e LB-EPS (*loosely bound-EPS*). Altas de remoções de carbono ($\sim 90\%$) e nitrificação completa ($\text{N-NO}_2^- < 2 \text{ mg L}^{-1}$ no efluente) foram alcançadas em ambas as relações C:N e para os diferentes substratos orgânicos. Entretanto, sob relação C:N de 5, a oxidação do nitrogênio amoniacal foi inferior (71 e 45%, nas fases I e II, respectivamente), devido à falta de alcalinidade no sistema. A baixa alcalinidade também foi um fator determinante na remoção do fósforo, contribuindo para a baixa atividade dos organismos acumuladores de fósforo. A complexidade do substrato orgânico impactou negativamente às atividades dos microrganismos, devido os produtos intermediários das vias metabólicas da glicose e aminoácidos. Organismos associados à estabilidade da biomassa granular foram favorecidos na C:N de 10 (*Zooglea* e *Flavobacterium*), corroborando a formação de grânulos maduros e estáveis sob esta relação. No geral, a relação C: N e a complexidade da matéria orgânica do afluente apresentaram um efeito no desempenho de sistemas com lodo granular aeróbio.

TOWARDS A BETTER UNDERSTANDING CONCERNING CARBON TO NITROGEN RATIO AND THE CARBON SOURCE INFLUENCE IN AEROBIC GRANULAR SLUDGE

This study aimed at investigating the effect of carbon to nitrogen (C: N) ratio (5 and 10) on the physicochemical characteristics of aerobic granular sludge and substrate conversions, as well as the establishment of the microbial community. After 84 days of operation of two lab-scale reactors fed with synthetic wastewater, the organic substrate in both reactors was changed from a simple synthetic carbon source (acetate and propionate) to a more complex carbon source (50% of volatile fatty acids (VFA) and 50% of fermentative compounds). Granulation was fostered under C: N = 5, in which 40% of the granules showed diameter (D) above 500 μm . On the contrary, the higher C:N ratio resulted in smaller granules ($200 < D (\mu\text{m}) < 500$) which presented uniform morphology and better settling properties (sludge volumetric index - SVI₃₀ and SVI₅ $< 30 \text{ mL gTSS L}^{-1}$). Protein /polysaccharide ratio (PN / PS) was influenced by the carbon source in the wastewater. There was an increase in PS content under C: N = 5, and decrease in C: N = 10, also implying in the fractions of TB-EPS (tightly bound-EPS) and LB-EPS (loosely bound-EPS). High carbon removals ($\sim 90\%$) and complete nitrification ($\text{NO}_2^- - \text{N} < 2 \text{ mg L}^{-1}$ in the effluent) were achieved in both C: N ratios and under different organic substrates. However, under C: N = 5, the rate of ammonium oxidation was lower (up to 45%) when compared to C:N=10 (up to 90%), probably due to the lack of alkalinity in the system. Low alkalinity was also a key factor for phosphorus removal, leading to a lower activity of phosphorus-accumulating organisms. The complexity of the organic substrate hindered microorganisms activities, due to the intermediate products of metabolic pathways of glucose and amino acids. Organisms associated with the stability of granular biomass were favored in C:N=10 (i.e., *Zooglea* and *Flavobacterium*), contributing for the formation of mature and stable granules. This worked showed that the C:N ratio and the complexity of wastewater organic matter are crucial for the good performance of aerobic granular sludge systems.

4.2.1 Resultados e Discussão

4.2.1.1 Granulação

Após a inoculação dos reatores, os efeitos da composição do afluente em relação a razão C:N e da fonte de substrato orgânico foram avaliadas no processo de granulação. Como pode

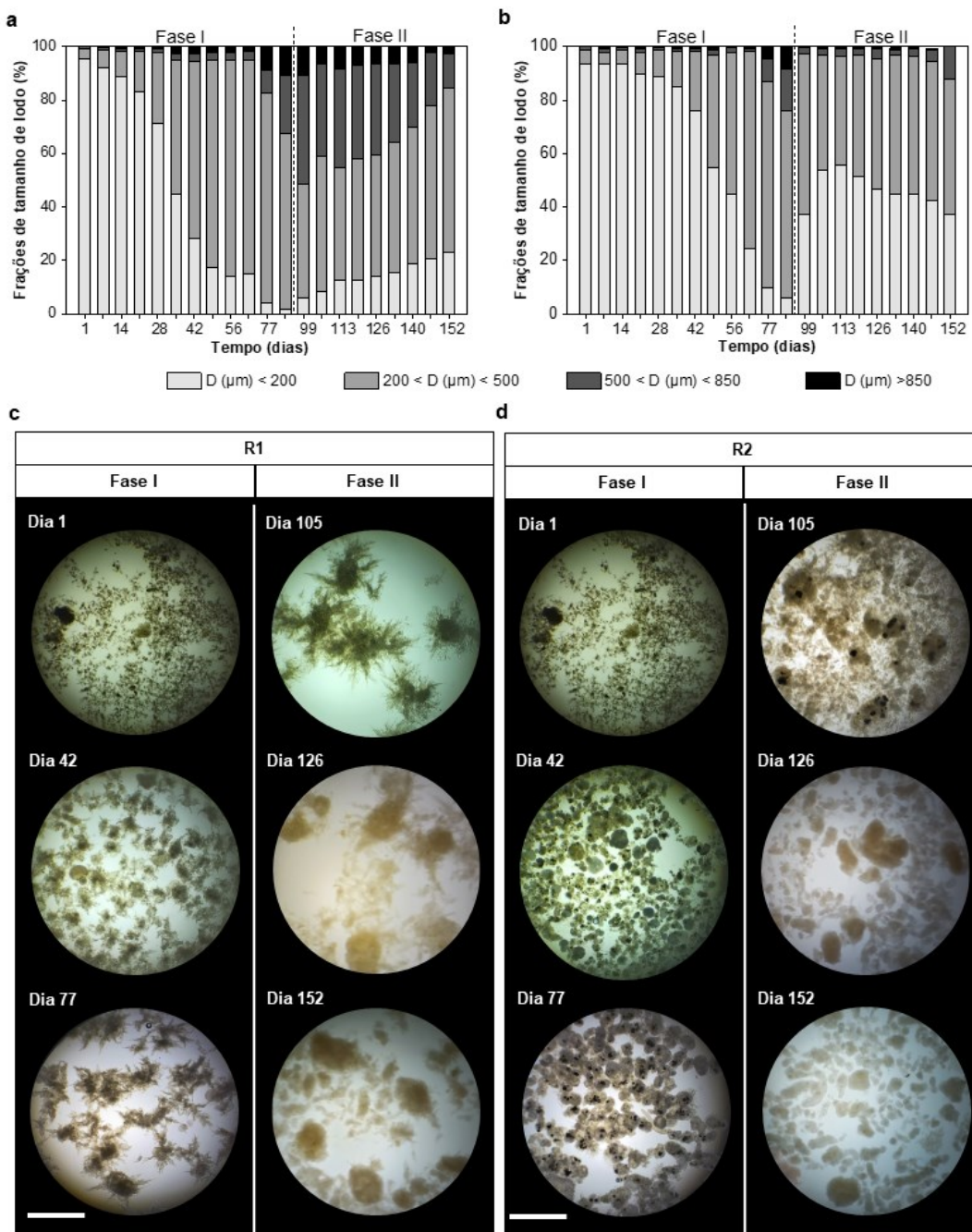
ser observado na Figura 18, uma rápida granulação ocorreu no R1 (C:N = 5), após 35 dias de operação, 55% da biomassa apresentava diâmetro acima de 200 μm (Figura 18a), enquanto no R2 (C:N = 10) essa proporção foi atingida somente aos 56 dias (Figura 18b). No geral, a granulação total foi alcançada no final da fase I (fonte de carbono simples) em ambos os reatores, apresentando 90% das partículas com diâmetro maior que 200 μm . Observa-se que, partículas com tamanho acima de 500 μm foram desenvolvidas somente no R1, representando aproximadamente 40% da fração de lodo, enquanto no R2 a fração majoritária permaneceu entre de 200 e 500 μm . A mudança do substrato orgânico para uma de fonte mais complexa (adição de substratos fermentáveis), ao longo da fase II, reduziu o diâmetro dos grânulos em ambos os reatores. O comportamento no R1 foi caracterizado pela diminuição gradativa no tamanho dos agregados, permanecendo com 80% das partículas com diâmetro acima de 200 μm no final do período experimental. Por outro lado, uma queda abrupta foi constatada no R2, na qual apenas 40% da biomassa manteve-se com diâmetro acima de 200 μm , com leve recuperação ao final da fase II, alcançando 60% de grânulos aos 152 dias de operação.

A morfologia dos agregados também apresentou diferenças entre R1 e R2, no entanto, flocos e grânulos coexistiram em ambos os reatores durante todo o período de operação. No início (dia 1) a biomassa era composta por células dispersas e pequenos flocos, comum de lodo ativado. Após 42 dias de operação, pequenos agregados foram desenvolvidos em ambos os reatores, como pode ser visto nas Figura 18c e Figura 18d. As condições operacionais aplicadas no R1 favoreceram o desenvolvimento de grânulos maiores em comparação ao R2, contudo os agregados apresentaram superfícies irregulares, com características espalhadas (*finger type*) até o final da fase I. Na fase II (dia 126) observa-se a redução no crescimento de organismos filamentosos no R1 (Figura 18c), contudo somente no R2 os grânulos apresentaram superfícies esféricas e regulares aos 152 dias de operação (Figura 18d).

Estes resultados mostraram que uma relação C:N mais alta (R2) em efluentes de baixa carga ($\text{DQO}_5 < 300 \text{ mg L}^{-1}$) é mais propício para a formação de partículas pequenas e densas, enquanto C:N menor, ou seja, concentração de nitrogênio amoniacal mais elevada (R1), pode levar ao desenvolvimento de grânulos com superfícies irregulares. Resultados semelhantes foram relatados por Wang et al. (2019). Os autores atribuíram o desenvolvimento de grânulos menores sob relação C:N mais altas (9 e 10), devido à inibição do metabolismo celular em condições com menor nitrogênio amoniacal em relação ao carbono, impedindo o crescimento microbiano. Por outro lado, a irregularidade das superfícies dos grânulos no R1 pode ser atribuída à assimilação incompleta de carbono durante a fase de enchimento, possivelmente

causada pela maior quantidade de compostos nitrogenados durante essa fase (corroborada a seção 4.2.1.3). Dessa forma, durante a fase de aeração, o oxigênio foi utilizado como acceptor de elétrons na remoção de matéria orgânica, favorecendo o predomínio de organismos heterotróficos de crescimento rápido, como os organismos filamentosos, resultando no desenvolvimento de superfícies irregulares dos agregados (DE KREUK et al., 2010; WEISSBRODT et al., 2012).

Figura 18: Distribuição do tamanho das partículas e imagens microscópicas durante o período de experimental em R1 (a e c) e R2 (b e d) nas duas fases operacionais. Barra = 1mm.



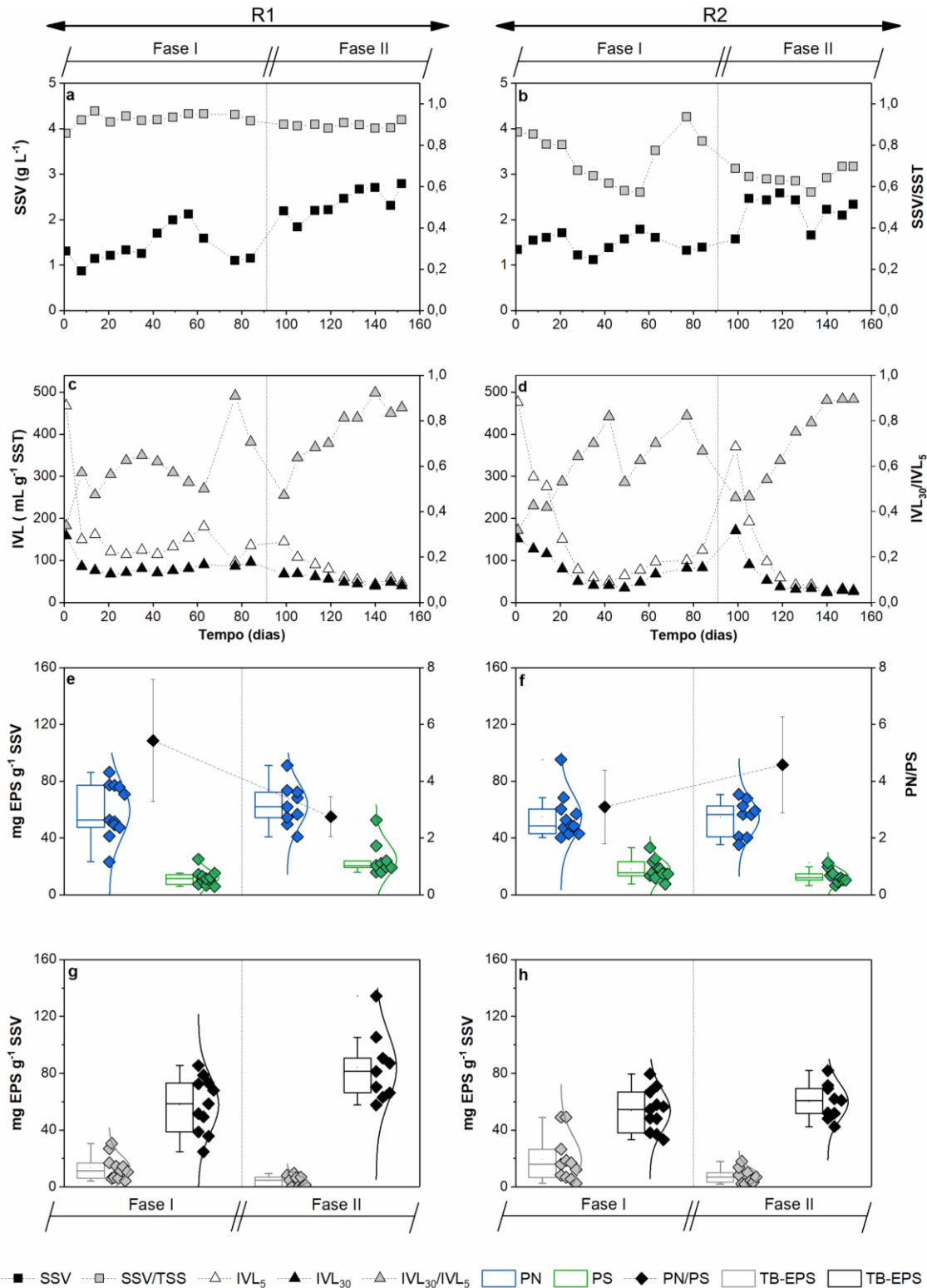
4.2.1.2 Propriedades da biomassa granular

A concentração de sólidos da biomassa (SSV), a capacidade de sedimentação em termos de índice volumétrico do lodo (IVL) aos 5 e 30 min, bem como o conteúdo de EPS estão apresentados na Figura 19. O perfil de acúmulo de biomassa em ambos os reatores exibiu tendência semelhante ao longo do período operacional da fase I, mantendo médias de $1,40 \pm 0,38$ e $1,46 \pm 0,20$ g SSV L⁻¹ para R1 (Figura 19a) e R2 (Figura 19b), respectivamente. A alteração da fonte de carbono do afluente favoreceu um maior acúmulo de biomassa no sistema, atingindo aproximadamente 2,5 g SSV L⁻¹ em ambos os reatores na fase II, acompanhando a maior fração de grânulos neste período (Figura 18a e Figura 18b). Apesar da relação C:N não ter aparentemente apresentado influência no desenvolvimento da biomassa (SSV), uma diferença no acúmulo de sólidos totais foi observada, visto que a razão SSV/SST manteve-se em torno de 0,9 em R1, enquanto em R2 uma redução foi evidenciada, atingindo 0,60 ao longo das duas fases operacionais. Resultados similares foram expostos por Zhang et al. (2018), que observaram uma redução na razão SSV/SST de 0,75 para 0,60 após 35 dias de operação em reator com grânulos aeróbios sob razão C:N de 15, enquanto com C:N de 5 a razão manteve-se próxima a 0,80. Os autores atribuíram esse comportamento devido à limitação de N-NH₄⁺, supõe-se pelo acúmulo de alcalinidade no sistema. No entanto, no estudo desenvolvido por Guimarães (2017), a autora também relatou uma redução da biomassa em sistema operado para seleção de organismo acumuladores de fósforo. Após 30 dias de operação, a fração inorgânica representava 57% dos sólidos do sistema, a qual foi atribuída à precipitação de minerais, como a estruvita (NH₄MgPO₄·6H₂O). De fato, o R2 atingiu maiores remoções de fósforo (ver seção 4.2.1.3 e Figura 20), no entanto análises complementares como espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) seriam necessárias para confirmar essa hipótese.

Em relação à sedimentabilidade da biomassa, uma redução abrupta nos valores de IVL foi constatada no R1 após a inoculação do reator. Os valores os iniciais de IVL₅ e IVL₃₀ reduziram-se de 467 e 158 mL gSST⁻¹ para 149 e 117 mL gSST⁻¹, respectivamente, mantendo as médias de 134 ± 24 e 80 ± 8 mL gSST⁻¹ até o final da fase I (Figura 19a). A razão IVL₃₀/IVL₅ é um ótimo indicador da sedimentabilidade do sistema, e também vem sendo usada como um parâmetro para apontar a granulação em sistemas LGA (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007). Esta por sua vez, apresentou flutuações durante a operação do R1 com média de $0,59 \pm 0,14$ para a primeira fase. No R2, a redução dos valores de IVL foi mais

gradativa, no entanto médias de IVL_5 , IVL_{30} e IVL_{30}/IVL_5 para 92 ± 23 e 62 ± 21 mL $gSST^{-1}$ e $0,70 \pm 0,08$, respectivamente, foram alcançadas na fase I.

Figura 19: Concentração de sólidos (SSV) (a,b); índice volumétrico de lodo (IVL) medido após 5 (IVL_5) e 30 min (IVL_{30}) de sedimentação (c,d); frações de proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) (e, f); e frações LB-EPS e TB-EPS (g, h) em ambas as fases operacionais no R1 (lado esquerdo) e R2 (lado direito).



Em ambos os reatores, a sedimentabilidade da biomassa durante a fase II apresentou uma melhora significativa. No R1, os valores de IVL_5 e IVL_{30} apresentaram uma redução ao longo do tempo, alcançando 46 e 39 mL $gSST^{-1}$ respectivamente, e IVL_{30}/IVL_5 de 0,86 no final da operação. Por outro lado, após uma semana da adição de substratos orgânicos fermentáveis no afluente, o R2 apresentou um pequeno distúrbio na capacidade de sedimentação, elevando os IVL_5 e IVL_{30} para 369 e 170 mL $gSST^{-1}$, respectivamente, apontando uma maior sensibilidade da biomassa quando comparada ao R1. Após a aclimação, o sistema foi capaz de recuperar a boa sedimentabilidade alcançando menores valores de IVL_5 (28 mL $gSST^{-1}$) e IVL_{30} (25 mL $gSST^{-1}$) com razão IVL_{30}/IVL_5 de 0,90 no final do período experimental. No geral, ambos os sistemas apresentaram boa sedimentação com IVL_{30} inferior a 100 mL $g^{-1}SST$ e IVL_{30}/IVL_5 próximo de 1, contudo a relação C:N de 10 (R2) foi mais vantajosa, exibindo melhor desempenho quanto à essa propriedade, alcançando menores valores de IVL em um menor espaço de tempo. Resultados semelhantes foram reportados por Peng et al. (2021), os quais atribuíram a melhor sedimentabilidade da biomassa para relações C:N de 8,25 e 16,25, devido à maior quantidade de compostos orgânicos disponível para os microrganismos nas condições de C:N maiores.

Os valores de EPS referem-se aos biopolímeros produzidos pelas células aderidas, desempenhando um papel fundamental na formação de agregados microbianos, relacionando-se diretamente com a capacidade de sedimentação da biomassa (LIU; TAY, 2008; MOGHADDAM; MOGHADDAM, 2015). Desta forma, no intuito de completar as características da biomassa granular, as frações de proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) foram determinados para as diferentes relações C:N, bem como na mudança do substrato orgânico (Figura 19e e Figura 19f). PN foi a componente predominante em ambos os reatores durante todo o período experimental, com valores médios de 56 ± 22 e 63 ± 15 mg PN $g^{-1}SSV$ em R1 (Figura 19e) e 53 ± 16 e 54 ± 13 mg PN $g^{-1}SSV$ em R2 (Figura 19f), nas fases I e II, respectivamente. As quantidades de PN apresentaram constância sob diferentes fontes de carbono, no entanto, os valores de PS exibiram uma ligeira diferença entre as fases, em ambos os reatores. No R1, as médias aumentaram de 11 ± 5 para 24 ± 11 mg PS $g^{-1}SSV$ nas fases I e II, respectivamente, enquanto no R2 foi observada uma de redução de 20 ± 11 para 13 ± 5 mg PS g^{-1} . A diferença na proporção de PS influenciou na mudança das razões PN/PS, as quais reduziram-se de 5,5 para 2,7 em R1, enquanto um incremento de 3,3 para 4,6 foi constatado em R2. De acordo com Corsino et al. (2016), como os PS são mais facilmente consumidos pelos microrganismos durante o período de inanição, mais PN é deixada na matriz dos grânulos, a fim

de manter a estrutura destes. Portanto, a combinação de períodos de alimentação e inanição adotada neste estudo controlou o conteúdo da matriz EPS, selecionando mais PN em ambos os reatores.

As EPS presentes na biomassa granular exibem uma estrutura dinâmica de dupla camada, que podem ser classificadas como LB-EPS (do inglês *loosely bound EPS*) e TB-EPS (do inglês *tightly bound EPS*). Tanto o LB-EPS quanto o TB-EPS podem unir células vizinhas na formação de lodo granular. No entanto, as ligações por LB-EPS na camada externa são mais fracas e podem ser facilmente destruídas, levando à erosão celular (LI; YANG, 2007). Por outro lado, na camada interna, o TB-EPS é vinculado de forma consistente e estável à superfície da célula (MOGHADDAM; MOGHADDAM, 2015; TU et al., 2012). De acordo com Sheng et al. (2010), o conteúdo do LB-EPS em agregados microbianos é sempre menor do que o TB-EPS e, portanto, pode apresentar alguma influência nas características dos agregados microbianos. De fato, as concentrações de TB-EPS foram mais elevadas em ambos os reatores, nas duas fases operacionais (Figura 19g e Figura 19h), contudo, vale ressaltar que um teor maior de TB-EPS foi obtido com a mudança da fonte de carbono em R1, aumentando de 55 ± 21 para 84 ± 24 mg TB-EPS g^{-1} SSV, nas fases I e II, respectivamente. Por outro lado, nenhuma alteração nas quantidades foi observada em R2, onde as médias foram de 56 ± 16 e 60 ± 12 mg TB-EPS g^{-1} SSV. As proporções de LB-EPS mostraram comportamento semelhante nos dois reatores, em torno de 15 mg LB-EPS g^{-1} SSV na fase I e redução para aproximadamente 5 mg LB-EPS g^{-1} SSV quando o substrato foi alterado na fase II. De acordo Moghaddam e Moghaddam (2015), supõe-se que o LB-EPS contém uma quantidade abundante de ligações com água, e portanto, uma quantidade maior de LB-EPS pode favorecer a formação de agregados porosos de baixa densidade. De fato, durante a primeira fase, maiores concentrações de LB-EPS foram obtidas na biomassa, enquanto na fase II a diminuição do conteúdo de LB-EPS foi acompanhada com a melhora significativa da capacidade de sedimentação, principalmente no R2 (Figura 19).

O maior conteúdo de TB-EPS no R1 pode ser atribuído ao crescimento de grânulos irregulares com estruturas espalhadas, o que permitiu a penetração de substâncias externas para a camada interna dos grânulos, resultando no menor consumo de TB-EPS como fonte de carbono e energia (LI; YANG, 2007). Além disso, outra causa subjacente para esse fenômeno pode ser as diferentes vias metabólicas dos substratos orgânicos. Por exemplo, o acetato pode entrar no ciclo cítrico diretamente, porém a glicose deve primeiro ser convertida a piruvato e então oxidar para formar acetil-CoA, antes de entrar no metabolismo celular (AKRAM, 2014). Em comparação com a degradação do acetato, o metabolismo da glicose é mais complexo,

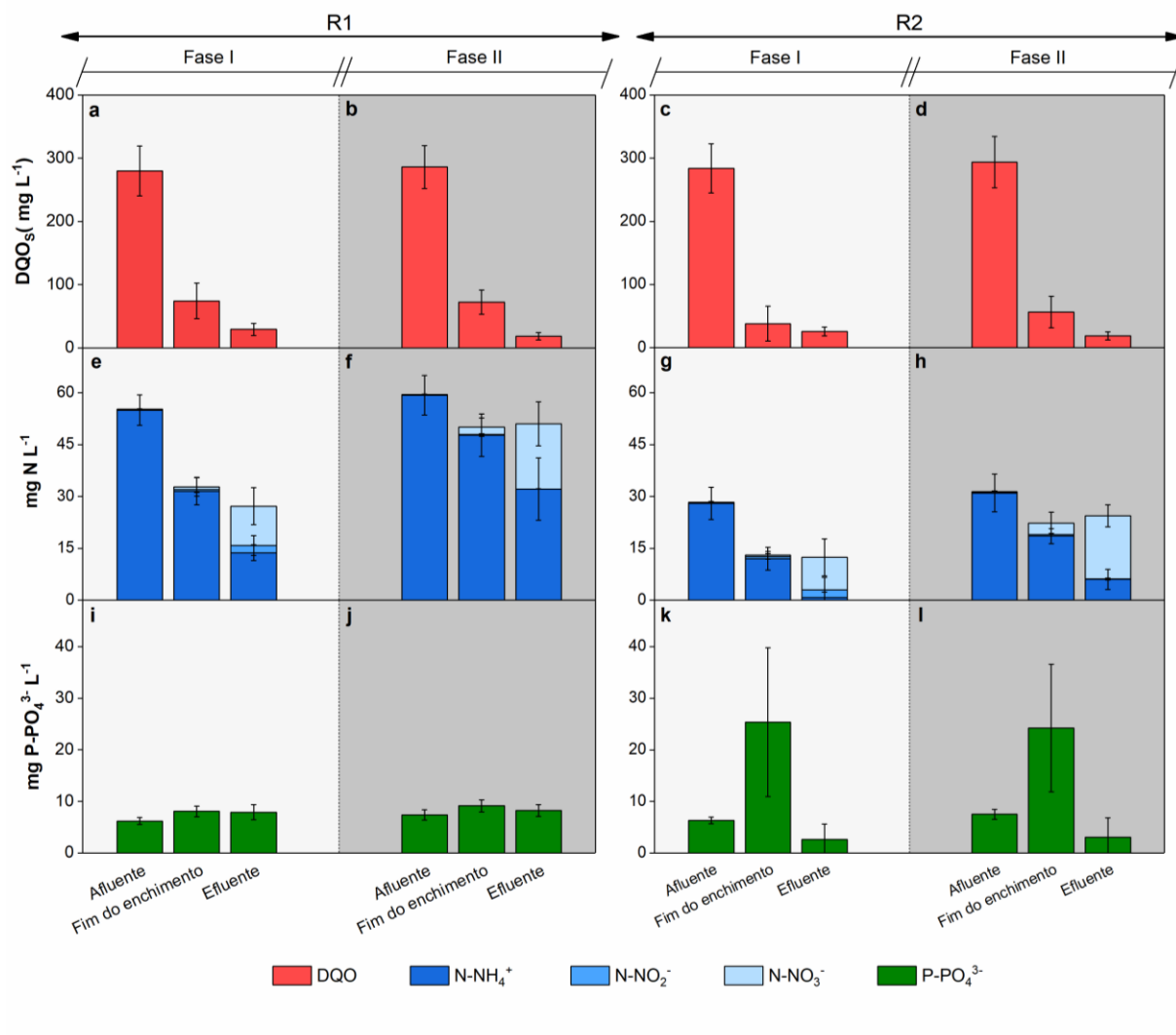
provavelmente envolvendo mais enzimas, incluindo enzimas extracelulares (LI; YANG, 2007). Por outro lado, embora a mudança de substrato pudesse ter elevado a produção de TB-EPS no R2, os grânulos neste reator foram caracterizados como densos e esféricos, o que pode ocasionar a limitação da transferência de massa (JIANG; TAY; TAY, 2002). De acordo com Xuan et al. (2010), isso levará ao consumo de TB-EPS como fonte de carbono e energia durante a fase de inanição (aeração) para manter a auto sobrevivência, devido à escassez de nutrientes nas áreas profundas dos grânulos. Portanto, grânulos mais compactos selecionados no R2, juntamente com períodos de inanição longos, podem ter resultado em um maior consumo de TB-EPS, principalmente na forma de polissacarídeos e, conseqüentemente, uma razão PN/PS mais alta foi obtida em comparação com R1. De acordo com estudos anteriores, maior PN/PS favorece a hidrofobicidade da biomassa, contribuindo para a formação e estabilidade dos sistemas LGA (CAUDAN et al., 2012; MCSWAIN et al., 2005; ZHANG et al., 2018).

4.2.1.3 Desempenho do sistema em termos de carbono, nitrogênio e fósforo

As concentrações de DQOs, compostos nitrogenados e fosfato no afluente sintético, após o enchimento, bem como no efluente tratado estão apresentadas na Figura 20. Ambos os reatores exibiram uma excelente remoção de DQOs, com eficiências de aproximadamente 88 e 93%, com concentrações médias no efluente 26 e 18 mg L⁻¹, ao longo das fases I e II, respectivamente (Figura 20a e Figura 20b). As altas eficiências de remoção alcançadas foram consistentes com o estudo de Layer et al., (2019), onde a remoção de compostos orgânicos foi acima de 90% para efluente sintético, apresentando características similares a deste estudo. Embora a influência de C:N não tenha impactado nas eficiências de remoção total de DQO, pode-se observar que a via metabólica de conversão de carbono apresentou diferença entre os reatores. Após o período de enchimento no R1, anóxico-anaeróbio, aproximadamente 70 mg L⁻¹ de DQOs foi detectado na fração líquida, apontando que a DQO foi parcialmente removida anaerobicamente em ambas as fases deste estudo. Em contrapartida, a concentração de DQOs no final da alimentação era de quase 37 mg L⁻¹ na fase I no R2, enquanto na fase II aumentou para 56 mg L⁻¹. Considerando o fator de diluição do efluente que alimentava o sistema e do efluente tratado remanescente nos reatores, as remoções de DQOs por via anaeróbia ao longo das fases I e II foram de 45 ± 15 e 49 ± 12%, respectivamente no R1, e 72 ± 16 e 60 ± 16% foram obtidas no R2.

Em relação à remoção de nitrogênio, os dois reatores alcançaram nitrificação completa, ou seja, baixa formação de nitrito no efluente ($< 2 \text{ mgN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$). Contudo a relação C:N de 10 aplicada no R2 foi mais favorável, alcançando níveis de nitrificação de 97 ± 4 e $80 \pm 9\%$ ($0,8 \pm 1,5$ e $6 \pm 2 \text{ mgN-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ no efluente) nas fases I e II, respectivamente (Figura 20g e Figura 20h), enquanto 71 ± 4 e $45 \pm 14\%$ (13 ± 2 e $32 \pm 9 \text{ mgN-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ no efluente) foram obtidos sob relação C:N de 5 (R1) (Figura 20e e Figura 20f). A oxidação de nitrogênio amoniacal acima de 95% tem sido reportadas em sistemas LGA tratando efluente sintético (LAYER et al., 2019) e também esgoto sanitário real (PRONK et al., 2015b), com características semelhantes às aplicadas no R2 deste estudo. A baixa nitrificação constatada no R1 pode ser atribuída à falta de alcalinidade no sistema, que será melhor discutido posteriormente

Figura 20: Perfis das concentrações de DQO₅ (a-d), compostos nitrogenados (e-f) e fosfato (i-l) no R1 (lado esquerdo) e R2 (lado direito) durante as fases operacionais I e II.



Além dos distintos níveis de nitrificação, as remoções de fósforo também apresentaram uma diferença substancial entre os reatores. Na Figura 20i e Figura 20j que caracterizam o R1, pode-se observar a baixa atividade de organismos acumuladores de fósforo. Os valores de fosfato no afluente sintético para as fases I e II foram de $6,2 \pm 0,7$ e $6,4 \pm 1,0$ mg P-PO₄³⁻ L⁻¹, respectivamente, enquanto o efluente tratado apresentou médias de $6,9 \pm 1,5$ e $8,2 \pm 1,14$ mg P-PO₄³⁻ L⁻¹, implicando em remoções negativas em ambas as fases sob relação C: N de 5. Por outro lado, remoções de aproximadamente 60% foram alcançadas no R2 (Figura 20k e Figura 20l), com concentração média de efluente de $2,7 \pm 2,5$ e $3,1 \pm 3,7$ mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ para as fases I e II, respectivamente. Os valores obtidos para pH e alcalinidade do sistema, ao longo do ciclo operacional (6 horas), podem ter contribuído para essa diferença nos resultados.

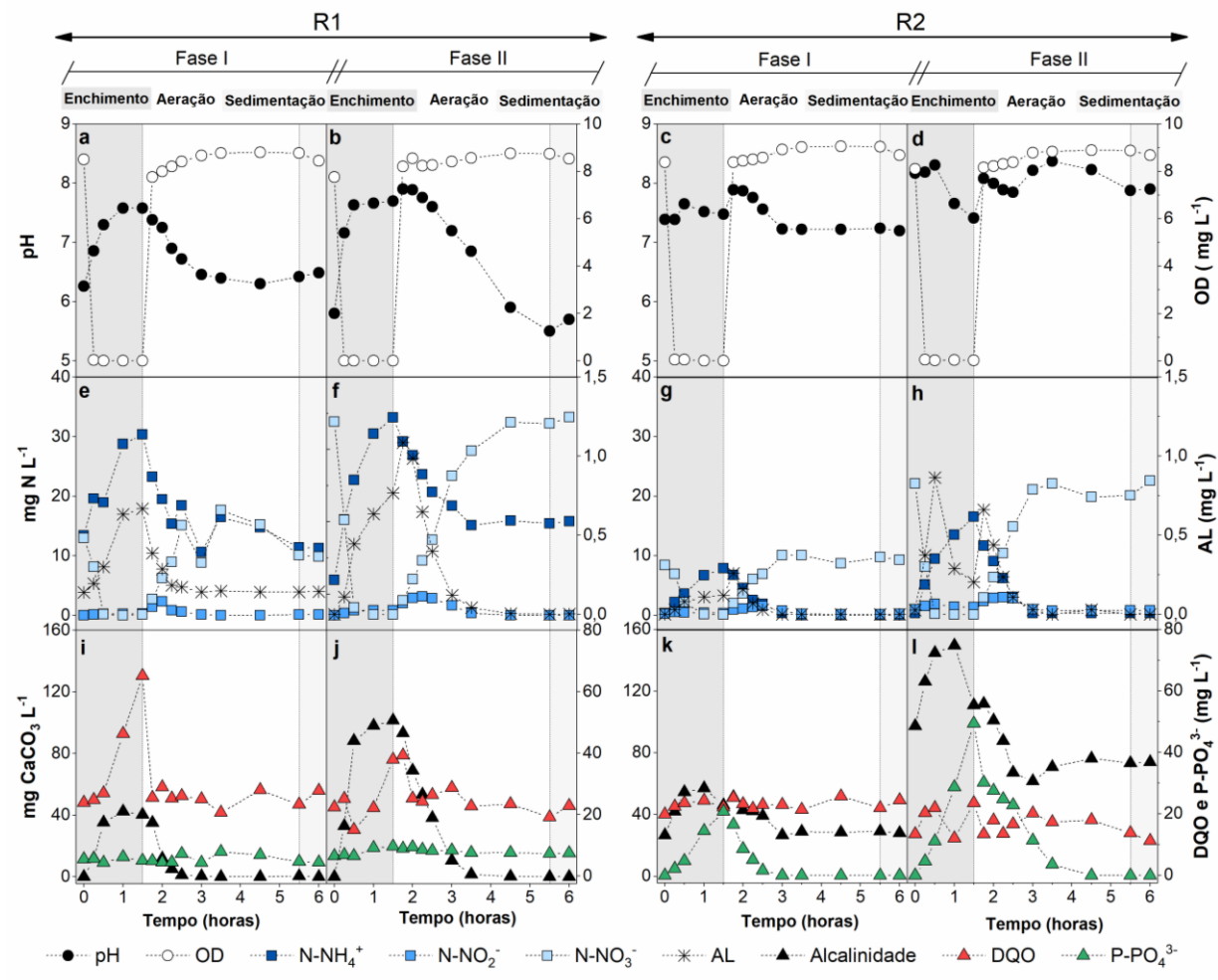
No intuito de amparar os resultados e melhor compreender as conversões dos substratos, a cinética dos reatores foi avaliada, por meio da coleta de amostras ao longo das 6 horas de um ciclo, representando uma batelada completa em cada fase operacional do sistema. Os ciclos mostrados na Figura 21 (a, c, e, g, i e k) correspondem ao 49º dia de operação durante a fase I, enquanto os ciclos da fase II estão na Figura 21 (b, d, f, h, j e l) caracterizando o 147º de monitoramento em ambos os reatores.

O perfil de oxigênio dissolvido (OD) foi bastante similar para todos os ciclos monitorados (Figura 21a, b, c, d). Antes de entrar no sistema, a concentração de OD dos afluentes sintéticos variou entre 0,01 e 0,38 mg L⁻¹ durante todo o período experimental, em ambos os reatores. Após 15 minutos de enchimento, o OD já apresentava valores próximos a zero dentro do sistema, permanecendo até o início da próxima fase. A saturação do oxigênio foi alcançada nos primeiros minutos de aeração, atingindo concentração em torno de 9 mg L⁻¹, mantendo-se constante até a sedimentação. Após a aeração ser desligada, o OD permaneceu próximo a 8 mg L⁻¹ na fração líquida durante o período de sedimentação, até o próximo ciclo iniciar.

O pH do afluente sintético aplicado no R1 variou entre 7,13 e 7,71 durante a fase I, enquanto no R2 os valores ficaram entre 7,16 e 8,16. Na fase II, devido a adição dos aminoácidos no afluente, o pH apresentou uma pequena redução, variando entre 6,25 e 7,45 no R1 e 6,41 e 7,48 no R2. O pH tem forte relação com as conversões de nitrogênio, o qual aumenta com a reação de desnitrificação e diminui com o processo de nitrificação (HOFFMANN et al., 2007). Essa associação pode ser observada claramente no R1 (Figura 21a e Figura 21b). Durante a fase de alimentação ocorreu o consumo de N-NO₃⁻ (Figura 21e e Figura 21f), devido ao processo de desnitrificação, implicando na recuperação da alcalinidade e consequentemente

aumentando o pH, enquanto na fase de aeração, a formação de N-NO_3^- foi acompanhada pela produção de H^+ , resultando na diminuição do pH (Figura 21a e Figura 21b).

Figura 21: Perfis de ciclo de oxigênio dissolvido (OD) e pH (a, b, c e d); compostos de nitrogenados e amônia livre (AL) (e, f, g e h); e DQOs, P-PO_4^{3-} e alcalinidade (i, j, k e l) em R1 (lado esquerdo) e R2 (lado direito). Os experimentos foram realizados no 49º dia de operação para fase I e também após 147 dias de monitoramento, representando o 49º dia da fase II. As concentrações do afluente não estão plotadas, foi considerado somente as medições na fração líquida dentro dos reatores. Os valores médios de DQOs, N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} no afluente do R1 foram $255 \pm 37 \text{ mg L}^{-1}$, $52 \pm 7 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ e $6,2 \pm 1,3 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$, respectivamente, enquanto $252 \pm 39 \text{ mg L}^{-1}$, $26 \pm 6 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ e $6,3 \pm 1,3 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ foram mensurados no R2.



No R2, o sistema apresentou aparentemente um maior tamponamento, com pouca mudança no perfil do pH, no entanto as Figura 21k e Figura 21l mostram um aumento da alcalinidade, seguido do consumo, nas fases de enchimento e aeração, respectivamente, indicando o processo de desnitrificação (redução de N-NO_3^-) e nitrificação ao longo desses ciclos (Figura 21g e Figura 21h). Além disso, o pH define o equilíbrio entre NH_4^+ e amônia livre (AL), sendo fator de toxicidade, interferindo na atividade das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e nitrito (BON) (ANTHONISEN et al., 1976; GUIMARÃES et al., 2017). Em

R1, a formação de AL atingiu $0,59 \text{ mg L}^{-1}$ sob condições próximas da neutralidade ($\text{pH} \sim 7,3$) durante a fase I (Figura 21e), enquanto concentrações mais elevadas foram formadas na fase II ($1,1 \text{ mg AL L}^{-1}$) sob condições de pH alcalino ($\sim 8,0$). Para os ciclos mostrados, o sistema apresentou efluente com concentrações de nitrogênio amoniacal de $11,2$ e $15,7 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ N L}^{-1}$ nas fases I e II, respectivamente, porém um acúmulo de nitrato pôde ser observado, principalmente na fase II, onde a concentração de nitrato atingiu $33 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ (Figura 21e Figura 21f). Por outro lado, menores concentrações de AL foram formadas em ambas as fases no R2 ($0,25$ e $0,68 \text{ mg AL L}^{-1}$) (Figura 21g e Figura 21h). O efluente apresentou baixas concentrações de nitrogênio amoniacal nas fases I e II ($0,47$ e $1,0 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ N L}^{-1}$), porém o acúmulo de nitrato também foi observado na fase II ($22 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$).

A atividade da biomassa, em termos de compostos nitrogenados, foi afetada com a alteração da fonte de carbono no R1, como pode ser observado na Tabela 8. Durante a primeira fase, as velocidades de consumo ($q_{\text{NO}_3^-}$ - consumo) e produção ($q_{\text{NO}_3^-}$ - produção) de nitrato foram $0,007 \pm 0,004$ e $0,015 \pm 0,006 \text{ g N-NO}_3^- \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$, respectivamente, enquanto na fase II foram obtidas médias de $0,005 \pm 0,005$ e $0,014 \pm 0,006 \text{ g N-NO}_3^- \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$. A velocidade de remoção de nitrogênio amoniacal ($q_{\text{NH}_4^+}$) também foi aproximadamente duas vezes menor na fase II quando comparada à fase I no R1 (Tabela 8). Essas reduções da atividade influenciaram diretamente as eficiências de remoção de nitrogênio total do sistema, onde para a fase I foi obtido média de $36 \pm 6\%$ reduzindo para $20 \pm 9\%$ na fase II, implicando no aumento da concentração do efluente de 39 ± 6 para $51 \pm 9 \text{ mg N L}^{-1}$, respectivamente.

No R2 não foram encontradas diferenças significativas entre as velocidades de consumo de nitrato ($p > 0,005$), enquanto um aumento foi constatado na produção deste composto, quando o substrato orgânico foi alterado (Tabela 8). Quanto aos valores de $q_{\text{NH}_4^+}$ ao longo das fases I e II foram obtidas médias de $0,03 \pm 0,01$ e $0,02 \pm 0,01 \text{ g N-NH}_4^+ \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$, respectivamente. O acúmulo de nitrato ao longo da fase II, implicou na redução de remoção de nitrogênio total de 58% para 20% no R2, e um aumento na concentração efluente de 12 ± 5 para $24 \pm 5 \text{ mg N L}^{-1}$ nas fases I e II, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos durante o estudo no SE-I, operando o reator com troca volumétrica de 50% e ciclo operacional de 6 horas, tratando esgoto sanitário (item 4.1.1.2 e Tabela 6), com valores de $0,004 \text{ g N-NO}_3^- \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$, $0,017 \text{ g N-NO}_3^- \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$ e $0,050 \text{ g N-NH}_4^+ \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$ para $q_{\text{NO}_3^-}$ - consumo, $q_{\text{NO}_3^-}$ - produção e $q_{\text{NH}_4^+}$ respectivamente. Em contrapartida, Jungles et al. (2017) obtiveram valores de $0,22 \text{ g N-NH}_4^+ \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$, enquanto Guimarães et

al. (2018) apresentaram velocidades específicas de produção de nitrato e remoção de nitrogênio amoniacal de $0,07 \text{ g N-NO}_3^- \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$ e $0,18 \text{ g N-NH}_4^+ \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$, em estudos conduzidos em reatores alimentados com pulso único, na ausência de fase anaeróbia/anóxica, priorizando o metabolismo aeróbio, com tempo ciclo de 4 horas.

Tabela 8: Atividade da biomassa (q) em termos de velocidades de consumo e produção de compostos orgânicos (DQOs), nitrogenados (N-NH₄⁺, N-NO₃⁻) e fosfatados (P-PO₄³⁻).

Parâmetros	Unidades	R1 (C:N = 5)		R2 (C:N= 10)	
		Fase I (Substrato simples)	Fase II (Substrato complexo)	Fase I (Substrato simples)	Fase I (Substrato complexo)
qDQO-enchimento ^a	$\text{gDQO}_s \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$	$0,098 \pm 0,042$	$0,060 \pm 0,022$	$0,140 \pm 0,040$	$0,080 \pm 0,020$
qDQO - aeróbio ^b	$\text{gDQO}_s \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$	$0,067 \pm 0,040$	$0,046 \pm 0,016$	$0,190 \pm 0,200$	$0,360 \pm 0,240$
qNH ₄ ⁺	$\text{gN-NH}_4^+ \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$	$0,050 \pm 0,020$	$0,020 \pm 0,010$	$0,030 \pm 0,010$	$0,020 \pm 0,010$
qNO ₃ ⁻ - consumo ^a	$\text{g N-NO}_3^- \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$	$0,007 \pm 0,004$	$0,005 \pm 0,005$	$0,006 \pm 0,003$	$0,006 \pm 0,003$
qNO ₃ ⁻ - produção ^b	$\text{g N-NO}_3^- \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$	$0,015 \pm 0,006$	$0,014 \pm 0,006$	$0,012 \pm 0,007$	$0,014 \pm 0,005$
qP- liberação ^a	$\text{g P-PO}_4^{3-} \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$	$0,002 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,025$	$0,017 \pm 0,014$
qP- captação ^b	$\text{g P-PO}_4^{3-} \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$	$0,001 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0,001$	$0,032 \pm 0,027$	$0,019 \pm 0,015$

^a Velocidade de remoção específica durante a fase de alimentação. As concentrações iniciais ($t = 0$) para os cálculos foram baseadas em concentrações teóricas se o reator fosse alimentado de uma só vez, ao invés de fluxo em pistão ao longo de 90 min. Para tal, foram utilizadas concentrações medidas no esgoto sanitário e no efluente tratado.

^b Velocidade de remoção específica durante a fase de aeração. Essas foram calculadas a partir das concentrações reais medidas no fim da fase de enchimento e da saída do reator (efluente tratado).

Em teoria, a principal vantagem dos sistemas LGA é a possibilidade da nitrificação e desnitrificação ocorrerem simultaneamente (NDS) durante a fase aeróbia. No entanto, esse processo é dependente de vários aspectos, principalmente da concentração de OD na fração líquida e do tamanho dos grânulos (LAYER et al., 2020). De fato, a NDS não foi alcançada nesse estudo, com acumulação de nitrato no efluente em ambos os reatores (Figura 20 e Figura 21). A concentração de OD durante a aeração pode ser atribuída como o fator limitante, que impediu a reação simultânea. Após 15 minutos de aeração, ambos os reatores já apresentavam concentrações de OD na saturação ($\sim 9 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) (Figura 21a, b c e d), permanecendo durante as quatro horas desta fase. Pronk et al. (2015b) alcançaram desnitrificação em sistema LGA durante a fase de aeração, em uma planta de escala real, tratando esgoto sanitário. Entretanto, o nitrato foi reduzido quando a concentração de OD foi reduzida de 4 para $0,5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, após todo o nitrogênio amoniacal ser oxidado. De acordo com Layer et al. (2020), a NDS só pode

ser alcançada quando a saturação de OD varia entre 14 e 39% em sistemas LGA, com biomassa apresentando diâmetro de 500 μ m. Dessa forma, os altos níveis de saturação deste estudo foram favoráveis à oxidação do nitrogênio amoniacal, mas impediram a redução do nitrato simultaneamente.

O enchimento lento com agitação mecânica foi aplicado, em ambos os reatores, com o objetivo de promover maior contato entre a biomassa e o substrato, a fim de favorecer a conversão da matéria orgânica de forma anaeróbia. Essas características são pré-requisitos para proporcionar o desenvolvimento de microrganismos de crescimento lento, como os organismos acumuladores de fósforo (PAO), desejáveis para remoção biológica de fósforo e também para estabilidade da biomassa granular (DE KREUK; VAN LOOSDRECHT, 2004). Dado os resultados apresentados na Figura 20 e também comparando os ciclos operacionais entre R1 e R2 apresentados na Figura 21, pode-se observar uma diferença substancial das atividades desses microrganismos no consumo e na liberação de P-PO₄³⁻ entre o R1 e R2.

Na Figura 21k e Figura 21l que caracterizam as fases I e II no R2, respectivamente, observa-se a contínua liberação de P-PO₄³⁻ na fase de enchimento, enquanto o perfil de DQO_s não mostrou alterações, sugerindo que o carbono era utilizado quase que instantaneamente por organismos desnitrificantes (N-NO₃⁻ < 0,11 mg N-NO₃⁻ L⁻¹) e também pelas PAO. No final da fase de alimentação, a fração líquida apresentou valores de 21 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ (Figura 21k) e 49 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ (Figura 21l), enquanto a DQO_s manteve-se em aproximadamente 22 mg L⁻¹ em ambas as fases. Na sequência, em condições aeróbias, o fosfato foi capturado, atingindo concentrações próximas a 0 após 1,5 e 3 horas nas fases I e II, respectivamente, e valores de 24 e 11 mg L⁻¹ de DQO_s no efluente.

As velocidades de liberação (q_p - liberação) e captação (q_p - captação) de fosfato, bem como as velocidades de consumo específicas de DQO durante a fase de enchimento (q_{DQO} -enchimento) no R2, foram aproximadamente duas vezes menores na fase II, quando comparadas à fase I (Tabela 8). Por outro lado, as velocidades de consumo específicas de DQO na fase de aeração foram duas vezes maiores na fase II ($0,36 \pm 0,24$ g DQO_s d⁻¹ g⁻¹SSV) que na fase I ($0,19 \pm 0,20$ g DQO_s d⁻¹ g⁻¹SSV), apontando um aumento no metabolismo aeróbio quando o R2 foi submetido a fontes de substratos orgânicos com cadeias mais complexas. Isso pode ser atribuído ao escape de DQO_s para fase aeróbia observado na fase II (Figura 20d), uma vez que foi constatado a redução da eficiência de remoção anaeróbia de carbono de 72 para 60%, e conseqüentemente o aumento da concentração de DQO_s na fração líquida no início da fase aerada.

Em contrapartida, durante a operação do R1, a atividades das PAO foi praticamente nula (Figura 21i , Figura 21j) em ambas as estratégias operacionais (Tabela 8). Dessa forma, supõe-se que o carbono do afluente foi utilizado somente para redução do nitrato ($< 0,11 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$), implicando em remoção parcial da DQO_S durante a fase anaeróbia, uma vez que no fim da fase de enchimento, valores de 65 mg L^{-1} (Figura 21i) e 40 mg L^{-1} (Figura 21j) de DQO_S foram mensuradas nos ciclos monitorados das fases I e II, respectivamente. Quanto às velocidades de remoções específicas de substrato orgânico nas fases de enchimento e durante a aeração, foi observada uma redução de $0,098 \pm 0,042$ para $0,060 \pm 0,022 \text{ g DQO}_S \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$ na $q_{\text{DQO-enchimento}}$, e de $0,067 \pm 0,040$ para $0,046 \pm 0,016 \text{ g DQO}_S \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$ no metabolismo aeróbio ($q_{\text{DQO-aeração}}$) nas fases I e II, respectivamente.

De modo geral, a atividade dos microrganismos durante a fase II apresentou valores inferiores quando comparada à fase I em ambos os reatores. Isso pode ser explicado envolvendo a via metabólica específica da degradação dos compostos carbonados presentes no afluente. Como apresentado na seção 4.2.1.2, o acetato tem uma via simples, uma vez que é oxidado forma diretamente acetil-CoA, e logo inserido no metabolismo no ácido cítrico (AKRAM, 2014). Presumivelmente, os AGV mais complexos, neste caso, o propionato são utilizados por outras vias mais intrincadas, passando por oxidações sequenciais (ELEFSINIOTIS; WAREHAM; SMITH, 2004; YANG; WANG; ZHOU, 2012). No entanto, durante a fase II, o substrato orgânico no afluente era composto ainda por glicose e aminoácidos. A glicose é primeiramente degradada a piruvato para então formar acetil-CoA. Exceto a leucina que já é convertida em acetil-CoA, outros aminoácidos adicionados no afluente apresentam um metabolismo mais complexo, envolvendo também um produto intermediário. A alanina, glicina são também convertidas primeiramente a piruvato, enquanto arginina, glutamina e a prolina são degradadas a glutamato antes de entrar no ciclo do ácido cítrico (AKRAM, 2014). Dessa forma, as vias metabólicas complexas de aproximadamente 75% dos substratos orgânicos do afluente na fase II poderiam resultar em velocidades específicas menores, quando comparadas à fase I, onde apenas acetato e propionato foram utilizados como fonte de carbono.

As principais diferenças quanto às remoções de nutrientes entre o R1 e R2 foram em termos de nitrogênio e fósforo, como apresentados na Figura 20 e Figura 21. Os valores inferiores obtidos na nitrificação no R1, podem estar ligados diretamente à baixa concentração de alcalinidade na fração líquida no sistema. Observa-se nas FigurasFigura 21e e Figura 21f que, após 3 horas de ciclo, os valores de nitrogênio amoniacal estavam em aproximadamente 10 e $15 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ nas fases I e II, respectivamente, mantendo-se até fim da fase aerada,

enquanto a alcalinidade atingia valores próximos de 0 (Figura 21i e Figura 21j). Estima-se que para oxidação de 1 g de N-NH_4^+ à N-NO_3^- são necessários 7,1 mg de CaCO_3 (HOFFMANN et al., 2007). Na Figura 21e e Figura 21f, os valores de N-NH_4^+ no início da aeração eram de aproximadamente $30 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ em ambas as fases operacionais, dessa forma seria necessário cerca de $200 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ na fração líquida para a completa nitrificação, porém apenas 42 e $101 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ foram obtidos nas fases I e II respectivamente. Embora $150 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ foram adicionados do afluente nos dois reatores, no intuito de manter o pH em torno de 7,0, em ambas as fases operacionais, para o R1 não foi suficiente, interferindo na capacidade de remoção de nitrogênio neste reator.

Por outro lado, observa-se quantidades mais elevadas de alcalinidade no R2, atingindo 51 e $150 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ nas fases I e II (Figura 21k e Figura 21l), respectivamente, enquanto concentrações menores ($\text{C:N} = 10$) de 8 e $16 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ foram mensuradas no fim do enchimento (Figura 21g e Figura 21h). Após 3 horas de ciclo o nitrogênio amoniacal já havia oxidado e concentrações de $28 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 21k) e $70 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 21l) foram mantidas no sistema. O acúmulo de alcalinidade no R2 proporcionou um maior tamponamento na fração líquida, mantendo condições alcalinas ($\text{pH} > 7,5$) em ambas as fases operacionais. Esse comportamento pode também ser associado a melhor atividade dos organismos acumuladores de fósforo observadas nesse reator.

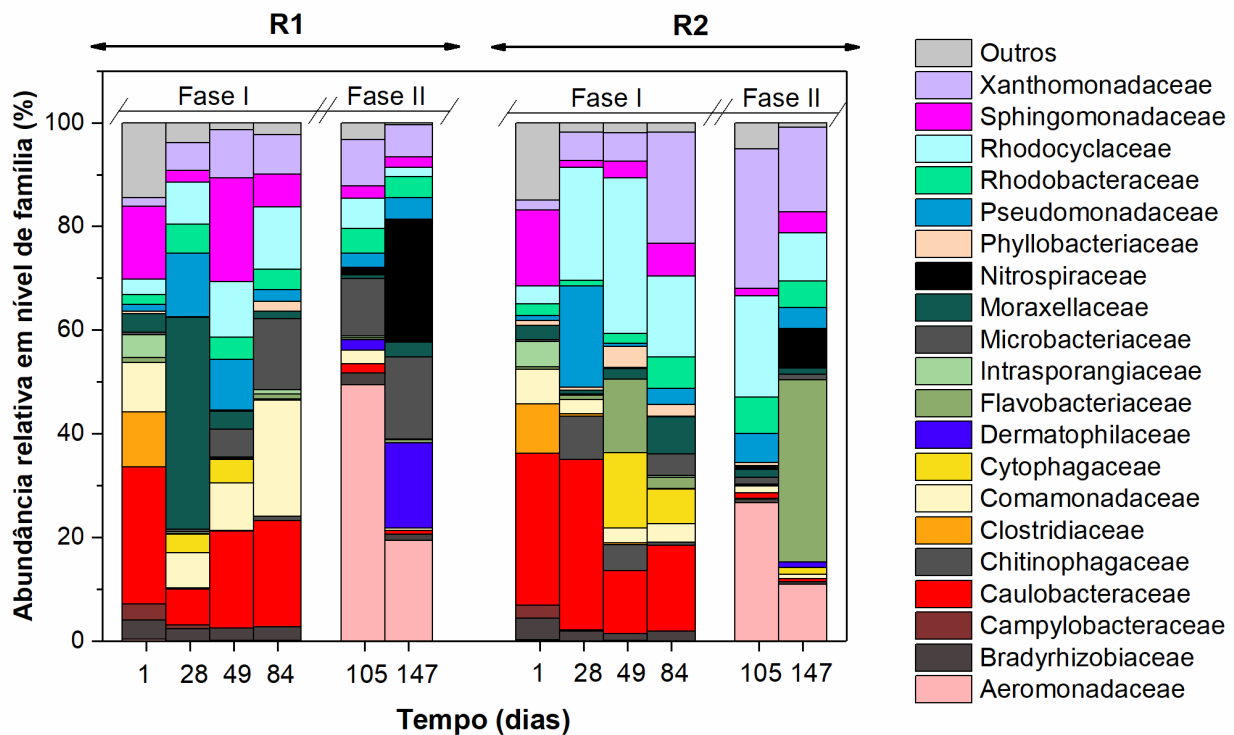
As mesmas condições adequadas para os organismos PAO favorecem também os organismos acumuladores de glicogênio (GAO). Apesar de GAO serem organismos heterotróficos de crescimento lento, e favoráveis para manter a estabilidade de sistemas LGA, PAO são desejáveis, devido o metabolismo envolver a absorção de fosfato. Fatores como o tipo de fonte de carbono no afluente (acetato, propionato etc.), carga de fósforo, razão carbono fósforo (C:P) no afluente, pH e temperatura foram apontados como determinantes na competição entre PAO e GAO (RUBIO-RINCÓN et al., 2017; WEISSBRODT et al., 2013). Neste estudo, a diferença entre R1 e R2 residiu apenas no pH na fração líquida, uma vez que o substrato orgânico, a relação C:P e temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ foram mantidos iguais em ambos os reatores. De acordo com Weissbrodt et al. (2013), pH maior que 7,3 e temperaturas em torno de 15°C são favoráveis para as PAO. No entanto, os autores relataram que as PAO são capazes de competir com GAO, mesmo em temperaturas mesofílicas, desde que sejam proporcionadas condições alcalinas. Dessa forma, o meio alcalino assegurado no R2 foi favorável para alcançar maiores remoções de fósforo ($> 60\%$), enquanto a deficiência de alcalinidade no R1 foi

determinante também na atividade das PAO, implicando em baixas remoções de fósforo em ambas as fases operacionais, bem como de nitrogênio.

4.2.1.4 Ecologia microbiana

As comunidades bacterianas foram verificadas utilizando-se o método avançado de sequenciamento de *amplicon* de nova geração e alta resolução. As abundâncias relativas da composição predominante em nível de família estão apresentadas na Figura 22, onde pode-se observar que, além das flutuações das comunidades microbianas, houve diferenças entre organismos quando as duas relações C:N são comparadas, e também quando a fonte de substrato orgânico foi alterada, sugerindo que as diferentes condições operacionais aplicadas foram capazes de selecionar populações microbianas distintas. A classificação em nível de gênero encontra-se no Apêndice B deste documento.

Figura 22: Dinâmica da comunidade bacteriana em nível de família nas fases I e II, no R1(lado esquerdo) e R2 (lado direito). OTUs com abundância relativa menor que 3% foram incluídos em “outros”. O gráfico em nível de gênero é fornecido no Apêndice B.



Membros das famílias *Clostridiaceae* e *Intrasporangiaceae* foram detectadas após a inoculação, com abundâncias relativas de 10 e 5 %, respectivamente, mas posteriormente diminuíram quando a fonte de alimentação passou a ser efluente sintético. Os gêneros

Clostridium (família *Clostridiaceae*) e *Tetrasphaera* (*Intrasporangiaceae*) são conhecidos como bactérias fermentativas, comumente encontradas em estações de tratamento com lodo ativado. *Tetrasphaera* também é conhecida como PAO, geralmente mais abundante que *Ca. Accumulibacter* no tratamento de esgoto sanitário (AIDAN AL-HUSSIENY et al., 2014; LAYER et al., 2019; WANG et al., 2007a). O gênero *Phenylobacterium*, pertencente a família *Caulobacteraceae*, foi detectado com abundância relativa de aproximadamente 14% no inóculo (dia 1). No entanto, a partir de 28 dias de monitoramento, *Brevundimonas* foram selecionadas, mantendo a abundância relativa de *Caulobacteraceae* em 20 e 16%, em R1 e R2, respectivamente, ao longo da fase I. De acordo com Wang et al. (2015), estes organismos aeróbios desempenharam um papel importante na bioaumentação de flocos de lodo ativado. Dessa forma, supõe-se que o aumento progressivo dessa população pode estar ligado ao processo de granulação, principalmente no R1, no qual a formação dos agregados foi mais rápida.

Quanto a relação C:N, as famílias *Comamonadaceae* (gênero *Comamonas*) e *Microbacteriaceae*, conhecidas como organismos heterotróficos nitrificantes, foram selecionadas com abundâncias relativas de 22% e 15% (dia 84), respectivamente, sob concentração de nitrogênio amoniacal maior (R1). Ambas as populações podem estar relacionadas ainda com a irregularidade da superfície dos grânulos constatados no R1, uma vez que foram reportadas como bactérias de crescimento rápido (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2018; LV et al., 2014; RAMOS; SUÁREZ-OJEDA; CARRERA, 2016). Outras populações como *Thauera* (família *Rhodocyclaceae*) e *Xanthomonas* (família *Xanthomonadaceae*) descritas como desnitrificantes heterotróficas e produtoras de EPS (WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014; ZHANG et al., 2018) também foram selecionadas sob relação C:N menor, com aproximadamente 9% das sequências lidas. O gênero *Thauera* pode ainda ser associado à alta tolerância a amônia livre e também já foi reportado como organismos predominantes no tratamento de efluentes com baixa relação C:N (5) (ZHANG et al., 2018).

Por outro lado, *Zooglea* e *Azospira*, membros da família *Rhodocyclaceae*, foram favorecidos no R2 (C:N maior), atingindo abundância relativa de 17% (dia 105) e 20% (dia 49). *Zooglea* são bactérias desnitrificantes de crescimento rápido e também são correlacionadas ao metabolismo de EPS (LI et al., 2008; WEISSBRODT; SHANI; HOLLIGER, 2014). Aparentemente, de acordo com Weissbrodt et al. (2014), a fisiologia de organismos semelhantes a *Zoogloea* e outros organismos afiliados a *Rhodocyclales* pode ser relevante para a coesão de grânulos aeróbios. Dessa forma, a proliferação desses organismos correlacionou

positivamente com a granulação no R2, assim como já observado por outros estudos em sistema LGA (LAYER et al., 2019; WEISSBRODT et al., 2012). A família *Flavobacteriaceae* (gênero *Flavobacterium*) foi encontrada com alta abundância relativa (14-35%) no R2, e também é associada a formação de grânulos maduros e estáveis (LI et al., 2014b; SCHAMBECK et al., 2020). Membros do gênero *Tahibacter* (família *Xanthomonadaceae*) aumentaram progressivamente a abundância relativa, alcançando 26% no dia 105 no R2. Esses organismos heterotróficos podem ser um filótipo desnitrificante no sistema, uma vez que cepas isoladas de lodo ativado tiveram a capacidade metabólica de reduzir aerobicamente nitrato a nitrito (WU et al., 2015), corroborando as maiores remoções de nitrogênio neste reator.

A alteração da fonte de substrato na fase II influenciou substancialmente a comunidade bacteriana em ambos os reatores. Bactérias do gênero *Aeromonas*, pertencentes a família *Aeromonadaceae*, foram detectadas no dia 105, com abundância relativa predominante de 49 e 26% no R1 e R2, respectivamente. Esses organismos são classificados como anaeróbios facultativos e frequentemente encontrados em sistemas de lodo ativado convencional, onde estão envolvidos na degradação da matéria orgânica e na redução do nitrato a nitrito (NSABIMANA; BELAN; BOHATIER, 2000; VUKOVIĆ; RUNJAVEC; MEŠTROVIĆ, 2019). Ademais, pressupõe-se que devido ao metabolismo capaz de fermentar a glicose, esses organismos foram mais competitivos, quando este substrato foi inserido no afluente da fase II. Bactérias envolvidas na oxidação do nitrogênio amoniacal, como a família *Nitrospiraceae*, também foram detectadas na fase II, com representatividade de 23% e 8%, no R1 e R2, respectivamente. O surgimento desse grupo de microrganismos pode estar associado a maior regularidade da superfície dos agregados nesta fase, uma vez que possuem metabolismo autotrófico e apresentam baixa velocidade de crescimento (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007). Além disso, na fase II foi constatado maior acúmulo de nitrato em ambos os reatores, o que corrobora a maior abundância de *Nitrospira* nesta fase. Membros isolados da família *Dermatophilaceae* (gênero *Kineosphaera*) foram detectados no R1, com abundância relativa de 17% no fim do período experimental (dia 154). De acordo com Liu et al. (2002), *Kineosphaera* são bactérias aeróbias capazes de acumular quantidades significativas de polihidroxialcanoatos (PHA), sendo encontradas em reator de lodo ativado com remoção biológica de fósforo ineficiente.

Outros organismos desnitrificantes, como *Pseudomonadaceae* e os gêneros *Paracoccus* e *Rhodobacter* (família *Rhodobacteraceae*), não apresentaram distinção entre as relações C:N e fontes de substratos, mantendo em aproximadamente entre 5% e 10% das sequências lidas

após a inoculação. Na Tabela 9 tem-se um resumo das interações observadas na ecologia microbiana quanto às relações C:N e diferentes fontes de substrato orgânico.

Tabela 9: Resumo dos principais grupos e possíveis funções encontradas na ecologia microbiana quanto às relações C:N e diferentes fontes de substrato orgânico. = não foram observadas diferenças na abundância relativa; + maior abundância relativa; - menor abundância relativa. DOHO-Organismos heterófitos ordinários desnitrificantes; NH- nitrificantes heterotróficos; OPHA-Organismo acumuladores de PHA; BON- Bactérias oxidadoras de nitrito.

Família (Gênero)	Função/ metabolismo	C:N=5	vs.	CN=10	Efluente Simples	vs.	Efluente complexo
<i>Aeromonadaceae</i> (<i>Aeromonas</i>)	DOHO	=		=	-		+
<i>Caulobacteraceae</i> (<i>Brevundimonas</i>)	DOHO	=		=	+		-
<i>Comamonadaceae</i> (<i>Comamonas</i>)	DOHO e NH	+		-	+		-
<i>Dermatophilaceae</i> (<i>Kineosphaera</i>)	OPHA	+		-	-		+
<i>Flavobacteriaceae</i> (<i>Flavobacterium</i>)	DOHO/ EPS	-		+	-		+
<i>Nitrospiraceae</i> (<i>Nitrospira</i>)	BON	+		-	-		+
<i>Pseudomonadaceae</i> (<i>Pseudomonas</i>)	DOHO	=		=	=		=
<i>Rhodobacteraceae</i> (<i>Paracoccus</i>)	DOHO	=		=	=		=
<i>Rhodobacteraceae</i> (<i>Rhodobacter</i>)	DOHO	=		=	=		=
<i>Rhodocyclaceae</i> (<i>Thauera</i>)	DOHO/ EPS	+		-	+		-
<i>Rhodocyclaceae</i> (<i>Zooglea</i>)	DOHO/ EPS	-		+	=		=
<i>Rhodocyclaceae</i> (<i>Azospira</i>)	DOHO/EPS	-		+	+		-
<i>Xanthomonadaceae</i> (<i>Xanthomonas</i>)	DOHO/ EPS	+		-	=		=
<i>Xanthomonadaceae</i> (<i>Tahibacter</i>)	DOHO	-		+	=		=

No geral, em ambos os reatores foram selecionados organismos desnitrificantes, os quais por serem facultativos e de crescimento rápido, se sobressaem facilmente frente às outras populações, mas sua atuação no processo de desnitrificação está limitada ao carbono orgânico disponível e à condição de anoxia apropriada. No entanto, por mais que eles tenham predominado, não contribuíram para uma maior atividade desnitrificante, principalmente no R1, uma vez que esses organismos também podem utilizar o oxigênio como receptor de elétrons.

4.2.2 Conclusões

- Apesar da granulação ser favorecida sob relação C:N de 5, na qual 40% dos grânulos apresentaram diâmetro (D) acima de 500 μm , na C:N de 10 foram desenvolvidos grânulos menores ($200 \mu\text{m} < D < 500 \mu\text{m}$) com morfologia uniforme e ótima sedimentabilidade (IVL_{30} e $IVL_5 < 30 \text{ mL gSST L}^{-1}$). As proteínas foram a componente predominante na matriz EPS, quando comparadas aos polissacarídeos em ambas as relações C:N. A razão PN/PS foi influenciada pela composição do carbono no afluente, houve aumento da produção de PS sob relação C:N de 5 e o consumo na relação C:N de 10, implicando também nas frações de TB-EPS e LB-EPS.
- Altas de remoções de carbono ($\sim 90\%$) e nitrificação completa ($\text{N-NO}_2^- < 2 \text{ mg L}^{-1}$ no efluente) foram alcançadas em ambas as relações C:N e para os diferentes substratos orgânicos. A oxidação do nitrogênio amoniacal alcançou 90% na C:N de 10. Entretanto, sob relação C:N de 5, os valores foram inferiores (71% e 45%), devido à falta de alcalinidade no sistema. A baixa alcalinidade também foi um fator determinante na remoção do fósforo, influenciando na atividade das PAO. A complexidade do substrato orgânico influenciou nas atividades dos microrganismos, devido aos produtos intermediários das vias metabólicas da glicose e aminoácidos.
- Organismos nitrificantes heterotróficos (*Comamonadaceae* e *Microbacteriaceae*) e desnitrificantes produtores de EPS (*Thauera* e *Xanthomonas*) foram selecionadas na relação C:N de 5, enquanto organismos associados à estabilidade da biomassa granular foram favorecidos na C:N de 10 (*Zooglea* e *Flavobacterium*), corroborando a formação de grânulos

maduros e estáveis. A adição de glicose no efluente proporcionou a proliferação de organismos fermentativos como *Aeromonadaceae* com alta abundância relativa (~40%).

4.3 DISCUSSÃO INTEGRADA

A presente tese de doutorado partiu da investigação de um sistema em escala piloto alimentado com esgoto sanitário, o qual se aproximou das circunstâncias reais de uma estação de tratamento de efluentes (SE-I), em direção a um sistema de escala bancada sob condições controladas (SE-II), envolvendo a granulação aeróbia, manutenção da estabilidade e atividade biológica. Dessa forma, considerando as diferentes configurações operacionais, é importante realizar uma análise abrangente, compreendendo as correlações, a fim de apontar as convergências e divergências entre os resultados obtidos na pesquisa.

No primeiro estudo, desenvolvido no reator em escala piloto (1m³), a estabilidade da biomassa granular foi estudada por meio de duas estratégias operacionais, diferenciadas pela relação de troca volumétrica, a fim de aumentar a COV, melhorando a estabilidade dos grânulos e a capacidade de conversão do sistema. Em ambas as estratégias, o RBS foi operado com volume constante, no qual o ciclo compreendia fases de enchimento e descarte simultâneas (90 min), seguidas de fase de aeração (240 min) e de sedimentação (30 min), totalizando 6 horas de tempo total de ciclo. Na primeira estratégia operacional (E-1), quando o RBS foi operado com relação de troca volumétrica de 50%, a granulação da biomassa ocorreu de forma rápida (20 dias). Os agregados formados apresentaram diâmetros pequenos (212 – 300 µm), com morfologia homogênea. A relação de troca volumétrica de 75% aplicada na segunda estratégia (E-2), induziu uma granulação mais lenta e progressiva, selecionando agregados de maior tamanho (300-600 µm), mas com estrutura irregular. Esse comportamento pode ser atribuído à maior carga particulada no sistema, uma vez que o tempo de contato entre a biomassa e o afluente não foram suficientes para hidrolisar os sólidos contido no esgoto, levando a lise de partículas na fase de aeração, favorecendo organismos heterotróficos de crescimento rápido (filamentosos), como observado por (Wagner et al. (2015)). Por outro lado, os resultados da análise de componentes principais corroboraram que, durante o período de instabilidade (período chuvoso), a maior carga orgânica na E-2 foi responsável por preservar o sistema, mantendo um nível mínimo de substrato para a biomassa, evitando um grande *wash-out* como foi observado na E-1 (IVL₃₀ ~ 300 ml g⁻¹SST). Embora a carga orgânica fosse maior na E-2

que na E-1, nenhuma das estratégias alcançou uma acumulação substancial de biomassa ($\sim 1,0 \text{ g L}^{-1}$), quando comparado a sistema LGA em escala real ($6 - 8 \text{ g L}^{-1}$) (PRONK et al., 2015b).

Quanto ao estudo desenvolvido no SE-II, onde foram utilizados dois reatores em escala de bancada, operados em paralelo, o objetivo foi complementar a exploração dos fatores que envolvem a granulação aeróbia, manutenção da estabilidade e atividade biológica do LGA, por meio da variação da relação C:N e da fontes de substrato orgânico, uma vez que para essa etapa foi utilizado efluente sintético, possibilitando condições controladas. O sistema também operou em ciclos de 6 horas, compreendendo fases de enchimento (90 min), aeração (240 min), sedimentação (25 min) e descarte de efluente (5 min). Foram testadas relações C:N de 5 e 10, nas quais as concentração de DQOs eram de 300 mg L^{-1} ($0,6 \text{ kgDQOs m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) e nitrogênio amoniacal de $60 \text{ mgN-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ (R1) e $30 \text{ mgN-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ (R2). Esses parâmetros foram determinados a partir de uma busca na literatura, na qual afirmava que a nível mundial, a relação C:N variava entre 10 e 12 para esgoto sanitário (LAYER et al., 2019; PRONK et al., 2015b; ZHANG et al., 2018).

Vale ressaltar que de acordo Metcalf e Eddy (2017), a relação de C:N:P favorável para a síntese bacteriana é de 100:5:1, sendo que a C:N é de 20. No entanto, no SE-I foram encontradas relações de 5,7 e 4,2, nas E-1 e E-2, respectivamente, aplicando esgoto sanitário real. Essas relações mais baixas destacadas do SE-I são devido à localização do sistema, o qual era instalado em uma bacia de escoamento com muitas atividades comerciais, como lavanderias, restaurantes e pequenos comércios, por ser próximo ao campus universitário. Dessa forma, as concentrações de nitrogênio amoniacal são elevadas, influenciando diretamente a relação C:N. Uma vez que o objetivo do SE-II era complementar informações mais intrínsecas quanto à operação de um sistema com lodo granular aeróbio, foram escolhidas as relações C:N de 5 (mais próxima ao SE-I) e 10 (próxima ao valor mundial).

No estudo do SE-II, na fase I, os reatores operaram com acetato e propionato como fonte de carbono do afluente. A relação C:N de 5 desenvolveu grânulos mais rapidamente (35 dias), com tamanhos maiores ($D > 500 \mu\text{m}$) e IVL_{30} de aproximadamente $100 \text{ mL g}^{-1}\text{SST}$; enquanto na C:N de 10, a granulação foi gradual (56 dias) com partículas entre 200 e $500 \mu\text{m}$ de diâmetro, no entanto estas apresentaram melhor sedimentabilidade ($\text{IVL}_{30} \sim 40 \text{ mL g}^{-1}\text{SST}$). Na fase II, quando foram adicionados substratos fermentativos ao afluente (glicose e aminoácidos), além do acetato e propionato, em ambas as relações C:N observou-se melhora da sedimentabilidade dos grânulos, principalmente na C:N de 10 ($\text{IVL}_{30} = 25 \text{ mL g}^{-1}\text{SST}$). O aumento da capacidade de sedimentação foi atribuído a mudança dos compostos de EPS, quando a fração LB-EPS foi

definitivamente menor nos reatores. Sob relação C:N de 5, os grânulos apresentaram características semelhantes às aquelas observadas na SE-I (E-2), com superfície irregular e estruturas espalhadas (*finger type*). Por outro lado, os agregados desenvolvidos na C:N de 10 eram compactos com formas regulares. Da mesma forma que ocorreu no sistema piloto na E-2 (SE-I), ao longo da C:N de 5, a liberação de DQOs durante a fase aerada resultou na proliferação de organismos de crescimento rápido, responsáveis pela irregularidade na superfície dos grânulos, em ambas as situações. A concentração de sólidos no sistema em ambas relações C:N também não atingiu um acúmulo considerável de biomassa, alcançando 2,5 g L⁻¹. A endogenia causada pelo longo período de inanição (240 min), sob altos níveis de aeração (~9 mg O₂ L⁻¹), pode estar correlacionada a esse comportamento nos sistemas experimentais (SE-I e SE-II), levando a oxidação de suas próprias células na fase aerada, a fim de fornecer energia para manutenção (GUIMARÃES et al., 2018).

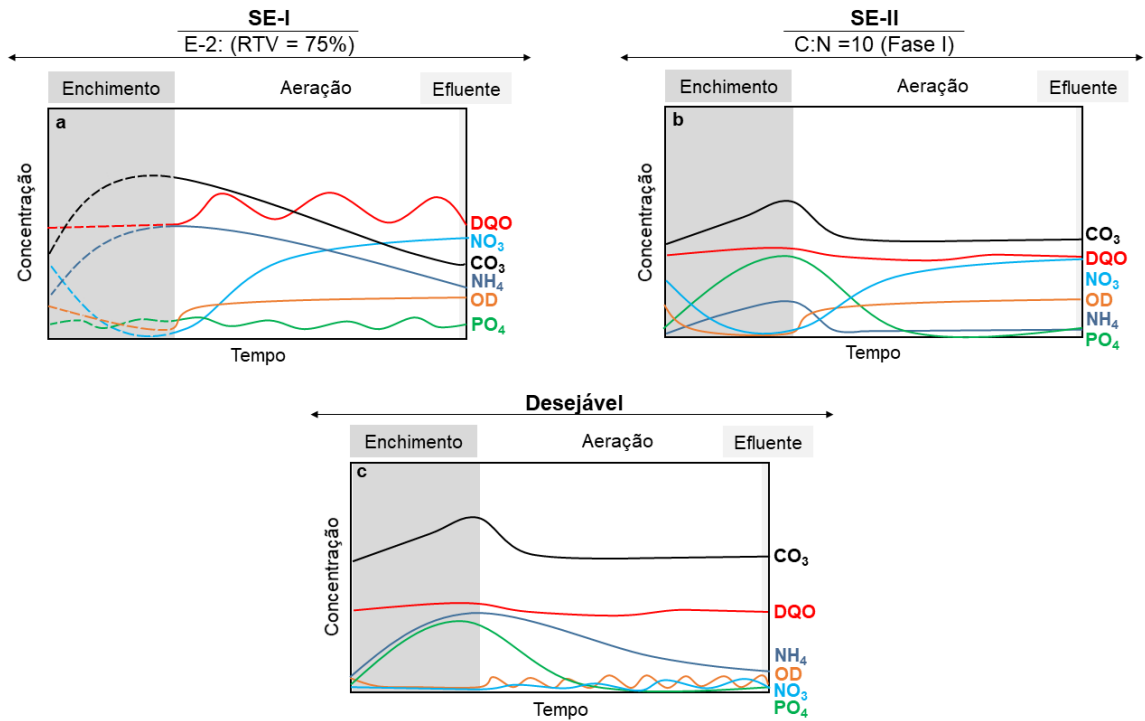
O sequenciamento de nova geração corroborou para este fato, uma vez que foram detectados em sua maioria organismos heterotróficos ordinários (OHO) de crescimento rápido. No SE-I, foram encontradas famílias (*Chitinophagaceae*) responsáveis também pela hidrólise de composto de cadeias longas, como os presentes em esgoto real. Quando a troca volumétrica foi aumentada no SE-I (E-2), organismos responsáveis pela produção de EPS foram selecionados, como os membros das famílias *Saprospiraceae* e *Flavobacteriaceae*. No SE-II, famílias que são envolvidas no metabolismo do EPS foram encontradas, como *Xanthomonadaceae*, *Rhodocyclaceae* e *Flavobacteriaceae*. Esses organismos também são classificados como desnitrificantes, incluindo *Aeromonadaceae*, detectada em grande abundância relativa (~40%) na fase II (substrato complexo) em ambas as relações C:N. No entanto, essas bactérias têm metabolismo facultativo, e acabam se sobressaindo facilmente na competição com organismos de crescimento lento, como PAO e GAO, mas sua atuação no processo de desnitrificação está limitada ao carbono orgânico disponível e à condição de anoxia apropriada. Portanto, por mais que sejam predominantes, não contribuíram para maiores atividades desnitrificantes, em ambos os sistemas experimentais, uma vez que esses organismos também podem utilizar o oxigênio como receptor de elétrons.

Quanto ao desempenho dos sistemas, a fração orgânica atingiu altas remoções no SE-I (70~80%), bem como nos reatores em bancadas (~90%). Um comportamento similar foi observado entre o sistema piloto (SE-I) e a relação C:N de 5 (SE-II), ambos com baixas remoções de fósforo e nitrogênio. No SE-I, esse fato foi atribuído a vários fatores, incluindo altas concentrações de compostos nitrogenados (NO_x), OD, e ainda a deficiência de compostos

orgânicos assimiláveis durante a fase de enchimento. No entanto, no SE-II, a relação C:N de 10 apresentava as mesmas condições aplicadas na C:N de 5, quanto as condições relacionados acima (NO_x , OD e DQO_5) e as atividades dos organismos acumuladores de fósforo foram detectadas no sistemas com remoções de aproximadamente 60%. Dessa forma, a baixa alcalinidade no sistema foi levantada como uma hipótese após o estudo no SE-II, uma vez que esta foi a principal diferença entre as relações C:N. De fato, Hoffmann et al. (2007) propuseram uma concentração de $75 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ remanescente no fim da aeração em um sistema RBS, para manter a estabilidade do sistema, a qual foi alcançada apenas na relação C:N de 10. A maior alcalinidade sob C:N de 10, manteve a fração líquida tamponada e com pH de aproximadamente 8,0 no reator, favorecendo as PAO (WEISSBRODT et al., 2013). Portanto, no estudo desenvolvido no sistema piloto (SE-I), supõe que a alcalinidade também foi um fator limitante para alcançar remoções de fósforo satisfatórias.

A remoção completa do nitrogênio foi, claramente, limitada pelo processo de desnitrificação, uma vez que altas concentrações de compostos nitrogenados, principalmente nitrato ($\sim 30 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) foram mensuradas no efluente de ambos os sistemas. Na Figura 23 é apresentada uma síntese dos perfis de ciclos observados nas melhores condições encontradas no SE-I (RTV = 75%) e no SE-II (C:N=10 com efluente simples), comparando com as desejáveis em um sistema de lodo granular aeróbio. Apesar da alta concentração de OD ter sido favorável para o processo de nitrificação em ambos os sistemas operacionais (SE-I e SE-II), o controle da fase de aeração é necessário para promover a estratificação nas camadas dos grânulos e também evitar a perda de biomassa por respiração endógena. No entanto, encontrar um limiar entre o OD necessário para oxidação do nitrogênio amoniacal, porém sem interferência na redução de compostos nitrogenados se torna um desafio, uma vez que ambos são dependentes da fração e do tamanho dos grânulos, da atividade microbiana e, portanto, da profundidade de penetração de OD e dos receptores de elétrons nitrogenados (NO_x). Dessa forma, estratégias de aeração alternadas, como apresentada na Figura 23c, ou ainda, aeração em duas etapas (dependente da concentração de nitrogênio amoniacal afluente), pode ser uma solução para alcançar níveis de remoção de nitrogênio adequado no tratamento de efluente sanitário em sistemas de lodo granular aeróbio.

Figura 23: Síntese dos perfis de ciclos observados nas melhores condições encontradas no SE-I (RTV = 75%) (a) e no SE-II (C:N=10 com efluente simples) (b), comparando com as condições desejáveis em um sistema de lodo granular aeróbio (c). As concentrações do afluente não estão plotadas, foi considerado somente as medições na fração líquida dentro dos reatores.



5 CONCLUSÕES

Para as condições aplicadas no estudo, têm-se as seguintes conclusões:

A primeira hipótese desta tese foi confirmada: *“a carga orgânica influencia a estabilidade de sistemas com lodo granular aeróbio em longo prazo, bem como a formação e as características dos agregados microbianos”*. O aumento da carga orgânica aplicada, por meio da alteração da troca volumétrica de 50% para 75%, provou ser uma alternativa plausível para tratamento de esgoto sanitário com baixas concentrações de compostos orgânicos.

A segunda hipótese também foi confirmada, uma vez que *“as relações C:N e as diferentes fontes de carbono desenvolveram grânulos com características físico-químicas e comunidade bacteriana distintas e também apresentaram diferenças nas velocidades de conversão de substratos.”*

É possível desenvolver biomassa granular com esgoto sanitário, no entanto, as condições operacionais, incluindo a razão de troca volumétrica e as características do afluente influenciam o processo de granulação, sendo necessária a aplicação de medidas operacionais, no intuito de favorecer o crescimento de organismos desejáveis à granulação. Esta conclusão geral foi formulada a partir das seguintes conclusões específicas deste trabalho:

- 1) A granulação aeróbia em termos de propriedades de sedimentação foi alcançada durante o tratamento de efluente sanitário de baixa concentração ($DQO_5 < 300 \text{ mg L}^{-1}$) em um RBS operado em volume constante. Para uma relação de troca volumétrica mais elevada (75%), o LGA apresentou uma fração significativa de grânulos ($> 80\%$) após 4 meses de operação. Os grânulos apresentaram morfologia heterogênea com estruturas espalhadas (*finger type*), e boa sedimentabilidade ($IVL_{30} < 70 \text{ mL gSST L}^{-1}$; IVL_{30}/IVL_5 de aproximadamente 0,70). A análise multivariada apoiou que o aumento da RTV de 50% a 75% provou ser uma estratégia importante para a estabilidade do LGA, especialmente durante períodos chuvosos onde a disponibilidade de carbono é diluída ($COV < 0,4 \text{ kgDQO}_5 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), exigindo um maior volume de afluente a fim de manter uma quantidade de substrato mínimo para manutenção dos grânulos. As proteínas foram a componente predominante com o dobro de concentração quando comparadas às quantidades de polissacarídeos em ambas as trocas volumétricas. No entanto, a RTV mais alta produziu

maior conteúdo de EPS, o que foi suportado pela maior abundância relativa das famílias *Saprospiraceae* e *Flavobacteriaceae*.

- 2) O aumento da troca volumétrica não afetou o desempenho do reator em termos de remoções de carbono, nitrogênio e fósforo. A baixa concentração de biomassa ($\sim 1 \text{ g L}^{-1}$) apresentou alta atividade, produzindo efluente de acordo com a legislação nacional. A DQO foi removida principalmente na fase de enchimento anaeróbico, em ambas as estratégias, com ênfase sob RTV de 75% ($> 90\%$). Porém, a presença de material particulado levou à hidrólise na fase aerada, implicando em metabolismo aeróbico. Quanto à nitrificação, ela foi alcançada com sucesso no E-1 (RTV=50%) efetuada principalmente por *Nitrospira ssp.* (em uma única etapa, aparentemente), e em E-2 (RTV=75%) por *Nitrosomonas ssp.* e *Nitrospira ssp.* (em duas etapas).
- 3) Em termos de relações C:N, a granulação foi favorecida para relação C:N de 5, na qual 40% dos grânulos apresentaram diâmetro (D) acima de $500 \mu\text{m}$, enquanto grânulos menores ($200 \mu\text{m} < D < 500 \mu\text{m}$) foram desenvolvidos na C:N de 10 com morfologia uniforme e melhor sedimentabilidade (IVL_{30} e $\text{IVL}_5 < 30 \text{ mL gSST L}^{-1}$). As proteínas também foram a componente predominante na matriz EPS, quando comparadas aos polissacarídeos em ambas as relações C:N. A razão PN/PS foi influenciada pela composição do carbono no afluente, com aumento da produção de PS sob relação C:N de 5, e o consumo na relação C:N de 10, implicando também nas frações de TB-EPS e LB-EPS.
- 4) Elevadas remoções de carbono ($\sim 90\%$) e nitrificação completa ($\text{N-NO}_2^- < 2 \text{ mg L}^{-1}$ no efluente) foram alcançadas em ambas as relações C:N e para os diferentes substratos orgânicos. A oxidação do nitrogênio amoniacal alcançou 90% de remoções na C:N de 10. Entretanto, a falta de alcalinidade sob relação C:N de 5 reduziram as remoções de nitrogênio amoniacal (71%-fase 1 e 45%-fase 2). A complexidade do substrato orgânico influenciou na atividade dos microrganismos, devido aos produtos intermediários das vias metabólicas da glicose e aminoácidos. Organismos nitrificantes heterotróficos (*Comamonadaceae* e *Microbacteriaceae*) e desnitrificantes produtores de EPS (*Thauera* e *Xanthomonas*) foram selecionadas na relação C:N de 5, enquanto organismos associados à estabilidade da biomassa granular foram favorecidos na C:N de 10 (*Zooglea*

e *Flavobacterium*), corroborando a formação de grânulos maduros e estáveis. A adição de glicose no efluente proporcionou a proliferação de organismos fermentativos como *Aeromonadaceae* com alta abundância relativa (~40%).

- 5) Desnitrificação parcial e baixa remoção de fósforo foram alcançadas em ambos os sistemas operacionais (SE-I e SE-II), exceto sob relação C:N de 10 com substrato orgânico simples. As análises multivariadas revelaram claramente a influência da matéria orgânica particulada no sistema LGA, que deve ser evitada, a fim de desenvolver grânulos aeróbios mais compactos, livres de estruturas espalhadas (*finger-type*). O controle da duração da fase de aeração e o controle do nível de OD é necessário para promover a remoção de nitrogênio e fósforo com o crescimento de biomassa, evitando a perda de biomassa por respiração endógena prolongada. Além disso, a alcalinidade também deve ser controlada, uma vez que a baixa alcalinidade também foi um fator determinante na remoção do fósforo, influenciando na atividade das PAO. Portanto, o uso de estratégias operacionais para seleção dos microrganismos é necessário para que as principais rotas metabólicas de interesse sejam favorecidas, a fim de manter a operação do sistema granular alimentado com esgotos sanitários de baixa concentração em substratos orgânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAV, S. S.; LEE, D. J.; LAI, J. Y. Biological nitrification-denitrification with alternating oxic and anoxic operations using aerobic granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1181–1189, 2009.

ADAV, S. S.; LEE, D. J.; LAI, J. Y. Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1601–1610, 2010.

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

AFFAM, A. C. et al. UV Fenton and sequencing batch reactor treatment of chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil pesticide wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 93, p. 195–201, 2014.

AIDAN AL-HUSSIENY, A. et al. Study of Sludge and comparison for Various Wastewater Treatment. **International Journal of Advanced Research Journal** www.journalijar.com **INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH**, v. 2, n. 7, p. 292–304, 2014.

AKRAM, M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 3, p. 475–478, 2014.

AMANN, R. I. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. **Molecular microbial ecology manual**, v. Springer, n. Dordrecht, p. 331–345, 1995.

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

ARIAS, C. A.; DEL BUBBA, M.; BRIX, H. Phosphorus removal by sands for use as media in subsurface flow constructed reed beds. **Water Research**, v. 35, n. 5, p. 1159–1168, 2001.

ARNALDOS, M. et al. From the affinity constant to the half-saturation index: Understanding conventional modeling concepts in novel wastewater treatment processes. **Water Research**, v. 70, p. 458–470, 2015.

AWANG, N. A. et al. Characterization of Aerobic Granular Sludge Developed under Variable and Low Organic Loading Rate. **Sains Malaysiana**, v. 46, n. 12, p. 2497–2506, 31 jan. 2017.

AWWA, APHA, W. Standard Methods for the examination of water and wastewater. **Baird B. R., Eaton, A. D., Rice, E.W., editors. Washington: AWWA, American Water Works Association APHA, American Public Works Association WEF, Water Environment Federation**, 2017.

BARR, J. J.; COOK, A. E.; BOND, P. L. Granule formation mechanisms within an aerobic wastewater system for phosphorus removal. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 22, p. 7588–7597, 2010.

BASSIN, J. P. et al. Measuring biomass specific ammonium, nitrite and phosphate uptake rates in aerobic granular sludge. **Chemosphere**, v. 89, n. 10, p. 1161–1168, 2012.

BASSIN, J. P. et al. Development of aerobic granular sludge under tropical climate conditions: The key role of inoculum adaptation under reduced sludge washout for stable granulation. **Journal of Environmental Management**, v. 230, n. September 2018, p. 168–182, 2019.

BELTRAN-HEREDIA, J. et al. Treatment of black-olive wastewaters by ozonation and aerobic biological degradation. **Water Research**, v. 34, n. 14, p. 3515–3522, 2000.

BEUN, J. . et al. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 33, n. 10, p. 2283–2290, jul. 1999.

BEUN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C.; HEIJNEN, J. J. Aerobic granulation. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 4–5, p. 41–48, fev. 2000.

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

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

CAI, W. et al. Granulation of activated sludge using butyrate and valerate as additional carbon source and granular phosphorus removal capacity during wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 282, n. March, p. 269–274, 2019.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CARTA, F. et al. Simultaneous storage and degradation of PHB and glycogen in activated sludge cultures. **Water Research**, v. 35, n. 11, p. 2693–2701, 2001.

CAUDAN, C. et al. Extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic granular sludges: Extraction, fractionation, and anionic properties. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 7, p. 1685–1702, 2012.

CHEN, C. et al. Effects of C/N ratio on the performance of a hybrid sponge-assisted aerobic moving bed-anaerobic granular membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 340–346, 2018.

CHEN, Y. et al. Structure and stability of aerobic granules cultivated under different shear force in sequencing batch reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 1199–1208, 2007.

CONAMA, C. N. D. M. A. **Resolução CONAMA 430/2011**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>.

CONSEMA-SC. Lei no 14.675, de 13.04.2009 - Institui o Código Estadual do Meio Ambiente e estabelece outras providências. **Brasil**, 2009.

- CORSINO, S. F. et al. Fate of aerobic granular sludge in the long-term: The role of EPSs on the clogging of granular sludge porosity. **Journal of Environmental Management**, v. 183, p. 541–550, 2016.
- COSTA, J. C.; ALVES, M. M.; FERREIRA, E. C. Principal component analysis and quantitative image analysis to predict effects of toxics in anaerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1180–1185, 2009.
- DAIMS, H. et al. Europe PMC Funders Group Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504–509, 2016.
- DAUDT, G. C. et al. Researching new ways to reduce N₂O emission from a granular sludge sequencing batch reactor treating domestic wastewater under subtropical climate conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 209–220, 2019.
- DAVIES, P. The biological basis of wastewater treatment. **Strathkelvin Instruments Ltd. United Kingdom**, p. 20, 2005.
- DE BRUIN, L. M. M. et al. Aerobic granular sludge technology: an alternative to activated sludge? **Water Science and Technology**, v. 49, n. 11–12, p. 1–7, 2004.
- DE KREUK, M. K.; DE BRUIN, L. M. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Aerobic Granular Sludge - From Idea to Pilot Plant. In: **Aerobic Granular Sludge**, p. 169, 2005.
- DE KREUK, M. K. et al. Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. **Water Research**, v. 44, n. 20, p. 5929–5938, 2010.
- DE KREUK, M. K.; HEIJNEN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 761–769, 2005.
- DE KREUK, M. K.; KISHIDA, N.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Aerobic granular sludge - State of the art. **Water Science and Technology**, v. 55, n. 8–9, p. 75–81, 2007.
- DE KREUK, M. K.; PRONK, M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. **Water Research**, v. 39, n. 18, p. 4476–4484, 2005.
- DE KREUK, M. K.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. **Water Science and Technology**, v. 49, n. 11–12, p. 9–17, jun. 2004.
- DERLON, N. et al. Formation of aerobic granules for the treatment of real and low-strength municipal wastewater using a sequencing batch reactor operated at constant volume. **Water Research**, v. 105, p. 341–350, 2016.
- DEVLIN, T. R. et al. Granulation of activated sludge under low hydrodynamic shear and different wastewater characteristics. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 229–235, 2017.
- DI BELLA, G.; TORREGROSSA, M. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration.

Bioresource Technology, v. 142, p. 706–713, 2013.

DING, Z. et al. Role of extracellular polymeric substances (EPS) production in bioaggregation: application to wastewater treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9883–9905, 17 dez. 2015.

DONG, J. et al. Evolution and functional analysis of extracellular polymeric substances during the granulation of aerobic sludge used to treat p -chloroaniline wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 330, n. 866, p. 596–604, 2017.

DONG, Y. H.; WANG, L. H.; ZHANG, L. H. Quorum-quenching microbial infections: Mechanisms and implications. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1483, p. 1201–1211, 2007.

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

DULEKGURGEN, E. et al. How does shear affect aggregation in granular sludge sequencing batch reactors? Relations between shear, hydrophobicity, and extracellular polymeric substances. **Water Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 267–276, 2008.

ELEFSINIOTIS, P.; WAREHAM, D. G.; SMITH, M. O. Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification. **Journal of Biotechnology**, v. 114, n. 3, p. 289–297, 2004.

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

FIGUEROA, M. et al. Nitrogen removal in aerobic granular systems. In: **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution: Principles and Engineering**. IWA Publis ed. Londres: [s.n.]. p. 273–401.

FIGUEROA, M. et al. Filamentous bacteria existence in aerobic granular reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 5, p. 841–851, 2015.

FRANCA, R. D. G. et al. Effect of SBR feeding strategy and feed composition on the stability of aerobic granular sludge in the treatment of a simulated textile wastewater. **Water Science and Technology**, v. 76, n. 5, p. 1188–1195, 2017.

FRANCA, R. D. G. et al. Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 228–246, 2018.

GAO, D. et al. Comparison of four enhancement strategies for aerobic granulation in sequencing batch reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 320–327, 2011.

GONZALEZ-MARTINEZ, A. et al. Performance and microbial community structure of a polar Arctic Circle aerobic granular sludge system operating at low temperature. **Bioresource Technology**, v. 256, n. January, p. 22–29, 2018.

GUIMARÃES, L. B. et al. Microbial pathways of nitrogen removal in aerobic granular sludge treating domestic wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n.

7, p. 1756–1765, 2017.

GUIMARÃES, L. B. Caracterização microbiológica do lodo granular na remoção de nutrientes e potencial de recuperação de exopolímeros de efluentes reatores em bateladas sequenciais. **Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC**, p. 261, 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**, v. 0, n. 0, p. 1–33, 2018.

HAO, X. DI et al. Microbiological endogenous processes in biological wastewater treatment systems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 239–265, 2010.

HE, Q. et al. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sequencing batch reactor with mixed carbon sources: reactor performance, extracellular polymeric substances and microbial successions. **Chemical Engineering Journal**, v. 331, n. September 2017, p. 841–849, 2018.

HENRIET, O. et al. Improving phosphorus removal in aerobic granular sludge processes through selective microbial management. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 298–306, 2016.

HOFFMANN, H. et al. The potential of denitrification for the stabilization of activated sludge processes affected by low alkalinity problems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p. 329–337, 2007.

HUANG, R. Y. M.; PAL, R.; MOON, G. Y. Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures. **Journal of Membrane Science**, v. 160, n. 1, p. 101–113, 1999.

IVANOV, V. et al. Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 374–381, 2006.

JAHN, A.; NIELSEN, P. H. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 157–164, 1995.

JIANG, H. L.; TAY, J. H.; TAY, S. T. L. Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 439–445, 2002.

JUNGLES, M. et al. Effects of Inoculum Type and Aeration Flowrate on the Performance of Aerobic Granular SBRs. **Processes**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.

JUNGLES, M. K. et al. Start up of a pilot scale aerobic granular reactor for organic matter and nitrogen removal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 763–768, 2011.

JUNGLES, M. K.; CAMPOS, J. L.; COSTA, R. H. R. Sequencing batch reactor operation for treating wastewater with aerobic granular sludge. **Brazilian Journal of Chemical**

Engineering, v. 31, n. 1, p. 27–33, 2014.

KARR, D. B.; WATERS, J. K.; EMERICH, D. W. Analysis of Poly-beta-Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. **Applied and environmental microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1339–44, dez. 1983.

KERRN-JESPERSEN, J. P.; HENZE, M. Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. **Water Research**, v. 27, n. 4, p. 617–624, 1993.

KIM, I. S.; KIM, S.-M.; JANG, A. Characterization of aerobic granules by microbial density at different COD loading rates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 18–25, jan. 2008.

KOCATURK, I.; ERGUDER, T. H. Influent COD/TAN ratio affects the carbon and nitrogen removal efficiency and stability of aerobic granules. **Ecological Engineering**, v. 90, p. 12–24, 2016.

KUBA, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. **Water Research**, v. 30, n. 7, p. 1702–1710, 1996.

LAYER, M. et al. Organic substrate diffusibility governs microbial community composition, nutrient removal performance and kinetics of granulation of aerobic granular sludge. **Water Research X**, v. 4, p. 100033, 2019.

LAYER, M. et al. Limited simultaneous nitrification-denitrification (SND) in aerobic granular sludge systems treating municipal wastewater: Mechanisms and practical implications. **Water Research X**, v. 7, p. 100048, 2020.

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

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, jan. 2012.

LEITE, W. R. M. et al. Monitoring and Control Improvement of Single and Two Stage Thermophilic Sludge Digestion Through Multivariate Analysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 6, p. 985–994, 2018.

LEMAIRE, R.; WEBB, R. I.; YUAN, Z. Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater. **ISME Journal**, v. 2, n. 5, p. 528–541, 2008.

LI, A. J. et al. Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3552–3560, 2008.

LI, A. J.; LI, X. Y.; YU, H. Q. Effect of the food-to-microorganism (F/M) ratio on the formation and size of aerobic sludge granules. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2269–2276, 2011.

LI, A. JIE; ZHANG, T.; LI, X. YAN. Fate of aerobic bacterial granules with fungal contamination under different organic loading conditions. **Chemosphere**, v. 78, n. 5, p. 500–509, 2010.

LI, J. et al. Aerobic sludge granulation in a full-scale sequencing batch reactor. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014a.

LI, J. et al. Aerobic granulation in a modified oxidation ditch with an adjustable volume intraclarifier. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 351–354, 2014b.

LI, W. W. et al. Roles of extracellular polymeric substances in enhanced biological phosphorus removal process. **Water Research**, v. 86, p. 85–95, 2015.

LI, X. Y.; YANG, S. F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. **Water Research**, v. 41, n. 5, p. 1022–1030, mar. 2007.

LIU, L. et al. Microscale hydrodynamic analysis of aerobic granules in the mass transfer process. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 19, p. 7555–7560, 2010a.

LIU, W. T. et al. *Kineosphaera limosa* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-positive polyhydroxyalkanoate-accumulating coccus isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1845–1849, 2002.

LIU, Y.; LIU, Q. S. Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 115–127, 2006.

LIU, Y. Q. et al. Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 520–525, 2010b.

LIU, Y. Q.; TAY, J. H. Variable aeration in sequencing batch reactor with aerobic granular sludge. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 2, p. 338–346, 2006.

LIU, Y. Q.; TAY, J. H. Influence of cycle time on kinetic behaviors of steady-state aerobic granules in sequencing batch reactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 516–522, 2007.

LIU, Y. Q.; TAY, J. H. Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 980–985, 2008.

LIU, Y. Q.; TAY, J. H. Fast formation of aerobic granules by combining strong hydraulic selection pressure with overstressed organic loading rate. **Water Research**, v. 80, p. 256–266, 2015.

LIU, Y.; TAY, J.-H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. **Water Research**, v. 36, n. 7, p. 1653–1665, abr. 2002.

LIU, Y.; TAY, J. H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 7, p. 533–563, 2004.

LIU, Y.; YANG, S. F.; TAY, J. H. Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 108, n. 2, p. 161–169, 2004.

LOCHMATTER, S.; HOLLIGER, C. Optimization of operation conditions for the startup of

aerobic granular sludge reactors biologically removing carbon, nitrogen, and phosphorous. **Water Research**, v. 59, p. 58–70, ago. 2014.

LOURENÇO, N. D. et al. Comparing aerobic granular sludge and flocculent sequencing batch reactor technologies for textile wastewater treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 104, p. 57–63, 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LUO, J. et al. Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 62, p. 127–135, 2014.

LV, Y. et al. Microbial communities of aerobic granules: Granulation mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 344–351, 2014.

MAÑAS, A. et al. Location and chemical composition of microbially induced phosphorus precipitates in anaerobic and aerobic granular sludge. **Environmental Technology**, v. 33, n. 19, p. 2195–2209, 2012.

MAÑAS, A.; BISCANS, B.; SPÉRANDIO, M. Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process. **Water Research**, v. 45, n. 12, p. 3776–3786, jun. 2011.

MARTINS, A. M. P. et al. Three-dimensional dual-morphotype species modeling of activated sludge flocs. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 21, p. 5632–5641, 2004.

MARTINS, A. M. P.; KARAHAN, Ö.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Effect of polymeric substrate on sludge settleability. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 263–273, 2011.

MASON, R. L.; TRACY, N. D.; YOUNG, J. C. Monitoring a multivariate step process. **Journal of Quality Technology**, v. 28, n. 1, p. 39–50, 1996.

MASZENAN, A. M.; LIU, Y.; NG, W. J. Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 111–123, 2011.

MCSWAIN, B. S. et al. Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. v. 71, n. 2, p. 1051–1057, 2005.

MILLS, H. J. et al. Characterization of nitrifying, denitrifying, and overall bacterial communities in permeable marine sediments of the northeastern Gulf of Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4440–4453, 2008.

MINO, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. **Water Research**, v. 32, n. 11, p. 3193–3207, nov. 1998.

MONTGOMERY, D. C. **Introduction to Statistical Quality Control**. Wiley, New York: [s.n.].

MORGENROTH, E. et al. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. **Water**

Research, v. 31, n. 12, p. 3191–3194, 1997.

MOY, B. Y. P. et al. High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 407–412, 2002.

MUDA, K. et al. The effect of hydraulic retention time on granular sludge biomass in treating textile wastewater. **Water Research**, v. 45, n. 16, p. 4711–4721, 2011.

MUSZYŃSKI, A.; MIŁOBĘDZKA, A. The effects of carbon/phosphorus ratio on polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in aerobic granular sludge. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 9, p. 3053–3060, 2015.

NAKHLA, G.; LIU, V.; BASSI, A. Kinetic modeling of aerobic biodegradation of high oil and grease rendering wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 1, p. 131–139, 2006.

NANCHARAI AH, Y. V.; KIRAN KUMAR REDDY, G. Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September, p. 1128–1143, 2018.

NIELSEN, P. H. et al. A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. **Water Research**, v. 44, n. 17, p. 5070–5088, 2010.

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

NSABIMANA, E.; BELAN, A.; BOHATIER, J. Analysis at the genomospecies level of microbial populations changes in activated sludge: The case of *Aeromonas*. **Water Research**, v. 34, n. 5, p. 1696–1704, 2000.

PENG, Z. et al. Characteristics of nutrients removal under partial denitrification initiated by different initial nitrate concentration. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 0123456789, 2021.

PEYONG, Y. N. et al. The effect of organic loading rates and nitrogenous compounds on the aerobic granules developed using low strength wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 52–59, 2012.

PIJUAN, M.; WERNER, U.; YUAN, Z. Reducing the startup time of aerobic granular sludge reactors through seeding floccular sludge with crushed aerobic granules. **Water Research**, v. 45, n. 16, p. 5075–5083, 2011.

PRONK, M. et al. Effect and behaviour of different substrates in relation to the formation of aerobic granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 5257–5268, 2015a.

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

QUINES, L. K. M. et al. METHODS OF EXTRACTION OF POLYHYDROXYALKANOATES FROM BACTERIAL BIOMASS. **Química Nova**, v. 38,

n. 9, p. 1207–1218, 2015.

RAMOS, C.; SUÁREZ-OJEDA, M. E.; CARRERA, J. Biodegradation of a high-strength wastewater containing a mixture of ammonium, aromatic compounds and salts with simultaneous nitrification in an aerobic granular reactor. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 399–407, 2016.

RICKARD, A. H. et al. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1446–1456, jun. 2006.

ROCKTÄSCHEL, T. et al. Comparison of two different anaerobic feeding strategies to establish a stable aerobic granulated sludge bed. **Water Research**, v. 47, n. 17, p. 6423–6431, 2013.

ROLLEMBERG, S. L. S., OLIVEIRA, L. Q., BARROS, A. N., FIRMINO, P. I. M., SANTOS, A. B. Pilot-scale aerobic granular sludge in the treatment of municipal wastewater: Optimizations in the start-up, methodology of sludge discharge, and evaluation of resource recovery. **Bioresource Technology**, v. 311, n. April, p. 123467, set. 2020.

ROLLEMBERG, S. L. DE S. et al. Effects of carbon source on the formation, stability, bioactivity and biodiversity of the aerobic granule sludge. **Bioresource Technology**, v. 278, n. November 2018, p. 195–204, 2019.

ROYAL HASKONINGDHV. **Royal HaskoningDHV**. Disponível em: <<https://www.royalhaskoningdhv.com/en-gb/nereda/nereda-plants>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

RUBIO-RINCÓN, F. J. et al. Cooperation between Candidatus Competibacter and Candidatus Accumulibacter clade I, in denitrification and phosphate removal processes. **Water Research**, v. 120, p. 156–164, 2017.

SADRI MOGHADDAM, S.; ALAVI MOGHADDAM, M. R. Cultivation of aerobic granules under different pre-anaerobic reaction times in sequencing batch reactors. **Separation and Purification Technology**, v. 142, p. 149–154, 2015.

SARMA, S. J.; TAY, J. H. Carbon, nitrogen and phosphorus removal mechanisms of aerobic granules. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 1077–1088, 2018.

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

SCHAMBECK, C. M. et al. Biopolymers recovery: dynamics and characterization of alginate-like exopolymers in an aerobic granular sludge system treating municipal wastewater without sludge inoculum. **Journal of Environmental Management**, v. 263, n. March, 2020.

SCHWARZENBECK, N.; BORGES, J. M.; WILDERER, P. A. Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 711–718, 2005.

SCHWARZENBECK, N.; ERLEY, R.; WILDERER, P. A. Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. **Water Science and Technology**, v. 49, n. 11–12, p. 41–46, 2004.

SEVIOUR, R. J.; MCILROY, S. The microbiology of phosphorus removal in activated sludge processes-the current state of play. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 115–124, 2008.

SEVIOUR, T. et al. Structural Determination of a Key Exopolysaccharide in Mixed Culture Aerobic Sludge Granules Using NMR Spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 23, p. 8964–8970, dez. 2010.

SEVIOUR, T. et al. Aerobic sludge granulation: A tale of two polysaccharides? **Water Research**, v. 46, n. 15, p. 4803–4813, 2012.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 882–894, 2010.

SHOW, K.; LEE, D.; TAY, J. Aerobic Granulation : Advances and Challenges. n. February, p. 1622–1640, 2012.

SMOLDERS, G. J. F. et al. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 6, p. 461–470, 15 mar. 1994.

SPERLING, M. VON; LEMOS CHERNICHARO, C. A. DE. Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions. **IWA Publishing**, p. 1–856, 2005.

STURM, B. S. M.; IRVINE, R. L. Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. **Water Science and Technology**, v. 58, n. 4, p. 781–787, 2008.

TAN, C. H. et al. The role of quorum sensing signalling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules. **ISME Journal**, v. 8, n. 6, p. 1186–1197, 2014.

TAY, J.-H.; LIU, Q.-S.; LIU, Y. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1–2, p. 227–233, 1 out. 2001a.

TAY, J. H.; LIU, Q. S.; LIU, Y. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 168–175, 2001b.

TAY, J. H.; LIU, Q. S.; LIU, Y. The effect of upflow air velocity on the structure of aerobic granules cultivated in a sequencing batch reactor. **Water Science and Technology**, v. 49, n. 11–12, p. 35–40, 2004.

TAY, J.; LIU, Q.; LIU, Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. **Journal of Applied Microbiology**, p. 222–226, 2001c.

TU, X. et al. Fractionation and characterization of dissolved extracellular and intracellular products derived from floccular sludge and aerobic granules. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 55–61, 2012.

VABOLIENĖ, GIEDRĖ; MATUZEVIČIUS, ALGIMANTAS B.; VALENTUKEVIČIENĖ, M. Effect of nitrogen on phosphate reduction in biological phosphorus removal from

wastewater. v. 53, n. 1, p. 80–88, 2007.

VELHO, V. F. et al. Effect of COD/N ratio on N₂O production during nitrogen removal by aerobic granular sludge. **Water Science and Technology**, v. 76, n. 12, p. 3452–3460, 2017.

VERAWATY, M. et al. Determining the mechanisms for aerobic granulation from mixed seed of floccular and crushed granules in activated sludge wastewater treatment. **Water Research**, v. 46, n. 3, p. 761–771, 2012.

VERAWATY, M. et al. Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 14, p. 5338–5349, 2013.

VISHNIAC, W.; SANTER, M. The thiobacilli. **Bacteriological reviews**, v. 21, n. 3, p. 195, 1957.

VON SPERLING, M. **Basic principles of wastewater treatment**. [s.l.] IWA publishing, 2007. v. 2

VUKOVIĆ, D. M.; RUNJAVEC, M. R.; MEŠTROVIĆ, E. Bioaugmentation effect of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida* on kinetics of activated sludge process in treating pharmaceutical industrial wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 8, p. 2721–2728, 2019.

WAGNER, J. et al. Effect of particulate organic substrate on aerobic granulation and operating conditions of sequencing batch reactors. **Water Research**, v. 85, p. 158–166, nov. 2015.

WAGNER, J.; COSTA, R. H. R. DA. Reator em bateladas sequenciais de grânulos aeróbios: estudo da formação dos grânulos e do efeito da duração do ciclo na remoção de carbono, nitrogênio e fósforo de esgoto doméstico. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, n. 2, p. 269–278, 2015.

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.

WAN, C. et al. Disintegration of aerobic granules: Role of second messenger cyclic di-GMP. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 330–335, out. 2013.

WANG, C. et al. Biodegradation characterization and immobilized strains' potential for quinoline degradation by *Brevundimonas* sp. K4 isolated from activated sludge of coking wastewater. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 164–170, 2015.

WANG, D. et al. Free nitrous acid-based nitrifying sludge treatment in a two-sludge system enhances nutrient removal from low-carbon wastewater. **Bioresource Technology**, v. 244, n. August, p. 920–928, 2017.

WANG, H. et al. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor with high dissolved oxygen: Effects of carbon to nitrogen ratios. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 1145–1152, 2018a.

WANG, Q. et al. Aerobic granules cultivated with simultaneous feeding/draw mode and low-

strength wastewater: performance and bacterial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 261, n. April, p. 232–239, 2018b.

WANG, R. et al. Understanding the role of extracellular polymeric substances in an enhanced biological phosphorus removal granular sludge system. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 307–312, 2014.

WANG, X. et al. The isolation and microbial community analysis of hydrogen producing bacteria from activated sludge. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1415–1423, 2007a.

WANG, X. et al. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in china. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 7042–7047, 2012.

WANG, X. et al. Impact of carbon to nitrogen ratio on the performance of aerobic granular reactor and microbial population dynamics during aerobic sludge granulation. **Bioresource Technology**, v. 271, n. July 2018, p. 258–265, 2019.

WANG, X. CHUN et al. The key role of inoculated sludge in fast start-up of sequencing batch reactor for the domestication of aerobic granular sludge. **Journal of Environmental Sciences (China)**, 2018c.

WANG, X. H. et al. Improved stability and performance of aerobic granules under stepwise increased selection pressure. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 205–211, 2007b.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

WEISSBRODT, D. G. et al. Bacterial selection during the formation of early-stage aerobic granules in wastewater treatment systems operated under wash-out dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. SEP, p. 1–22, 2012.

WEISSBRODT, D. G. et al. Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. JUL, p. 1–18, 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**, v. 88, n. 3, p. 579–595, 2014.

WENTZEL, M. C. et al. Kinetics of biological phosphorus release. **Water Science and Technology**, v. 17, n. 11–12, p. 57–71, 1985.

WINKLER, M.-K. H. et al. Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7447–7458, 2013.

WU, L. et al. Effect of wastewater COD/N ratio on aerobic nitrifying sludge granulation and microbial population shift. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 2, p. 234–241, 2012.

WU, Y. D. et al. *Tahibacter caeni* sp. Nov., isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 633–638, 2015.

XAVIER, J. A. et al. Granulação natural em reator operado em bateladas sequenciais: características físico-químicas dos grânulos e desempenho no tratamento de esgoto sanitário. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, p. 1067–1077, 2018.

XUAN, W. et al. The EPS characteristics of sludge in an aerobic granule membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8046–8050, 2010.

YANG, X.; WANG, S.; ZHOU, L. Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 65–72, 2012.

YE, L. et al. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing. **Water Research**, v. 45, n. 15, p. 4390–4398, out. 2011.

ZHANG, H. et al. Aerobic granulation with low strength wastewater at low aeration rate in A/O/A SBR reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 215–222, jul. 2011.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D. Aerobic granular processes: Current research trends. **Bioresource Technology**, v. 210, p. 74–80, 2016.

ZHANG, Z. et al. Stability of aerobic granular sludge under condition of low influent C/N ratio: Correlation of sludge property and functional microorganism. **Bioresource Technology**, v. 270, n. 866, p. 391–399, 2018.

ZHENG, Y. M. et al. Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. **Chemosphere**, v. 63, n. 10, p. 1791–1800, 2006.

ZHU, L. et al. Formation and microbial community analysis of chloroanilines-degrading aerobic granules in the sequencing airlift bioreactor. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 152–160, 2008.

ZOU, H. et al. Role of nitrate in biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 701–706, 2006.

LISTA DE PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

ARTIGOS PUBLICADOS

1. XAVIER, J. A.; GUIMARÃES, L. B.; MAGNUS, B. S.; LEITE, W. R.; VILAR, V. J.P.; DA COSTA, R. H.R. How volumetric exchange ratio and carbon availability contribute to enhance granular sludge stability in a fill/draw mode SBR treating domestic wastewater? **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, p. 101917, 2021.
2. DALL'AGNOL, P.; LIBARDI, N.; MULLER, J. M.; XAVIER, J. A.; DOMINGOS, D.G.; DA COSTA, R. H. R. A comparative study of phosphorus removal using biopolymer from aerobic granular sludge: A factorial experimental evaluation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, p. 103541, 2020.
3. DOMINGOS, D. G.; LIBARDI, N.; HENRIQUES, R. O.; XAVIER, J. A.; DA COSTA, R. H. R. The effect of Np-magnetite on the granulation process of an SBR reactor used for domestic wastewater treatment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 161-171, 2020.
4. MARTINS, C. L.; VELHO, V. F.; MAGNUS, B. S.; XAVIER, J. A.; GUIMARÃES, L. B.; LEITE, W. R.; DA COSTA, R. H. R. Assessment of sludge reduction and microbial dynamics in an OSA process with short anaerobic retention time. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 101025, 2020.
5. DAUDT, G. C.; XAVIER, J. A.; MEOTTI, B.; GUIMARÃES, L. B.; DA COSTA, R. H. R. Researching new ways to reduce N₂O emission from a granular sludge sequencing batch reactor treating domestic wastewater under subtropical climate conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 209-220, 2019.
6. DOMINGOS, D. G.; HENRIQUES, R. O.; XAVIER, J. A.; LIBARDI, N.; DA COSTA, R. H. R. Rising up activated sludge aggregation by magnetite nanoparticles addition. **Water Science and Technology**, v. 79, p. 55, 2019.
7. XAVIER, J. A.; GUIMARÃES, L. B.; LEITE, W. R.; MARTINS, C. L.; DAUDT, G. C.; DA COSTA, R. H. R. Granulação natural em reator operado em bateladas sequenciais: características dos grânulos e desempenho no tratamento de esgoto sanitário. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, p. 1067-1077, 2018.
8. VELHO, V. F.; MAGNUS, B. S.; DAUDT, G. C.; XAVIER, J. A.; GUIMARÃES, L. B.; DA COSTA, R. H. R. Effect of COD/N ratio on N₂O production during nitrogen removal by aerobic granular sludge. **Water Science and Technology**, v. 76, p. 3452-3460, 2017.

ARTIGOS EM PREPARAÇÃO

1. XAVIER, J. A.; SANTOS, S. G. S.; MONTEIRO, J. P.; SILVA, T. F. C. V.; DA COSTA, R. H. R.; VILAR, V. J. P. Towards a better understanding concerning carbon to nitrogen ratio and the carbon source in aerobic granular sludge.
2. MAGNUS, B. S.; SCHAMBECK, C. M.; XAVIER, J. A.; FREITAS, D.; LEITE, W. R.; GUIMARÃES, L. B.; DA COSTA, R. H. R. Unraveling the effects of cycle configuration on N₂O production-emission by a granular sequencing batch reactor.

TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. XAVIER, J. A.; VILAR, V. J. P.; DA COSTA, R. H. R. Granulation and stability: long-term study of aerobic granules in a reactor operated with fill/draw mode treating domestic wastewater.
In: 2nd International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes, Porto, Portugal, 2019. (Apresentação poster).
2. XAVIER, J. A.; GUIMARÃES, L. B.; LEITE, W. R.; DA COSTA, R. H. R. Estudo de fatores relevantes para a estabilidade de grânulos aeróbios usando análise multivariada.
In: XXXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria Y Ambiental, Guayaquil, Ecuador, 2018. (Apresentação poster).
3. MAGNUS, B. S.; XAVIER, J. A.; SCHAMBECK, C. M.; DAUDT, G. C.; MEOTTL, B.; VELHO, V. F.; GUIMARÃES, L. B.; DA COSTA, R. H. R. Challenge of granulation without inoculation for a sewage treatment: a search for better operational configuration.
In: World Water Congress & Exhibition, Tóquio, Japão, 2018. (Apresentação oral).
4. DOMINGOS, D. G.; XAVIER, J. A.; GUIMARÃES, L. B.; MAGNUS, B. S.; DA COSTA, R. H. R. Speeding up the aerobic granulation with calcium and sodium alginate.
In: World Water Congress & Exhibition, Tóquio, Japão, 2018. (Apresentação *poster pitch*).
5. XAVIER, J. A.; GONZAGA, D. D.; DA COSTA, R. H. R. Desenvolvimento de biomassa granular em reator em bateladas sequenciais operado com volume constante no tratamento de esgoto sanitário.
In: XIV SIBESA - Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Foz do Iguaçu, Brasil, 2018. (Apresentação oral).
6. DOMINGOS, D. G.; XAVIER, J. A.; DA COSTA, R. H. R. Síntese de esferas de alginato para bioagregação de lodo ativado em ensaios de jar-test.

- In: XIV SIBESA - Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Foz do Iguaçu, Brasil, 2018. (Apresentação oral).
7. DAUDT, G. C.; XAVIER, J. A.; DA COSTA, R. H. R. N₂O emission by a pilot scale granular sequencing batch reactor (GSBR) under different aeration regimes.
In: The 14th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies, Florianópolis, Brasil, 2017. (Apresentação poster).
 8. MAGNUS, B. S.; VELHO, V. F.; DAUDT, G. C.; XAVIER, J. A.; GUIMARÃES, L. B.; DA COSTA, R. H. R. Effect of COD/N Ratio on N₂O Production during Nitrogen Removal by Aerobic Granular Sludge.
In: 10th International Conference on Biofilm Reactors, Dublin, Irlanda, 2017. (Apresentação oral).
 9. XAVIER, J. A.; GUIMARÃES, L. B.; DAUDT, G. C.; MARTINS, C. L.; DA COSTA, R. H. R. Investigating physical characteristics and N₂O emissions of granular biofilm induced by different SBR cycle configurations for domestic wastewater treatment.
In: 10th International Conference on Biofilm Reactors, Dublin, Irlanda, 2017. (Apresentação poster).

APÊNDICE A

Material complementar ao Item 4, subitem 4.1

COMO A RAZÃO DA TROCA VOLUMÉTRICA E A DISPONIBILIDADE DE CARBONO CONTRIBUEM PARA MELHORAR A ESTABILIDADE DO LODO GRANULAR EM RBS OPERADO EM VOLUME CONSTANTE TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO?

Figura 24: Imagens microscópicas da biomassa ao longo do processo de granulação durante os 339 dias (d) da E-1. Durante o período de instabilidade (160º dia), o sistema foi dominado por organismos filamentosos. Barra = 1 mm.

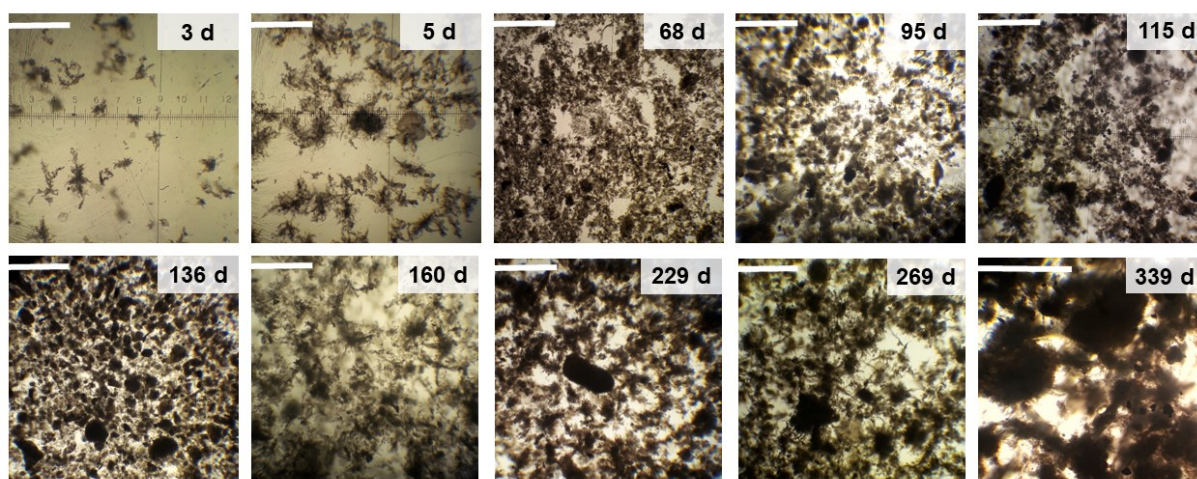


Figura 25: Imagens microscópicas da biomassa ao longo do processo de granulação durante os 339 dias (d) da E-2. No dia 150, (período de instabilidade) estruturas filamentosas podem ser observada no sistema. Barra = 1 mm.

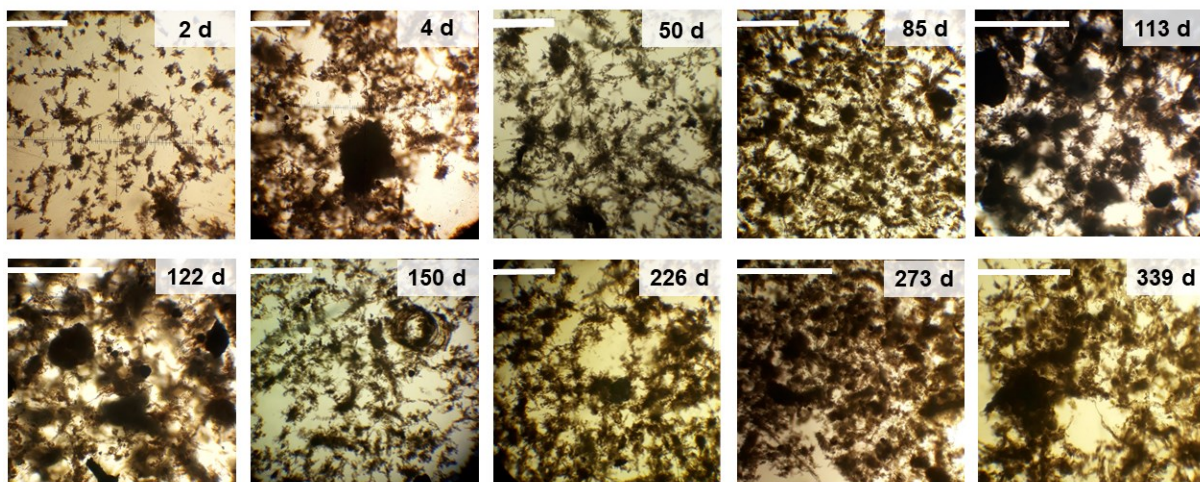


Figura 26: Conteúdo da matriz EPS em termos de proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) em ambas as estratégias operacionais.

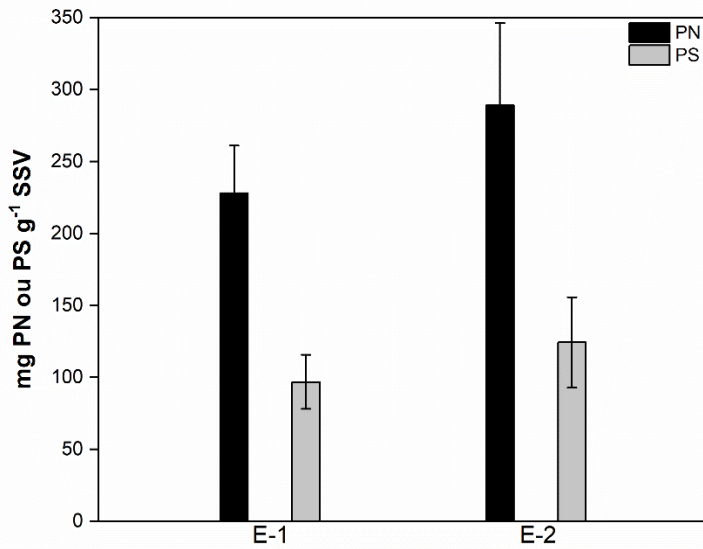


Figura 27: Perfil das concentrações de DQO_s, nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺) e fósforo total (P_T) ao longos dos 339 dias de operação na E-1 (lado esquerdo) e E-2 (lado direito).

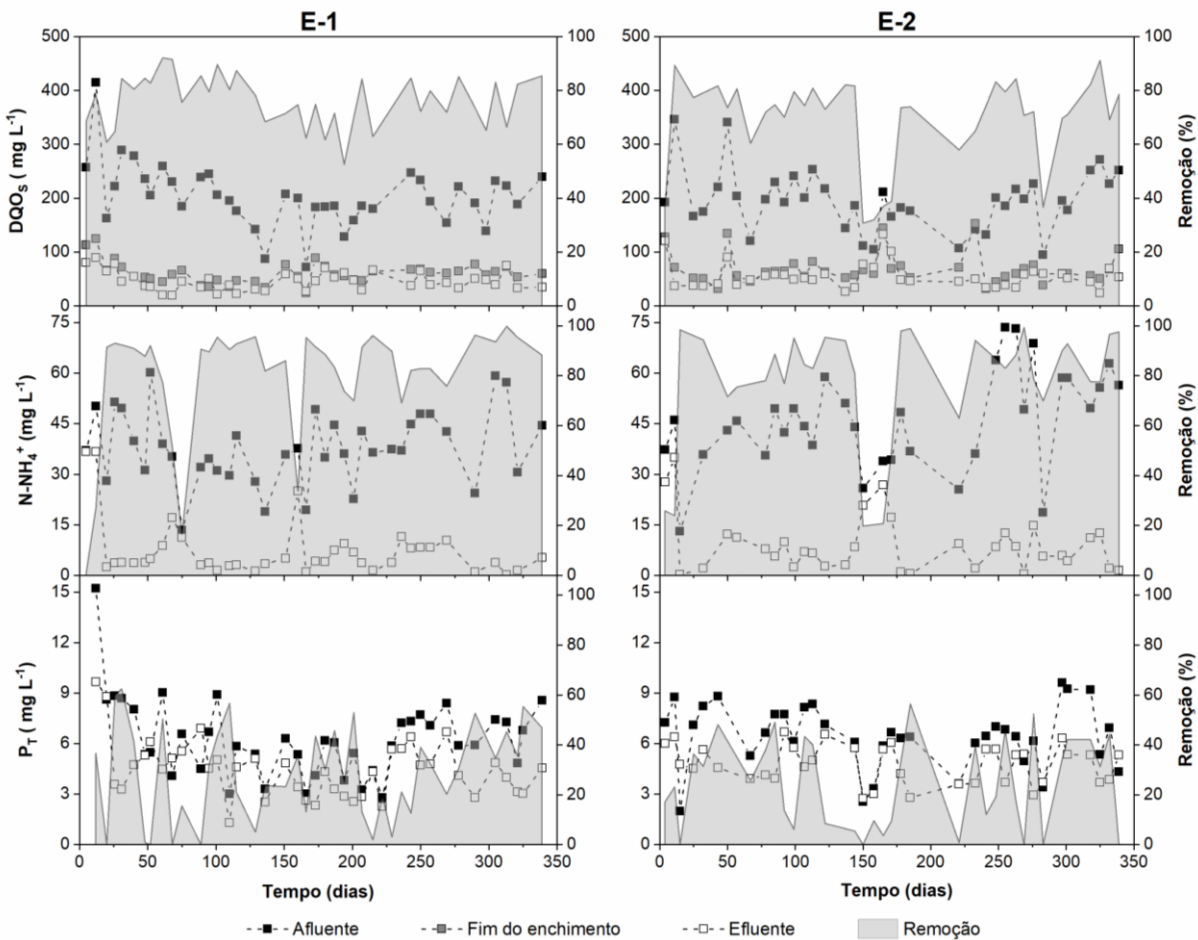


Tabela 10: Cargas fatoriais usadas para avaliar a variabilidade e detectar comportamento não aleatório em ambas as estratégias operacionais. Cargas absolutas iguais ou superiores a 0,50 (ponto de corte) estão destacadas em negrito.

Variáveis	Sigla	E-1			E-2		
		CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
Sólidos suspensos voláteis	SSV	-0.92	0.09	0.16	-0.61	-0.46	0.03
Razão IVL_{30}/IVL_5	IVL	0.47	0.18	0.25	0.68	0.21	0.57
Altura da cama de lodo	ACL	-0.93	-0.02	0.02	-0.57	-0.53	-0.09
Velocidade de crescimento de biomassa	μ OBS	0.58	0.15	0.36	0.81	0.02	-0.02
Fração com $D > 212$	$D > 212$	-0.15	0.51	-0.55	-0.30	-0.02	0.85
Carga orgânica particulada	COP	-0.75	0.30	0.16	-0.33	0.51	0.05
Carga orgânica solúvel	COS	-0.35	0.76	0.36	-0.59	0.66	0.05
Velocidade de remoção anaeróbia de DQO	ANQS	0.63	0.49	0.29	-0.27	0.89	-0.16
Velocidade de remoção aeróbia de DQO	AEQS	0.29	0.50	-0.59	-0.37	-0.13	0.39

Figura 28: Carga orgânica volumétrica solúvel (COV) e precipitação diária na E-1 (a) e E-2 (b). Os dados de precipitação diária foram fornecidos pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (EPAGRI / CIRAM) e foram obtidos na estação meteorológica da cidade de Florianópolis, onde o estudo foi desenvolvido.

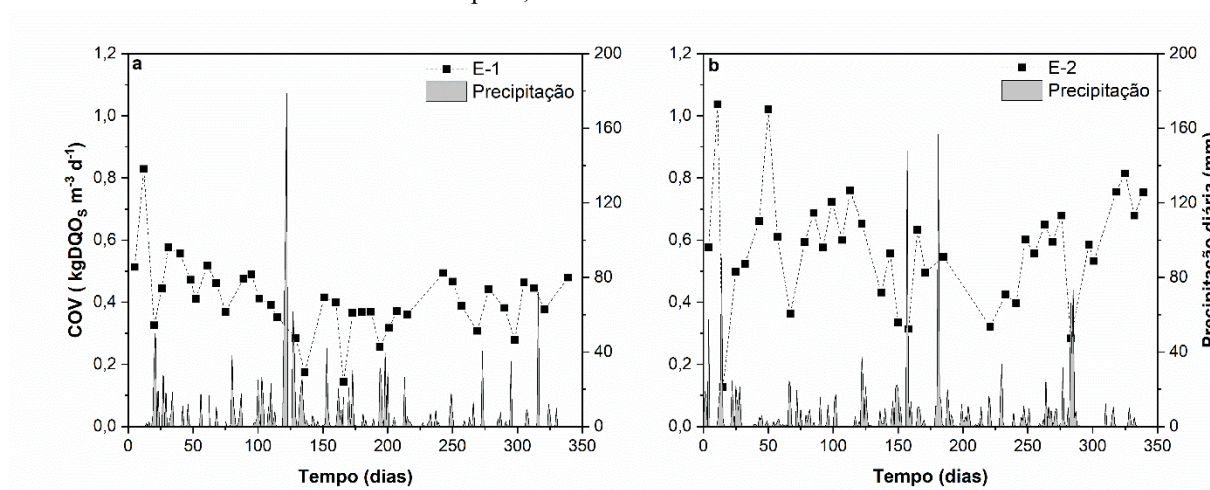
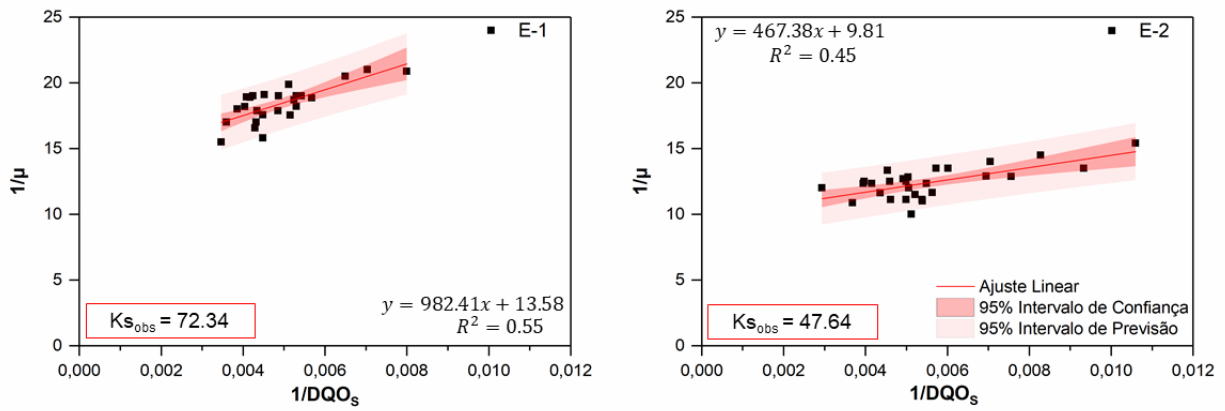


Figura 29: Gráficos de linearização Lineweaver-Burk para determinar a constante de meia saturação ($k_{s_{obs}}$) na E-1 (a) e E-2 (b).



APÊNDICE B

Material complementar ao Item 4, subitem 4.2

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO CARBONO E NITROGÊNIO E DA FONTE DE CARBONO NO LODO GRANULAR AERÓBIO

Figura 30: Dinâmica da comunidade bacteriana em nível de gênero nas fases I e II, no R1 (lado esquerdo) e R2 (lado direito). OTUs com abundância relativa menor que 3% foram incluídos em “outros”.

