



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

Nathan Pacheco Amin Vieira da Costa

**APLICAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO E SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS
EXTRACELULARES PARA REDUÇÃO DO TEMPO DE GRANULAÇÃO E
ESTABILIDADE DA BIOMASSA EM REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS**

Florianópolis, SC
Setembro de 2021

Nathan Pacheco Amin Vieira da Costa

**APLICAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO E SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS
EXTRACELULARES PARA REDUÇÃO DO TEMPO DE GRANULAÇÃO E
ESTABILIDADE DA BIOMASSA EM REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS**

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Ambiental da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de mestre
em Engenharia Ambiental

Orientador: Prof^ª. Rejane Helena Ribeiro da
Costa, Dra.

Coorientador: Nelson Libardi Junior, Dr.

Florianópolis, SC
Setembro de 2021

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

Costa, Nathan Pacheco Amin Vieira da Costa
APLICAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO E SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS
EXTRACELULARES PARA REDUÇÃO DO TEMPO DE GRANULAÇÃO E
ESTABILIDADE DA BIOMASSA EM REATOR EM BATELADAS
SEQUENCIAIS / Nathan Pacheco Amin Vieira da Costa Costa ;
orientador, Rejane Helena Ribeiro da Costa da Costa,
coorientador, Nelson Libardi Libardi, 2021.
102 p.

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

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. I. da Costa, Rejane Helena
Ribeiro da Costa. II. Libardi, Nelson Libardi. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Nathan Pacheco Amin Vieira da Costa

Aplicação de alginato de sódio e substâncias poliméricas extracelulares para redução do tempo de granulação e estabilidade da biomassa em reator em bateladas sequenciais

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

Prof.^a Bruna Scandolara Magnus, Dr.^a
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Maria Eliza Nagel Hassemer, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Paulo Belli Filho, 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 mestre em Engenharia Ambiental.

Prof. Leonardo Hoinaski, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

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

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos iniciais se direcionam para a minha mãe e meu pai, sem eles eu não seria quem sou hoje.

Gostaria também de agradecer a professora Rejane por me receber como seu orientando, sempre me proporcionando valiosas sugestões e direcionamentos. O seu suporte e experiência ao longo desse caminho foram essenciais para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço ao Nelson, o qual além de me coorientar, me proporcionou diversos momentos e reflexões marcantes. Agradeço por toda a amizade, companheirismo, cafezinhos e conselhos principalmente durante esse momento de pandemia.

Agradeço a todos os integrantes da família LABEFLU com quem tive contato e estiveram ali presentes ao longo dessa jornada, em especial ao Cassio, Jéssica, Maria Joana, Patrícia, Rodrigo, Amábile e Sr. Hélio. Vocês fizeram os dias melhores.

Agradeço a todos os outros laboratórios que contribuíram de alguma forma para esse trabalho. Ao LIMA por todo o suporte na dinâmica laboratorial, ao LCME e central de análises químicas da UFSC por realizarem ensaios analíticos específicos. À CAPES pelo suporte financeiro com a bolsa de mestrado.

Sigo agradecendo ao setor de análise de projetos da vigilância sanitária os quais me incentivaram para a realização do mestrado, além de serem referência para minha formação como engenheiro.

Agradeço a todas as pessoas que cruzaram meu caminho durante esse período e as suas contribuições para o meu amadurecimento.

Em especial gostaria de agradecer a alguns amigos queridos, Tutu, Thaís, Gruber, Rhaniel, Hugo, Giovanna, Tia Marcia e Tio Luis. Muito obrigado!

Tudo é questão de ver
Que a vida é maior que o fato
A força é maior que o ator
E a semente repousa no fruto
Como o sentido no tato
Tudo contém o ser
Assim como o ser contém tudo
Continente e conteúdo
Fundidos num só mistério
Que de repente é sério
De repente é caricato
(Hirsh, Sonia)

RESUMO

A tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) para o tratamento de efluentes está em expansão mundialmente e pode ser considerada como uma variante dos sistemas de lodos ativados. Contudo, o tempo de formação e a estabilidade dos grânulos ainda é um problema para a efetiva implantação dessa tecnologia. O uso de agentes para a agregação do lodo tem sido estudado visando remediar essas deficiências. Neste contexto, o presente trabalho estudou a aplicação de dois biopolímeros: alginato de sódio e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) extraídas do LGA, atuando como aditivos para granulação aeróbia, em um reator em bateladas sequenciais granular (RBSG) alimentado por esgoto sanitário real. O estudo foi desenvolvido em 3 etapas, onde a primeira compreendeu a determinação da dosagem ótima dos biopolímeros por meio de ensaios de testes de jarros. A segunda etapa consistiu nas Fases I e II, as quais tiveram como objetivo avaliar o efeito de alginato de sódio (Fase I – 107 dias, 400 mg L⁻¹) e de EPS extraído de LGA (Fase II – 100 dias, 50 mg L⁻¹) na formação e manutenção da biomassa granular. Como resultados, verificou-se que a aplicação de alginato de sódio na Fase I favoreceu a aglomeração das partículas (2,9 ± 0,45 gSST L⁻¹), com biomassa predominantemente granular (>50% acima de 212 µm de diâmetro), a partir do dia 37 de operação, e boa sedimentabilidade (IVL₃₀ = 68 ± 11 mL g⁻¹). Na Fase II, a predominância de grânulos ocorreu a partir do dia 44, com concentração de biomassa de 1,3 ± 0,3 gSST L⁻¹ e boa sedimentabilidade (IVL₃₀ = 78 ± 21 mL g⁻¹). Na terceira etapa foram avaliadas as mudanças das características da biomassa utilizada como inóculo (Fase III – 1 g SST L⁻¹; Fases IV e V – 3 g SST L⁻¹), e o tratamento do esgoto para diferentes condições operacionais de aplicação de EPS (Fase III – 50 mg EPS L⁻¹; Fase IV - 250 mg EPS L⁻¹; Fase V - 250 mg EPS L⁻¹ + 100 mg Ca L⁻¹), sendo observadas diferenças significativas na velocidade de sedimentação da biomassa e no IVL₃₀. A aplicação de íons de cálcio na estrutura do biopolímero (Fase V) contribuiu com essas diferenças, indicando impacto positivo no desenvolvimento do LGA. O efeito do biopolímero EPS como agente aglomerador foi relacionado à sua assimilação pelos microrganismos. As proteínas constituíram a componente principal da matriz EPS secretada pelos microrganismos, proporcionando uma maior aglomeração entre as partículas. Em relação às comunidades microbianas, a Fase I apresentou majoritariamente *Betaproteobactérias* (45%), destacando os gêneros *Acidovorax*, *Zoogloea* e *Thermomonas*. A Fase II destacou *Alphaproteobactérias* (64%), com presença de organismos desnitrificantes como *Mesorhizobium*, *Clostridium* e *Brachymonas*. As Fases III e IV apresentaram *Alphaproteobactérias* como a classe mais abundante (>43%). Contrastante a isso, a Fase V apresentou organismos da classe *Chitinophagia* (30,51%). Nessas três fases observou-se a ocorrência de organismos secretores de EPS, como os gêneros *Xanthomonas* e *Thauera*. O desempenho de tratamento do efluente não foi afetado pela adição dos biopolímeros. As eficiências de remoção obtidas (Fases I-V) ficaram entre 70 e 80% de DQO_S, 50 e 60% de NH₄-N e 10-31% de PT. Em conclusão, o processo de granulação foi acelerado tanto pela adição de alginato de sódio quanto pelo EPS, com recuperação da biomassa granular nos momentos de desintegração. Em todas as fases, o tratamento do efluente foi adequado e dentro dos limites de lançamento determinados pela legislação em vigor.

Palavras-chave: Reator em bateladas sequenciais; Esgoto sanitário; Lodo granular aeróbio; Biopolímeros; Agregação da biomassa.

ABSTRACT

Aerobic granular sludge (AGS) is an on-growing wastewater treatment technology all over the world, and is considered as an adaptation of the activated sludge process. However, the required period for granule formation and the instability of these aggregates are yet drawbacks for its real world application. Studies have suggested the application of external agents for enhanced granule formation in order to overcome these barriers. In this context, the present work evaluated the application of two biopolymers: sodium alginate and extracellular polymeric substances (EPS) extracted from AGS as enhancers of the aerobic granulation, in a granular sequencing batch reactor (GSBR) fed with low-strength real wastewater. This research was divided in 3 stages, in which the first aimed to determine the optimal dosage of the biopolymers through jar-test assays. The second stage consisted of Phases I and II, which focused to evaluate the effect of sodium alginate (Phase I – 107 days, 400 mg L⁻¹) and EPS extracted from AGS (Phase II – 100 days, 50 mg L⁻¹) on the formation and maintenance of granular biomass. The application of sodium alginate in Phase I promoted considerable adhesion of particles (2.9 ± 0.45 gTSS L⁻¹). It also demonstrated predominance of granular biomass (>50% over 212 µm diameter) from the 37th day onwards, and good biomass settleability (SVI₃₀ = 68 ± 11 mL g⁻¹). During Phase II, the predominance of granular biomass occurred from day 44th onwards. The biomass concentration was 1.3 ± 0.3 gTSS L⁻¹ and demonstrated good settleability (SVI₃₀ = 78 ± 21 mL g⁻¹). The third stage aimed to clarify the implications of different inoculum start-up conditions (Phase III – 1 g TSS L⁻¹; Phase IV e V - 3 g TSS L⁻¹) and the wastewater treatment efficiency while applying EPS in singular conditions for each phase (Phase III – 50 mg EPS L⁻¹; Phase IV - 250 mg EPS L⁻¹; Phase V - 250 mg EPS L⁻¹ + 100 mg Ca L⁻¹). The addition of calcium ions (Phase V) in the structure of the biopolymer contributed for statistically significant differences on the settling velocity and SVI₃₀ parameters, thus promoting a positive impact towards AGS development. Furthermore, the effect of EPS as a binding agent was related to its assimilation from the microorganisms. The secreted EPS matrix from these microorganisms showed proteins as its main constituent, which would further promote increased adhesion of particles. The microbial community analysis showed in Phase I the *Betaproteobacterias* (45%) as its most abundant class, while also highlighting the *Acidovorax*, *Zoogloea* e *Thermomonas* genus. Phase II featured *Alphaproteobacterias* (64%) as its most abundant class, alongside some denitrifying organisms, such as the *Mesorhizobium*, *Clostridium* e *Brachymonas* genus. Phases III and IV shared *Alphaproteobacterias* as their most abundant class (>43%). Contrarily, Phase V demonstrated organisms from *Chitinophagia* (30.51%) class. These three Phases shared some organisms responsible for EPS secretion, such as the *Xanthomonas* and *Thauera* genus. The addition of any of the biopolymers did not interfere on the reactor's treatment performance. Moreover, the removal efficiencies for all phases (Phases I – V) remained within 70 to 80% for SCOD, 50 to 60% for NH₄-N and 10 to 31% for TP. In conclusion, the addition of sodium alginate and EPS was able to improve the granulation process rate, as well as promoting the recovery of disintegrated biomass. Furthermore, all phases showed adequate wastewater treatment performance, and were in accordance to the effluent discharge parameters from the current legislation.

Keywords: Sequencing batch reactor; Aerobic granular sludge; Domestic wastewater; Biopolymers; Biomass aggregation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação do grânulo aeróbio.	30
Figura 2: Modelo esquemático de formação e desintegração de grânulos aeróbios, e aditivos para granulação e recuperação.	32
Figura 3: Representação dos efeitos de diversos aditivos para a formação de agregados microbianos.	33
Figura 4: Distribuição de proteínas, lipídios, polissacarídeos e células no LGA: (a) Proteínas em verde; (b) Lipídeos em amarelo; (c) α -polissacarídeo em azul claro; (d) Células totais em vermelho; (e) Células mortas em violeta; (f) β -polissacarídeo.	37
Figura 5: Representação dos monômeros do ácido algínico: (a) ácido D-manurônico, (b) ácido L-gulurônico.	39
Figura 6: Estrutura tipo “caixa de ovo” (egg-box model).	39
Figura 7: Delineamento experimental executado.	41
Figura 8: Esquema do sistema operacional, com detalhes do reator biológico.	42
Figura 9: Representação esquemática das etapas do ciclo operacional do RBSG.	43
Figura 10: Processo cronológico do teste de sedimentação separado por quatro fases. Onde ‘A’ corresponde ao sobrenadante, ‘B’ zona de sedimentação, ‘C’ zona de transição e ‘D’ zona de compressão.	47
Figura 11: Delineamento metodológico adotado para os testes de jarros.	53
Figura 12: Delineamento metodológico para as Fases I e II.	57
Figura 13: Médias e desvio padrão das concentrações de biomassa nas Fases I e II do estudo.	57
Figura 14: (A) Diâmetro dos grânulos, PS e PN ao longo do tempo; (B) $IVL_{5,10,30}$ e relação $IVL_{30/10}$ ao longo do tempo, Fases I e II.	58
Figura 15: Fotos do desenvolvimento dos grânulos aeróbios capturadas via microscopia óptica.	62
Figura 16: Abundância relativa dos microrganismos identificados nas Fases I e II em níveis de família e gênero.	63
Figura 17: Perfis de monitoramento ao longo de um ciclo operacional padrão (360 minutos) – Fase I (esquerda) – aos 72 dias e Fase II (direita)- aos 58 dias de operação.	66
Figura 18: Delineamento metodológico para as Fases III, IV e V.	67
Figura 19: Comparação dos resultados de dimensão, densidade e velocidade de sedimentação entre as fases III, IV e V.	70

Figura 20: Caracterização do EPS a partir das proteínas (BSA), ácidos húmicos, açúcares neutros (Glic) e urônicos (Glu) para as Fases III, IV e V por meio de gráficos tipo box-plot.....	71
Figura 21: Fotos do desenvolvimento da biomassa granular capturadas por meio de microscopia óptica durante as três fases do estudo.	73
Figura 22: Fotos capturadas no MEV para a biomassa nas Fases III, IV e V.....	74
Figura 23: Principais comunidades microbianas (> 1% do total) nas Fases III, IV e V, dispostas em gráfico tipo <i>sunburst</i>	75
Figura 24: Perfis de parâmetros monitorados para o tratamento do efluente durante ciclos operacionais nas Fases III, IV e V.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características de operação para sistemas LGA com adição de agentes melhoradores.	35
Tabela 2: Análises físico-químicas e biológicas para monitoramento do reator.....	43
Tabela 3: Resultados dos testes de jarros para determinar a dosagem de aplicação do EPS.	54
Tabela 4: Ensaio realizado para determinar a dosagem de aplicação para a Fase V.	55
Tabela 5: Síntese das dosagens aplicadas de biopolímeros e íons de cálcio, e de pH em cada fase operacional.....	56
Tabela 6: Condições operacionais: cargas e biomassa.....	59
Tabela 7: Desempenho de tratamento do RBSG durante as Fases I e II.....	65
Tabela 8: Resultados das análises físico-químicas para o LGA ao longo das Fases III, IV e V.....	68
Tabela 9: Tabela resumo apresentando os resultados obtidos no presente trabalho. .	79

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ALE: Exopolissacarídeo do tipo alginato (do inglês *Alginate-like exopolysaccharide*)

AUSB: Reator piloto de manta de lodo aeróbio operado com fluxo ascendente

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

DAPI: DNA intercalating dye 4,6 diamino-2 phenylindole

DBO: Demanda bioquímica de oxigênio

DQO: Demanda química de oxigênio

EDS: Espectroscopia de energia dispersiva

EPS: Substâncias Poliméricas Extracelulares

ETE: Estação de tratamento de efluentes

FISH: Hibridização fluorescente in situ

FTIR: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

IVL: Índice Volumétrico de lodo

LABEFLU: Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos

LB-EPS: Loosely-bound EPS

LCME: Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

LGA: Lodo granular aeróbio

MEV: Microscópio eletrônico de varredura

N: Nitrogênio

P: Fósforo

PAC: Cloreto de poli alumínio

PM: Peso molecular

RBS: Reator em bateladas sequenciais

RBSG: Reator em bateladas sequenciais com lodo granular aeróbio

SNIS: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

SSF: Sólidos suspensos fixos

SST: Sólidos suspensos totais

SSV: Sólidos suspensos voláteis

TB-EPS: Tightly-bound EPS

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

VS: Velocidade de sedimentação

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1	HIPÓTESE	26
1.2	OBJETIVOS	27
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	LODO GRANULAR AERÓBIO	29
2.2	REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM LODO GRANULAR AERÓBIO (RBSG)	30
2.3	LIMITAÇÕES DA GRANULAÇÃO AERÓBIA.....	31
2.4	USO DE POLÍMEROS COMO FLOCULANTES	31
2.5	USO DE ADITIVOS NO PROCESSO DE GRANULAÇÃO AERÓBIA	32
2.6	SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS)	36
2.7	ALGINATO.....	38
3.	METODOLOGIA.....	41
3.2	FUNCIONAMENTO DO REATOR.....	42
3.3	MONITORAMENTO DO REATOR E DA BIOMASSA.....	43
3.4	DETERMINAÇÃO DA DOSAGEM DOS BIOPOLÍMEROS EM TESTES DE JARROS	50
3.5	APLICAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS NO RBSG.....	51
4.	RESULTADOS	53
4.1	DOSAGENS DE APLICAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS	53
4.2	FASES I E II - APLICAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO E EPS COMO AGENTES FACILITADORES DA GRANULAÇÃO	56
4.3	FASES III, IV E V - APLICAÇÃO DE EPS COMO AGENTE FACILITADOR DA GRANULAÇÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS	67
5.	DISCUSSÃO INTEGRADA	79
6.	CONCLUSÃO.....	83
7.	SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS	85

8. REFERÊNCIAS.....	87
LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	99
APENDICE A – Processo de obtenção de alginato via algas marinhas marrons.....	101
APENDICE B – Perfis do espectro FTIR para as fases III, IV e V.....	102

1. INTRODUÇÃO

Nas estações de tratamento de efluentes (ETE) tem-se buscado não apenas um tratamento eficiente do esgoto, como também a recuperação de recursos como água e nutrientes (FERREIRA et al., 2021; MCCARTY et al., 2011), celulose (LIBARDI et al., 2020) e biopolímeros (SCHAMBECK et al., 2020), complementando a função inicial dessas instalações de proteção ambiental.

O cenário nacional brasileiro, porém, apresenta uma condição deficitária quanto ao sistema de coleta e tratamento de efluentes, o qual não ultrapassa 50% de todo o território (SNIS, 2018). Logo, a adoção de formas mais adequadas e acessíveis para o tratamento de efluentes surge como interesse e necessidade. Para nortear e delimitar padrões, algumas leis, políticas públicas e diretrizes foram estabelecidas. Dentre estas, podem ser citadas a Política Nacional de Recursos Hídricos (Lei 9.433/1997); a Lei 11.445 de 2007, que estabelece as Diretrizes Nacionais Para o Saneamento Básico e Para a Política Federal de Saneamento Básico; além das Resoluções 357/2005 e 430/2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), as quais descrevem diretrizes e parâmetros para lançamento de efluentes nos corpos receptores. Ainda com maior restrição que as definições nacionais, no Estado de Santa Catarina, tem-se a Lei 14.675/2009 que delimita as condições de $DBO_{5,20}$ de 60 mg/L ou 80% de remoção para o lançamento de efluentes; e fósforo total de 4 mg/L para lançamento em ambientes lênticos.

Dentre as tecnologias biológicas utilizadas para o tratamento de efluentes, o sistema de lodos ativados é amplamente reconhecido e aplicado. Contudo, a necessidade de ampla área de implantação, design complexo e os altos custos de operação para a remoção completa de nutrientes, são condições não sustentáveis para essa prática. Nesse sentido, a tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) propõe suprir essas problemáticas, por meio de operação e manutenção simplificadas, menor consumo energético e área requerida, melhor separação sólido-líquido, em conjunto com o tratamento eficaz de efluentes (SHARMA et al., 2019). O processo consiste no desenvolvimento de grânulos aeróbios em reatores em bateladas sequenciais (RBS), em que a biomassa na forma de flocos, típica do sistema de lodos ativados, torna-se granular. Essa biomassa é composta por agregados microbianos que apresentam elevada densidade, velocidade de sedimentação e concentração. Os agregados podem possuir, de forma simultânea, zonas aeróbias, anóxicas e anaeróbias, a partir da limitação na difusão de oxigênio para o interior da estrutura formada. A estratificação estimula o crescimento de microrganismos com metabolismo diversificado, proporcionando a remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo, resultando em um efluente tratado de boa qualidade (WAGNER et al., 2015).

Apesar das vantagens apresentadas pela tecnologia de lodo granular aeróbio, algumas lacunas, como a estabilidade e o tempo de formação dos grânulos, foram reportadas como barreiras para seu uso (FRANCA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018). Os estudos já realizados sobre essa temática identificaram a importância das comunidades microbianas (GRAAF et al., 2020), das diferentes composições das substâncias poliméricas extracelulares

(EPS) (KARAKAS et al., 2020; NOUHA et al., 2018), da composição e carga aplicada do efluente (LIANG ET AL., 2019), das diversas interações entre grupos funcionais tanto presentes na estrutura do grânulo quanto no licor misto (FENG et al., 2021; GUO et al., 2020) e dos principais processos enzimáticos participantes na estruturação e estabilidade do agregado (ZHANG et al., 2019).

O Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) vem desenvolvendo estudos relativos à granulação aeróbia desde 2007 (JUNGLES, 2011; WAGNER et al., 2015; GUIMARÃES, 2017; MAGNUS, 2019; XAVIER et al., 2021), com o objetivo de responder questões apresentadas na literatura, como por exemplo, a formação dos agregados microbianos e sua instabilidade após longos períodos de operação. Nesse sentido, a adição de agentes externos, como os biopolímeros, pode proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento do sistema com LGA, mantendo um tratamento eficiente do esgoto.

O uso de agentes externos, tais como íons livres, coagulantes comerciais, floculantes microbianos e compostos a base de lodo biológico, surge como alternativa para melhorar a granulação (DA COSTA et al., 2020). Nessa ótica, as pesquisas sobre o tema no grupo do LABEFLU avançaram sobre a recuperação de biopolímeros do LGA e suas diferentes aplicações (LADNORG et al., 2019; DALL'AGNOLL et al., 2020 e 2021; SCHAMBECK et al., 2020a e 2020b), e também a aplicação de agentes facilitadores da granulação, como o uso de nanopartículas de magnetita em um reator em bateladas sequenciais com LGA (DOMINGOS et al., 2020).

De modo a dar continuidade aos estudos do LABEFLU sobre a recuperação de recursos (biopolímeros) e tratamento eficiente de esgoto sanitário, a presente pesquisa foi delineada para a aplicação de dois aditivos: alginato de sódio comercial e substâncias poliméricas extracelulares - EPS (do inglês extracellular polymeric substances) extraídas de LGA, visando reduzir o tempo de granulação (> 200 dias em geral) e proporcionar a manutenção da biomassa granular em um RBS, em escala piloto, trabalhando com esgoto sanitário real de baixa concentração.

1.1 HIPÓTESE

O estudo teve como hipótese:

“Os biopolímeros produzidos por algas, tais como alginato de sódio, e as substâncias poliméricas extracelulares (EPS), extraídas de lodo granular aeróbio, atuam como agentes agregadores de biomassa. Sua aplicação em reatores com lodo granular aeróbio acelera a granulação e contribui para a recuperação de biomassa desintegrada, sem prejudicar a eficiência do processo de tratamento”.

1.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação dos biopolímeros: alginato de sódio e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) extraídas de lodo granular aeróbio, como aditivos para redução do tempo de granulação e manutenção da biomassa granular, em um reator operado em bateladas sequenciais usado para tratamento de esgoto sanitário.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da adição dos biopolímeros estudados nas características físico-químicas e biológicas da biomassa granular durante a operação do reator em longo tempo (> 100 dias).
- Determinar as características físico-químicas da biomassa para diferentes condições operacionais de aplicação do EPS.
- Avaliar a eficiência de tratamento do esgoto sanitário pelo reator com a adição dos biopolímeros, para as diferentes condições operacionais estudadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LODO GRANULAR AERÓBIO

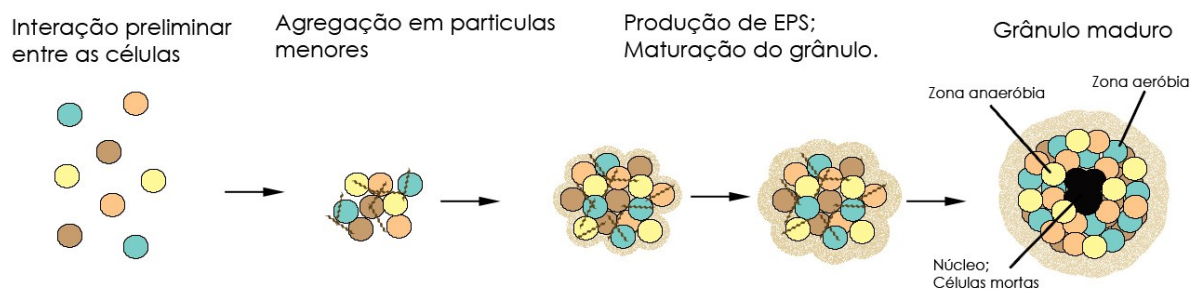
A granulação aeróbia tem sido estudada por mais de 20 anos, com as primeiras ocorrências relatadas por Mishima e Nakamura (1991) em um reator piloto de manta de lodo aeróbio operado com fluxo ascendente (do inglês Aerobic Upflow Sludge Blanket - AUSB). Esherden et al. (1997) também observaram a presença de lodo granular aeróbio (LGA) em um reator em bateladas sequenciais. Os autores identificaram melhor sedimentabilidade para a biomassa formada em relação aos flocos desenvolvidos pela tecnologia de lodos ativados. No entanto, a patente do processo de tratamento de efluentes utilizando LGA foi concedida para Heijnen e van Loosdrecht (1998). A Universidade Técnica de Delft em conjunto com a empresa Royal Haskoning DHV chamaram comercialmente a tecnologia como Nereda®. Desde então, muitos estudos já foram realizados, utilizando reatores em escala laboratorial (CAMPO et al., 2020; LAYER et al., 2020), escala piloto (GUIMARÃES et al., 2018; XAVIER et al., 2021); e escala real (PRONK et al., 2015).

A tecnologia com LGA vem ganhando representatividade quando comparada com outras tecnologias biológicas de tratamento de efluentes, devido à facilidade de operação e manutenção, menor consumo energético e área necessária para implantação, boa remoção de matéria orgânica e de nutrientes (nitrificação/desnitrificação e fósforo) (SARMA et al., 2017), elevada tolerância a condições adversas, como variações de temperaturas ou presença de compostos fenólicos no efluente (GHOSH; CHAKRABORTY, 2021; HALIM et al., 2019). A sua aplicação pode ser tanto para o tratamento de efluentes domésticos (XAVIER et al., 2021), como para efluentes industriais (PURBA et al., 2020). Mais de 30 plantas encontram-se em construção ou em operação atualmente ao longo dos continentes da Europa, África, Ásia, Oceania e América do Sul. No Brasil, a primeira planta Nereda® foi inaugurada em meados de maio/2016 no Rio de Janeiro (RJ).

A principal característica desta tecnologia é o desenvolvimento de grânulos aeróbios a partir da biomassa suspensa no reator em bateladas sequenciais (RBS). Grânulos são considerados agregados microbianos densos e estruturados por meio da produção bacteriana de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Esses agregados podem conter zonas aeróbia e anaeróbia/anóxica, as quais podem ser desenvolvidas através da limitação na difusão do oxigênio para o seu interior (FRANCA et al., 2018). Alguns pesquisadores estabeleceram parâmetros quantitativos para descrever um grânulo aeróbio e seu grau de desenvolvimento. De Kreuk et al. (2005) propuseram, para que a biomassa aeróbia seja considerada granular, que pelo menos 50% das partículas microbianas devem possuir diâmetros maiores que 200 μm . No entanto, o processo de granulação é considerado completo (maduro) quando 80% das partículas atingem diâmetro igual ou superior ao descrito (SHARMA et al., 2019). O índice volumétrico de lodo (IVL) também é utilizado para a avaliação da sedimentabilidade e características da biomassa. Esta, quando granular, apresenta IVL_{30} menor que 50 mL g^{-1} (BEUN et al., 2002). Uma relação $\text{IVL}_{30/10}$ mais próxima de 1 corresponde a uma melhor sedimentabilidade da biomassa. Valores dessa relação superiores a 0,9 correspondam ao processo de granulação completo (LIU e TAY, 2007).

De acordo com Sarma et al. (2017), o mecanismo de granulação ocorre em quatro etapas, que compreendem desde o contato inicial célula-célula até a maturação do grânulo (Figura 1).

Figura 1: Formação do grânulo aeróbio.



Fonte: Autor, 2021.

O desenvolvimento da biomassa granular ocorre principalmente em reatores em batelada sequenciais (RBS) devido à sua flexibilidade operacional e condições de cisalhamento da biomassa causada pela passagem do ar no seu interior (NANCHARAI AH; REDDY, 2018).

2.2 REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM LODO GRANULAR AERÓBIO (RBSG)

A utilização do RBS se torna vantajosa, uma vez que é possível realizar todas as etapas de tratamento no mesmo tanque, separados somente por intervalos de tempo (SARMA et al., 2017). Um ciclo de tratamento em RBS é compreendido por cinco etapas, sendo elas: enchimento, aeração, sedimentação, descarte e repouso (ARTAN; ORHON, 2005; METCALF; EDDY, 2003). No enchimento acontece a alimentação do reator de forma estática ou com mistura mecânica. Em seguida tem-se a fase de reação, que corresponde a um período com aeração, onde ocorre a mistura da biomassa com o efluente, objetivando completar as reações de degradação de matéria orgânica e oxidação do nitrogênio amoniacal do efluente. A fase de sedimentação é onde ocorre o desligamento dos aeradores, e consequentemente a separação entre as fases sólida e líquida, resultando em uma cama de lodo sedimentada e o efluente clarificado. Durante o descarte ocorre a retirada do sobrenadante do reator. Por fim, a fase de repouso pode ser utilizada para aumentar uma ou mais fases de um ciclo. O controle da idade do lodo pode ser feito a partir de descartes da biomassa, realizados tanto no momento de repouso quanto no momento de aeração. A biomassa remanescente permanece no reator para os próximos ciclos de tratamento (JORDÃO; PESSÔA, 2005).

Os tempos de cada etapa podem ser controlados e definidos de acordo com os objetivos do processo de tratamento, como a remoção de nutrientes, por exemplo. De Kreuk e van Loosdrecht, (2006) reportaram um estudo utilizando esgoto sanitário, em RBSG, com ciclos de 2 horas de duração, resultando em baixas eficiências de remoção (49% de matéria carbonácea e 11% de compostos nitrogenados). Em contraste, Wagner et al. (2015) propuseram, também utilizando esgoto sanitário em um RBSG, tempos de ciclo de 3 e 4 horas, resultando em remoções superiores (78% de matéria carbonácea e 23% de compostos nitrogenados).

A alimentação do reator pode ser realizada de forma rápida, visando a simples entrada do efluente no reator, bem como de forma lenta, através do fluxo pistonado, sendo caracterizado como alimentação anaeróbia. Diferentes propostas na alimentação do RBS, e nos períodos de cada etapa de tratamento, influenciam no desenvolvimento da comunidade

microbiana, eficiência de remoção e na estabilidade dos agregados (CARRERA et al., 2019; XAVIER et al., 2021).

2.3 LIMITAÇÕES DA GRANULAÇÃO AERÓBIA

A aplicação de diversas estratégias operacionais ainda não supriu as lacunas observadas para a tecnologia com LGA (WINKLER et al., 2018). A instabilidade e os longos períodos de formação dos grânulos são os principais problemas da aplicação real do processo (GUIMARÃES et al., 2018; SGUANCI et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

A estabilidade do LGA está relacionada com os parâmetros operacionais do reator, comunidade microbiana, regime de alimentação, carga orgânica aplicada e inóculo utilizado (DERLON et al., 2016; FRANCA et al., 2018). O EPS é considerado um dos principais fatores influenciando a resistência mecânica do LGA, devido a sua habilidade em formar estruturas com características de hidrogel. Logo, entender a relação entre esses fatores pode proporcionar um processo de granulação mais estável (FELZ et al., 2020). Foi reportado que os grânulos aeróbios colidiriam entre si ou na estrutura do reator durante a operação do sistema, resultando em erosão, abrasão ou fragmentação dessas partículas (VERAWATI et al., 2013). Essa condição foi identificada principalmente em grânulos com grandes dimensões (superiores a 1000 µm), devido às limitações de substrato no interior do agregado, levando a um núcleo interno enfraquecido (LIU; TAY, 2004). A presença dessas partículas fragmentadas pode ser considerada como material formador de novos aglomerados (PIJUAN et al., 2011).

O desenvolvimento de microrganismos filamentosos apresenta-se negativo para a estabilidade dos grânulos, podendo ocasionar o descarte (*washout*) da biomassa para fora do sistema e conseqüentemente levar a falhas do sistema granular (SHARMA et al., 2019). A obstrução dos poros do grânulo pela produção excessiva de EPS, materiais particulados e coloidais normalmente encontrados no esgoto sanitário real, pode resultar na difusão deficitária de nutrientes e transporte de metabólitos ao longo da sua estrutura, implicando na piora da atividade microbiológica e conseqüentemente na desintegração do agregado (LEMAIRE et al., 2008).

Algumas hipóteses dos pontos chave para o processo de granulação foram discutidos, tais como a composição de EPS (AJAO et al., 2018; FENG et al., 2021), a realização de processos enzimáticos específicos (HUANG et al., 2019) ou a interação entre a comunidade microbiana, EPS e componentes presentes no licor misto (FELZ et al., 2020). Portanto, promover condições como o aumento da densidade, resistência, aglomeração entre partículas, concentração da biomassa desses agregados e desenvolvimento de microrganismos específicos tornam-se o foco das pesquisas atuais (CAI et al., 2021; ROLLEMBERG et al., 2018).

2.4 USO DE POLÍMEROS COMO FLOCULANTES

O uso de polímeros sintéticos para aglomeração de partículas, tais como o cloreto de poli alumínio (PAC), sulfato de alumínio ou o cloreto férrico, se deve principalmente aos elevados pesos moleculares ou a habilidade de neutralização de cargas desses materiais, correspondendo à elevadas taxas de floculação entre as partículas (AJAO et al., 2021)

Biopolímeros como EPS, goma xantana e alginato são resultado de processos metabólicos dos microrganismos capazes de agregar as partículas suspensas no meio. A utilização desses compostos como biofloculantes pode ser mais economicamente viável e proporcionar menor impacto ao meio em diversas atividades, como a de remoção de metais

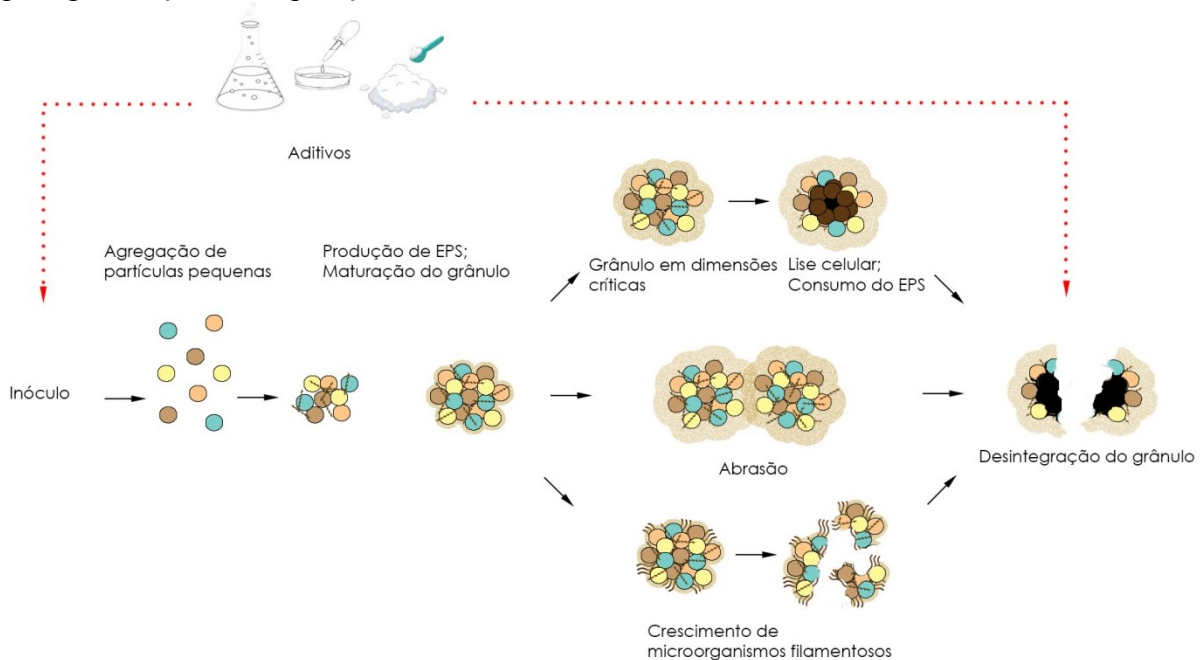
pesados, processos de separação de óleos e graxas, e no gerenciamento de estações de tratamento de água e esgoto (MOHAMMED; DAGANG, 2019).

Estudos recentes identificaram que a matriz de EPS é composta por diferentes pesos moleculares (PM). As frações de elevado e médio PM foram vinculadas às longas cadeias de polissacarídeos, já as de baixo PM às proteínas extracelulares (AJAO et al., 2018). Essa matriz é considerada uma mistura heterogênea e corresponde a pelo menos 50% da biomassa (WEI et al., 2019), contribuindo para a aglomeração de partículas, de forma que cada fração dos PM (baixo, médio e alto) teria efeitos individuais e interagiriam separadamente uma da outra na presença de cátions divalentes (WANG et al., 2018).

2.5 USO DE ADITIVOS NO PROCESSO DE GRANULAÇÃO AERÓBIA

A aplicação de agentes externos, como facilitadores do processo de granulação e estabilização da biomassa, tem sido estudada nos últimos tempos (DA COSTA et al., 2020). Esses podem proporcionar maior área de contato entre partículas, o aumento da produção de EPS e concentração de biomassa, neutralização de cargas da superfície das células, acelerar os processos metabólicos dos microrganismos e proporcionar a interação entre os componentes funcionais de EPS e os compostos presentes no licor misto, resultando em estruturas tipo gel mais estáveis (Figura 2) (AJAO et al., 2021; FELZ et al., 2020).

Figura 2: Modelo esquemático de formação e desintegração de grânulos aeróbios, e aditivos para granulação e recuperação.

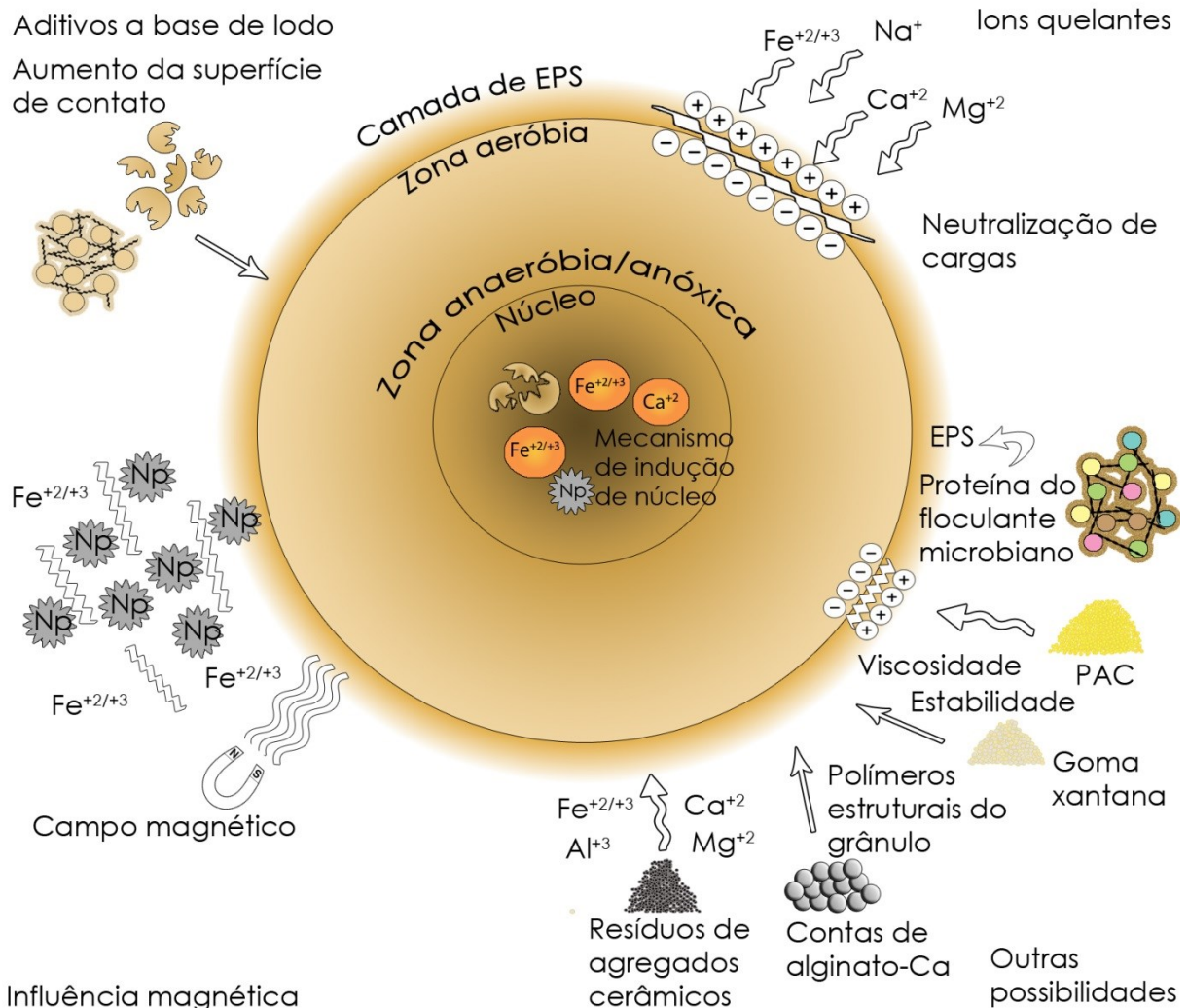


Fonte: Autor, 2021.

Os aditivos aplicados são: (a) íons quelantes, como Ca^{+2} (BARROS et al., 2021), Mg^{+2} (LI et al., 2009), Na^{+} (HOU et al., 2019), $\text{Fe}^{+2/+3}$ (CAI et al., 2018) e matrizes multi-iônicas (água do mar) (LI et al., 2017); (b) coagulantes, como cloreto de poli alumínio (do inglês poly aluminum chloride - PAC) (LIU et al., 2014); (c) floculantes microbianos (LIANG et al., 2019); (d) aplicação de um campo magnético estático (WANG et al., 2012); (e) nanopartículas de magnetita (DOMINGOS et al., 2020); (f) aditivos a base de lodo biológico,

como lodo granular aeróbio macerado (PIKUAN et al., 2011), lodo granular anaeróbio (LINLIN et al., 2005), lodo desidratado (WANG et al., 2019); (g) goma xantana (LIU et al., 2017); (h) resíduos de agregados cerâmicos (CZARNOTA et al., 2018); e (i) esferas de alginato reticuladas em solução de cálcio (SUN et al., 2017). Na Figura 3 estão apresentados, de forma esquemática, as aplicações e os efeitos desses aditivos sobre a biomassa granular.

Figura 3: Representação dos efeitos de diversos aditivos para a formação de agregados microbianos.



Fonte: Adaptado de Da Costa et al. (2020).

Íons quelantes durante o processo de tratamento podem interagir com o LGA tanto nas suas características físicas e químicas, quanto nas estruturais. Isto pode ocorrer através da neutralização das cargas negativas presentes na superfície da célula bacteriana, por meio do comportamento ‘tipo ponte’, onde, por sua vez, auxilia na conexão entre o EPS produzido pelos microrganismos e a superfície bacteriana, ou também como núcleo de novos agregados, acelerando a formação destes. Esses aditivos também podem promover a acumulação de íons metálicos nas células e a produção de EPS (LI et al., 2020). O efeito resultante da interação entre o EPS e os íons disponíveis pode variar não somente devido à composição do EPS, mas também pelo tipo de íon.

Estruturas tipo gel enfraquecidas foram observadas por Guo et al. (2020), devido à interação de íons com os grupos carboxílicos. A resistência dessas estruturas pode ser

atribuída à seleção iônica para os compostos presentes no EPS, como as proteínas, açúcares e substâncias húmicas. Ademais, foi relatado que esses compostos não interagem somente com os íons metálicos, mas também entre si. Aditivos desenvolvidos a partir do lodo biológico foram avaliados de modo a obterem-se grânulos mais rapidamente e um sistema LGA estável (LINLIN et al., 2005; PIJUAN et al., 2011), os quais promovem agregação facilitada por agirem como núcleo para as células disponíveis, em conjunto com o aumento da concentração de sólidos no sistema. Esses efeitos podem reduzir o tempo para ‘start-up’ do reator por pular as etapas iniciais do processo de granulação. Igualmente, a presença de macromoléculas e cátions na matriz do EPS (YU et al., 2009), e a interação entre esses compostos e íons disponíveis, microrganismos e fonte de carbono/nitrogênio podem acelerar e estabilizar o processo de granulação (NOUHA et al., 2018). Foram relatados grânulos estáveis, com estrutura lisa e bem formada, assim como o rápido aumento da concentração de EPS após a aplicação desses agentes externos.

Os efeitos dos campos magnéticos acerca do crescimento e da habilidade de biodegradação dos microrganismos, foram identificados em diversos estudos (JI et al., 2010; TOMSKA; WOLNY, 2008). O campo magnético pode promover o aumento do número de células no sistema por meio da interação com a atividade de transcrição específica da fase estacionária das bactérias (ZHANG et al., 2002). Łebkowska et al. (2011) ainda acrescentam que o efeito causado pelo campo magnético está relacionado com a alocação dos ímãs em conjunto com a distribuição espacial do campo magnético gerado. A aplicação desse agente no sistema LGA ocasionou a formação acelerada dos grânulos, assim como estimulou a presença de íons de ferro no interior do agregado (WANG et al., 2012).

Concentrações elevadas de $Fe^{+2/+3}$ durante o processo de tratamento de efluentes podem auxiliar na formação dos grânulos pelo estímulo na produção de EPS, agindo como núcleo inorgânico para a formação de novos agregados (CAI et al., 2018), como também interagindo com os grupos funcionais disponíveis do EPS (FELZ et al., 2020). A adição de materiais como as nanopartículas de magnetita proporcionam a acumulação de íons de ferro resultante em campo magnético no interior da biomassa (WANG et al., 2012), conseqüentemente, auxiliando o ‘start-up’ do reator em conjunto com a estabilidade dos grânulos e produção de EPS (DOMINGOS et al., 2020). Entretanto, ainda é discutido o efeito dos íons de ferro sobre a comunidade microbiana presente, uma vez que se encontram resultados divergentes sobre a temática (DOMINGOS et al., 2020; REN et al., 2018; WANG et al., 2012).

O emprego de outros materiais como possíveis aceleradores da granulação foi definido a partir do seu atual uso como aglomerantes em diversas áreas das indústrias alimentícia, farmacêutica, petrolífera e metalúrgica, e gerenciamento de estações de tratamento de água para consumo. Dentre eles destacam-se a goma xantana (LIU et al., 2017), resíduos de agregados cerâmicos (CZARNOTA et al., 2018), floculantes microbianos (LIANG et al., 2019), PAC (LIU et al., 2014) e esferas de alginato de cálcio (SUN et al., 2017). A goma xantana, conhecida como um biopolímero termoestável produzido industrialmente pode proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento de grânulos aeróbios (LIU et al., 2019), devido à sua capacidade de aumentar a viscosidade do meio, mesmo diante de uma grande variação de temperatura e pH (SUN; GUNASEKARAN, 2009). Ainda, pode proporcionar aos agregados boa resistência mecânica e sedimentabilidade. Na Tabela 1 está apresentada uma síntese de resultados obtidos com o uso de aditivos como melhoradores da granulação aeróbia.

Tabela 1: Características de operação para sistemas LGA com adição de agentes melhoradores.

Aditivo	Configuração e operação do reator	Dimensão média dos grânulos (μm)	Tempo requerido para granulação	IVL ₃₀	Eficiência de tratamento	Referência
Íon de cálcio (0 e 100 mg L ⁻¹ CaCl ₂)	SBR (7,2 L); Lodo ativado como inóculo; Efluente sintético; TV: 50%; 190 dias de operação	Controle > 1000 μm Aditivo > 1000 μm	-	Controle: 100 mL g ⁻¹ Aditivo: 50 mL g ⁻¹	Controle: 95% DQO 85% NH ₄ -N 39% PO ₄ ³⁻ -P Aditivo: 95% DQO 91% NH ₄ -N 41% PO ₄ ³⁻ -P	Barros et al. (2020)
Íon de cálcio (0 e 100 mg L ⁻¹ CaCl ₂)	SBR (2L); Lodo ativado como inóculo; Efluente sintético; TV: 50%; 75 dias de operação	Controle: 2000 μm Aditivo: 2800 μm	Controle: 32 dias Aditivo: 16 dias	Controle: 172 mL g ⁻¹ Aditivo: 73 mL g ⁻¹	Controle: 98% DQO Aditivo: 93% DQO	Jiang et al. (2003)
Íon de magnésio (0 e 10 mg L ⁻¹ MgSO ₄)	SBR (10L); Lodo ativado como inóculo; Efluente sintético; TV: 50%; 52 dias de operação	Controle: 1800 μm Aditivo: 2900 μm	Controle: 32 dias Aditivo: 18 dias	Controle: 25 mL g ⁻¹ Aditivo: 25 mL g ⁻¹	Controle: 90% DQO Aditivo: 91% DQO	Li et al. (2009)
Goma Xantana (0 a 40 mg L ⁻¹)	SBR (2L); Lodo ativado como inóculo; Efluente sintético; TV: 50%; 30 dias de operação	-	Controle: 30 dias Aditivo: 20 dias	Controle: 58 mL g ⁻¹ Aditivo: 42 mL g ⁻¹	Controle: 95% DQO 93% NH ₄ -N Aditivo: 96% DQO 97% NH ₄ -N	Liu et al. (2017)
Floculante microbiano (0 e 50 mg L ⁻¹)	SBR (4L); Lodo ativado como inóculo; Efluente sintético; TV: 50%; 60 dias de operação	Controle: 800 μm Aditivo: 800 μm	Controle: 52 dias Aditivo: 39 dias	Controle: 25 mL g ⁻¹ Aditivo: 25 mL g ⁻¹	Controle: 98% DQO 93% NH ₄ -N 80% PO ₄ ³⁻ -P Aditivo: 98% DQO 97% NH ₄ -N 80% PO ₄ ³⁻ -P	Liang et al. (2019)

* TV: Troca volumétrica.

Fonte: Autor, 2021.

A produção de EPS pelos microrganismos também foi alterada pela influência desse aditivo, refletindo em maiores porções e produção de proteínas em comparação com os polissacarídeos na estrutura polimérica (CAMPO et al., 2018). As propriedades tipo gel sobre a biomassa podem ser relacionadas ao possível aumento de estruturas proteicas secundárias na

estrutura do biofilme, principalmente α -helix e as ligações de hidrogênio intermoleculares (LI et al., 2020). Contudo, ainda são necessárias análises mais aprofundadas da estrutura granular sob efeito do aditivo.

Apesar de serem considerados como uma fração descartável, os resíduos de agregados cerâmicos foram avaliados como agregadores de LGA, devido à vasta disponibilidade de íons em si mesmo, dentre eles destacam-se Si^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} , $\text{Fe}^{+2/+3}$ e Mg^{+2} (CZARNOTA et al., 2018). O impacto esperado no sistema de tratamento e desenvolvimento da biomassa está relacionado não só com os íons disponíveis (FELZ et al., 2020), como também com o tamanho das partículas do resíduo (HE et al., 2016). A introdução deste material pode proporcionar aumento na concentração da biomassa e melhora da sedimentabilidade do lodo, como também formação facilitada de grânulos. O PAC, usualmente aplicado como coagulante no tratamento de água e efluentes (GAO; YUE, 2005), age como intensificador do processo de granulação e estabilidade do sistema, conforme a teoria de nucleação cristalina desenvolvida por Gibbs (1879) (ZHANG et al., 2019). A aplicação do aditivo resultou em efeitos benéficos na biomassa, como formação de grânulos mais acelerada, melhor compactidade e resistência mecânica, como também elevada produção de EPS e concentração de biomassa (LIU et al., 2014). A interação do coagulante sobre a biomassa foi descrita como ligações ‘tipo ponte’ entre partículas e neutralização de cargas elétricas na superfície das células (LIU et al., 2016).

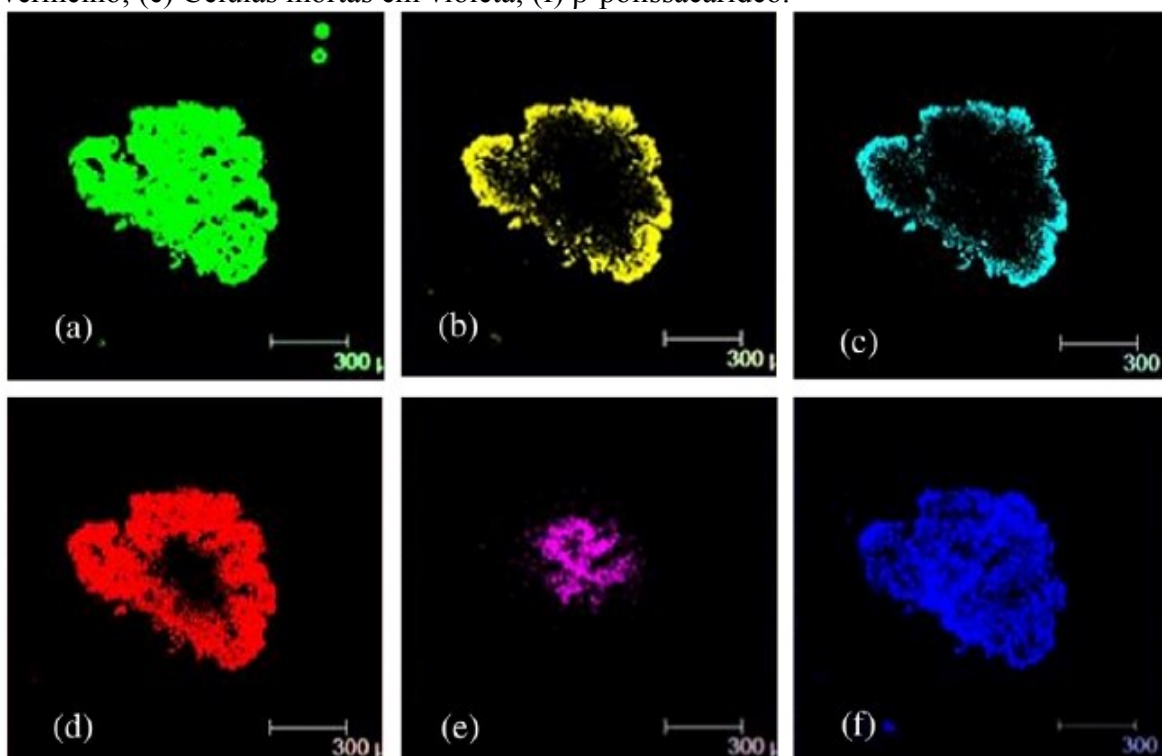
2.6 SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS)

EPS são consideradas macromoléculas orgânicas formadas a partir da polimerização de blocos construtivos semelhantes ou iguais, as quais podem se interligar através de unidades repetidas na molécula polimérica, assim como os polissacarídeos (SALAMA et al., 2016). Os principais constituintes dessa macromolécula são as proteínas, polissacarídeos, substâncias húmicas, ácidos urônicos e nucléicos (WINGENDER et al., 1999). Essas estruturas são consideradas um material gelatinoso formador de uma matriz tridimensional, que se liga à superfície das células através da ligação cruzada entre os materiais poliméricos. Em reatores biológicos, o estresse causado no meio proporciona uma reação metabólica dos microrganismos, a qual consiste na produção de EPS através da secreção e lise celular (DING et al., 2015).

A presença do EPS nos biofilmes promove uma maior resiliência, elasticidade e resistência para a comunidade microbiana (SHENG et al., 2010). Por meio de análises químicas e microscópicas, foi possível identificar que as concentrações e a distribuição dos constituintes do EPS divergem entre as tecnologias biológicas de tratamento de efluentes (SEVIOUR et al., 2010). Esse material gelatinoso pode adsorver poluentes orgânicos como fenantreno (LIU et al., 2001), ácidos húmicos (ESPARZA-SOTO; WESTERHOFF, 2001) e corantes (DALL’AGNOL et al., 2020; LADNORG et al., 2019). Além disso, ele ainda proporciona uma maior retenção de água e a sorção de nutrientes exógenos (AJAO et al., 2021). Os grânulos desenvolvidos em sistemas de LGA são compostos principalmente na sua parte externa por células microbianas e polissacarídeos, e no seu centro por proteínas (SHARMA et al., 2019). ZHANG et al. (2007) ainda sugerem que as moléculas de proteínas presentes no núcleo do agregado desempenham o papel de formação e estabilidade, em contraste com os β -polissacarídeos não solúveis, localizados na parte externa, que proporcionam força de coesão. A Figura 4 demonstra a distribuição no lodo granular aeróbio de proteínas, lipídios, polissacarídeos, células vivas e mortas. A estrutura do grânulo é formada por uma rede composta, principalmente, de β -polissacarídeos, os quais se comportam como suporte para a incorporação de proteínas, lipídeos, α - polissacarídeos e células. Foi

identificado que a hidrólise dessa estrutura formada pelos polissacarídeos ocasionaria a desintegração dos grânulos, contrário a hidrólise das proteínas, as quais teriam um impacto mínimo na estabilidade estrutural do grânulo (ADAV et al., 2008).

Figura 4: Distribuição de proteínas, lipídios, polissacarídeos e células no LGA: (a) Proteínas em verde; (b) Lipídeos em amarelo; (c) α -polissacarídeo em azul claro; (d) Células totais em vermelho; (e) Células mortas em violeta; (f) β -polissacarídeo.



Fonte: Adaptado de Adav et al. (2008).

Acredita-se que o EPS secretado pelas bactérias proporciona diversos sítios para interação entre partículas, conseqüentemente resultando na aglomeração destas. Diversos fatores podem influenciar a estrutura do EPS secretado, como a complexidade da fonte de carbono e nutrientes para os microrganismos e a presença de compostos inibidores (FENG et al., 2021). Estudos relataram efeitos adversos no processo de granulação relacionados à presença de íons de cobre, compostos fenólicos, ambiente salino, entre outros, durante o processo de tratamento (LIN et al., 2020). Além disso, foram identificados que as estruturas presentes na matriz do EPS estratificavam-se em três grupos de pesos moleculares diferentes, os quais afetam a interação entre partículas de forma singular (AJAO et al., 2021).

Diferentes técnicas de extração de EPS foram desenvolvidas e testadas a partir de fontes em que esse material pudesse ser encontrado, como em culturas puras de microrganismos, flocos e biofilmes. A recuperação desse recurso tem como objetivo elucidar a sua estrutura química, propriedades físico-químicas e funções biológicas (SALAMA et al., 2016). A eficiência da extração é medida pela quantidade de EPS extraído da matéria orgânica total disponível, ou também pela proporção de EPS extraído do total de EPS contido na célula (FELZ et al., 2016). Acrescentando a isto, a extração deste componente deve manter a sua estrutura intacta e causar lise celular mínima (NOUHA et al., 2018). Contudo, as formas de extração de EPS foram desenvolvidas com base na solubilização da matriz de EPS (DING et al., 2015), que desconsideram a ação de agentes insolúveis que influenciam a agregação das células, como os polissacarídeos com estrutura tipo gel (SEVIOUR et al., 2012) e amilóides

(LARSEN et al., 2008). O EPS presente nas células pode ser estratificado em EPS solúvel e EPS ligado às células (GUO et al., 2020). O primeiro representa a parte do EPS sujeita a ser removida com processos de lavagem, este se encontra como a camada mais externa, também definida como moderadamente ligada (do inglês *loosely-bound*) (LB-EPS). Já o segundo encontra-se como uma camada em torno da parede celular, mais densa e concentrada, também definida como fortemente ligada (do inglês *tightly-bound*) (TB- EPS) (DING et al., 2015).

Dentre os polissacarídeos extracelulares identificados na formação do EPS, encontra-se o exopolissacarídeo do tipo alginato, do inglês *alginate-like exopolysaccharide* (ALE). Nele foram identificados altos níveis de ácido gulurônico e manurônico, caracterizando a possível influência destes na estabilidade e resistência do grânulo. Hay et al. (2013) ressaltam a similaridade do alginato bacteriano com o alginato comercial produzido por algas, o qual é obtido a partir de reações envolvendo CaCl_2 . Todavia, Seviour et al. (2012) destacam a presença de um segundo polissacarídeo, conhecido como granulano (*granulan*), passivo de prover a estrutura e estabilidade do agregado. Tanto um quanto o outro possuem a habilidade de formação de géis estruturais, sendo considerados benéficos e essenciais para a formação de grânulos estáveis e resistentes. O ALE é um biopolímero secretado por microrganismos a partir das condições e estresse causado no meio (DING et al., 2015). Ele apresenta características semelhantes ao alginato comercial, em termos de estrutura química e habilidade de formação de hidrogel (SAM; DULEKGURGEN, 2016). Estudos envolvendo a recuperação desse recurso ocorrem de forma extensiva, de modo a viabilizar a sua obtenção por meios alternativos ao convencional, por exemplo, através dos grânulos aeróbios desenvolvidos pela tecnologia LGA (FENG et al., 2021; SEVIOUR et al., 2019; VAN DER HOEK et al., 2016).

Estudos quantificando o rendimento de EPS e ALE no lodo granular aeróbio indicaram que estes se encontravam mais disponíveis em momentos onde a alimentação do sistema consistia em um efluente de fácil assimilação pelos microrganismos, por exemplo, quando utilizado acetato como base (SCHAMBECK et al., 2020b). Os rendimentos de EPS e ALE relatados compunham pelo menos 50 e 20% da biomassa, respectivamente (SCHAMBECK et al., 2020b; DALL AGNOL et al., 2020)

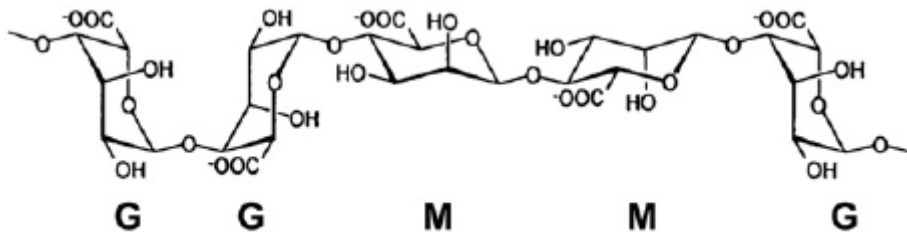
A extração comercial de ALE originado de estações de tratamento de efluentes (ETE) com uso de LGA já ocorre em fase de testes na cidade de Apeldoorn na Holanda, indicando o interesse para com o reaproveitamento do material. O financiamento dessas pesquisas ocorre por meio de um programa nacional holandês para recuperação desses biopolímeros a partir da participação de órgãos públicos, empresas privadas e instituições de ensino (KEHREIN et al., 2020; PFAFF et al., 2021; VAN DER ROEST et al., 2015). Todavia ainda existem lacunas a serem preenchidas, como processos de biossíntese, produção e recuperação, para a efetiva comercialização do produto (LIN et al., 2020).

2.7 ALGINATO

Alginato refere-se ao grupo de polissacarídeos extraídos de algas marinhas marrons, ou produzido por microrganismos específicos. Sua estrutura é formada por monômeros do ácido algínico, assim demonstrado na Figura 5 (ácido D-manurônico e ácido L- gulurônico). O alginato comercial, exclusivamente obtido das algas marrons, é desenvolvido a partir de uma série de processos, os quais permitem o refino e a obtenção de alginato de cálcio ou de sódio (APÊNDICE A). Ele é utilizado em vários setores do cotidiano, dentre eles destacam-se a sua presença em curativos, excipientes de medicamentos, moldes bucais e espessantes (DRAGET; TAYLOR, 2011). As propriedades gelificantes, estabilizantes e de viscosidade do polímero constituem as funções requeridas para as atividades mais importantes de aplicação

do material. A transição entre sólido/gel na presença de cátions multivalentes, praticamente independente da temperatura, é uma das características com maior destaque. Podem ocorrer variações nas proporções dos monômeros constituintes, a partir da ligação seletiva para cátions multivalentes, como por exemplo, na presença de íons de cálcio ou magnésio. Estudos ainda indicam que a estrutura e a força de ligação entre as moléculas variam dependendo do cátion presente na reação (HAY et al., 2013; LIU et al., 2010; SHENG et al., 2010).

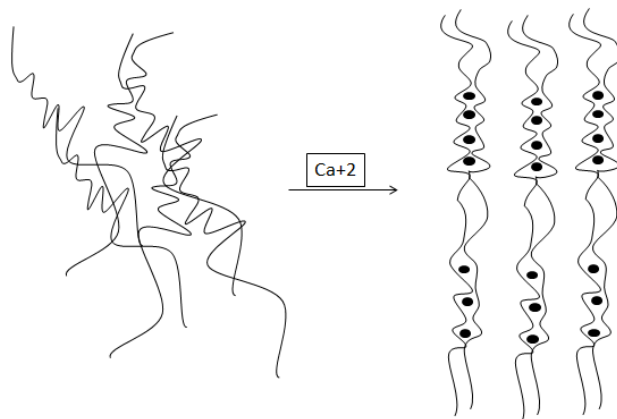
Figura 5: Representação dos monômeros do ácido alginico: (a) ácido D-manurônico, (b) ácido L-gulurônico.



Fonte: Adaptado de Draget e Taylor (2011)

A formação e identificação das propriedades gelificantes do alginato ocorrem através de reações com íons divalentes, como Ca^{+2} e Sr^{+2} , por meio da troca iônica de íons presentes no ácido gulurônico pelos cátions divalentes disponíveis, formando uma estrutura tipo ‘caixa de ovo’ (egg-box model), conforme a Figura 6 (SIMPSON et al., 2004).

Figura 6: Estrutura tipo “caixa de ovo” (egg-box model).



Fonte: Autor, 2020.

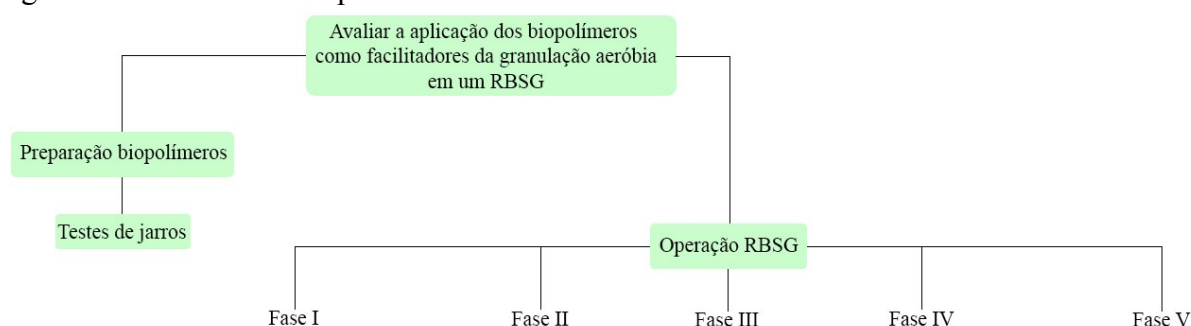
Diversos estudos demonstram que a estrutura química, a cinética da formação de gel e o cátion utilizado influenciam de forma significativa nas propriedades do composto formado, tais como: porosidade, estabilidade, biodegradabilidade e resistência do gel (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

3. METODOLOGIA

Para atingir os objetivos da pesquisa, a aplicação de biopolímeros (alginato de sódio e EPS) foi estudada em um RBSG, em escala piloto, tratando esgoto sanitário real. A agregação da biomassa e suas características foram avaliadas, bem como a eficiência de tratamento do esgoto efetuado pelo reator, de modo a atender os padrões de lançamento definidos pelas legislações em vigor. A Figura 7 apresenta de forma esquemática o delineamento experimental executado, o qual compreendeu:

- Testes de jarros para determinação da dosagem ótima de EPS a ser aplicada em cada condição operacional estudada.
- Adição dos biopolímeros alginato de sódio (Fase I) e EPS (Fase II) no RBSG e estudo de seus efeitos na granulação em períodos de aproximadamente 100 dias.
- Avaliação da biomassa granular desenvolvida durante curtos períodos (45 dias), para diferentes concentrações de biomassa e metodologias de aplicação de EPS (Fases III, IV e V).

Figura 7: Delineamento experimental executado.



Fonte: Autor, 2021.

As dosagens ótimas de aplicação do EPS foram determinadas nos testes de jarros e comparadas ao jarro controle. Para as Fases II, III e IV, o EPS foi utilizado em pH ácido, sendo denominada de EPS_{ácido}. Na Fase V, o EPS utilizado foi combinado com íons de cálcio e denominado EPS_{mix}.

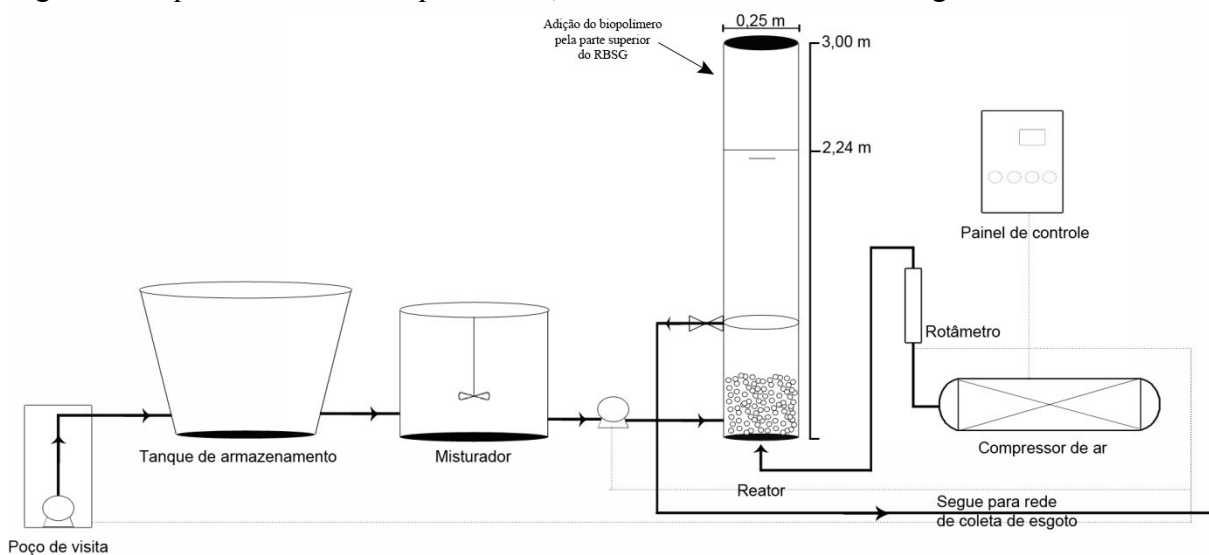
3.1 SISTEMA OPERACIONAL

O sistema operacional era formado por uma unidade de captação de esgoto bruto; tanque de armazenamento; tanque intermediário com misturador; bomba de alimentação do reator; reator em bateladas sequenciais com lodo granular (RBSG) em escala piloto; painel de comandos elétricos; compressores de ar; rotâmetro para medição da vazão de ar; e válvula solenoide para descarte do efluente (Figura 8).

O controle do sistema foi realizado a partir de um controlador lógico programável (CLP Siemens), localizado no painel de controle, em conjunto com a operação dos registros quando necessário. O esgoto sanitário utilizado era proveniente da rede coletora de esgoto da CASAN, a qual atende o bairro Pantanal – Florianópolis/SC.

O RBSG foi construído em acrílico transparente em forma cilíndrica, com 3 m de altura e 0,25 m de diâmetro interno (Figura 8). A altura útil utilizada para o tratamento foi de 2,24 m, resultando num volume útil de 110 L. A configuração física do reator proporciona a troca volumétrica de 65% (V enchimento/ V reator), totalizando em 72 L de esgoto tratado para cada ciclo. O processo de aeração foi realizado por dois compressores (Wayne Wetzel profissional – WV 15, 230L, 3hp e Shulz®, modelo CSL – 20/200), o ar fornecido atravessava um difusor circular de membrana (EPDM HD 340mm – rosqueável 3/4”), produzindo bolhas finas, localizado na parte inferior do reator.

Figura 8: Esquema do sistema operacional, com detalhes do reator biológico.



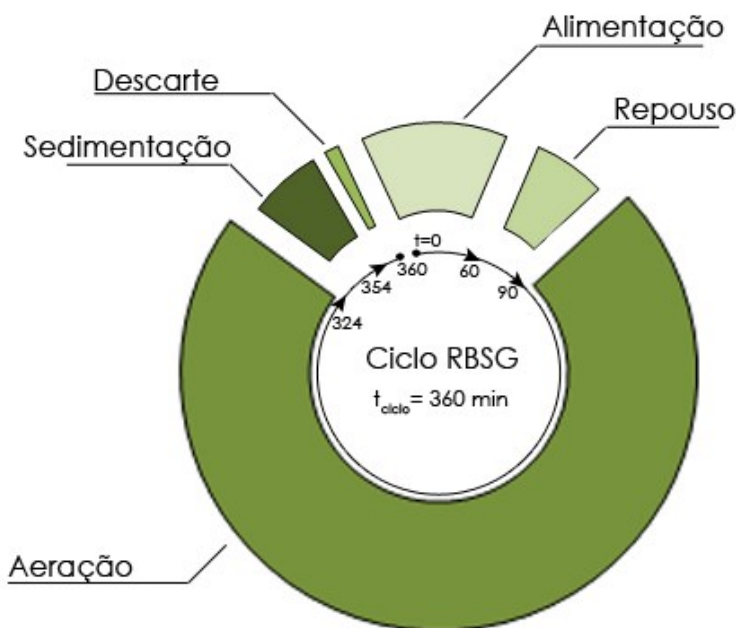
Fonte: Autor, 2020.

3.2 FUNCIONAMENTO DO REATOR

A Fase I correspondeu à aplicação do alginato de sódio, tendo duração de 114 dias, desde Agosto até Dezembro/2019. A Fase II correspondeu à aplicação de EPS com duração de 100 dias, de Março até Junho/2020. Ambas as fases iniciaram a partir da inoculação do RBSG com biomassa retirada de um RBS, escala real, funcionando com lodos ativados e tratando esgoto sanitário. Foi utilizada uma proporção de 20% de inóculo em relação ao volume útil do reator, resultando em aproximadamente 25 L. Na sequência, com o objetivo de refinar o conhecimento acerca do comportamento do EPS como agente agregador da biomassa, realizaram-se as Fases III, IV e V, as quais ocorreram a partir de Julho/2020 até Março/2021, cada uma com duração de 45 dias. Durante a Fase III, o reator foi inoculado com concentração de biomassa de 1 g L^{-1} . Nas Fases IV e V a concentração da biomassa inicial foi de 3 g L^{-1} , porém com modificações realizadas nas características do biopolímero, que foi misturado com íons de cálcio na Fase V (Item 3.5.2).

O ciclo operacional do reator consistiu em um período total de 6 horas (360 min), dividido em 5 etapas (Figura 9). O enchimento ocorria durante os primeiros 60 min, seguido de fase de repouso de 30 min, período de aeração por 234 min e sedimentação da biomassa com duração de 30 min, finalizando com o descarte durante os 6 min restantes.

Figura 9: Representação esquemática das etapas do ciclo operacional do RBSG.



Fonte: Autor, 2020.

3.3 MONITORAMENTO DO REATOR E DA BIOMASSA

O reator foi monitorado por meio de análises físico-químicas e biológicas, cujos métodos e frequência encontram-se dispostos na Tabela 2.

Tabela 2: Análises físico-químicas e biológicas para monitoramento do reator.

Análises	Métodos	Frequência
Oxigênio dissolvido (OD), pH e temperatura (°C)	Eletroquímico com sonda multiparâmetros - YSI Pro 1020	2 x por semana
Nitrogênio Amoniacal (NH ₄ ⁺ - N)	Sistema automático de titulação e destilação. VELP - UDK 159 *SM4500B	1 x por semana
Nitrito (NO ₂ ⁻ - N) Nitrato (NO ₃ ⁻ - N) Fosfato (PO ₄ ³⁻ - P)	Cromatografia iônica DIONEX ICS- 5000- Thermo Scientific	1 x por semana

	*SM4110C	
Demanda Química de Oxigênio (DQO_T e DQO_S)	Colorimétrico de refluxo fechado. Espectrofotômetro HACH® DR 4000 *SM 5220D	1 x por semana
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅)	Manométrico com incubação de 5 dias a 20°C – HACH®, BOD TRACK *SM 5210D	1 x por semana
Sólidos Suspensos Totais (SST), Voláteis (SSV) e Fixos (SSF)	Gravimétrico *SM 2540	1 x por semana
Fósforo Total (PT)	Molybdo-vanadato *SM4500P C	1 x por semana

*SM = Standard Methods

Fonte: Autor, 2021.

A biomassa foi monitorada utilizando métodos quantitativos e qualitativos, descritos a seguir:

Granulometria

O acompanhamento dos tamanhos dos grânulos foi feito semanalmente por meio de análises granulométricas com peneiras de diversas malhas (LAGUNA, 1999), utilizando uma amostra de licor misto diluído, de modo a evitar a colmatção das peneiras. Para tal, 200 mL da amostra coletada ao final da aeração eram diluídos em 800 mL de água, para posterior peneiramento através de cinco peneiras (100, 212, 300, 400 e 600 µm) de aço inoxidável, acondicionadas sobre um recipiente para coletar partículas menores que 100 µm. As peneiras eram dispostas em ordem decrescente de abertura da malha, para posterior retirada da biomassa através de retro lavagem; em seguida, as amostras eram filtradas em membrana de acetato de celulose (0,45µm) e colocadas em estufa a 105 °C por 24 h.

Coefficiente de integridade

A metodologia utilizada para a determinação da resistência dos grânulos aeróbios, ou coeficiente de integridade (S), consistiu na quantificação da fração de biomassa granular desagregada e dispersa no meio depois de aplicada uma condição de estresse sobre a amostra, correspondendo na estabilidade do grânulo aeróbio durante a operação do reator, de modo que quanto maior a estabilidade do agregado, menor será o coeficiente de integridade correspondente (NOR-ANUAR et al., 2012). O estresse sobre as amostras foi realizado indiretamente a partir de uma agitação mecânica de 200 RPM de intensidade durante 5 minutos. O cálculo do S foi efetuado utilizando-se a equação (1).

$$S = \left(\frac{X - X'}{X} \right) \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

S: Coeficiente de integridade (S)

X: Concentração de sólidos suspensos totais (g SST L⁻¹)

X': Concentração de sólidos desprendidos após agitação (g SST L⁻¹)

Para a realização da análise, uma amostra de 1 L de licor misto foi submetida a um peneiramento em malha de 212 µm, com o objetivo de reter os agregados considerados grânulos. Após isso, os sólidos retidos na malha eram transferidos para um recipiente de volume conhecido (400 mL). Essa solução era dividida em 4 frações iguais de 100 mL, onde uma era utilizada para a determinação da concentração de SST da amostra, e o restante para a determinação da estabilidade dos grânulos. As amostras após agitação eram transferidas, cada uma, para um frasco do tipo Erlenmeyer na proporção de uma parte de amostra (100 mL) para duas partes de água da torneira (200 mL). Essa proporção foi adotada de modo a corresponder à troca volumétrica utilizada no RBS em estudo (65% de troca volumétrica). As triplicatas do ensaio foram submetidas a 5 minutos de agitação intensa (200 RPM) e peneiradas novamente em malha de 212 µm. A concentração de SST era determinada para a parte que atravessou a malha da peneira e calculado o coeficiente de integridade a partir da equação 1.

Densidade

A densidade da biomassa granular foi determinada utilizando o corante *dextran blue* conforme descrito por Beun et al. (2002). Inicialmente pesava-se uma proveta seca de 100 mL (P1), seguido de uma nova pesagem do mesmo volume preenchido com uma amostra de licor misto (P2). Após isto, a amostra era sedimentada durante 10 minutos, descartado o sobrenadante e pesado novamente (P3). Por fim, na mesma proveta utilizada anteriormente, adicionava-se a solução de *dextran blue* (1g L⁻¹) em proporção volumétrica de 1:1, sobre a amostra de lodo sedimentado para realização de uma nova pesagem (P4). Essa amostra de lodo sedimentado e *dextran blue* era agitada e sedimentada por 10 minutos. Uma alíquota do sobrenadante (fração *dextran blue*) era coletada para leitura em espectrofotômetro em λ 620 nm, utilizando cubetas de quartzo. Além disso, uma amostra sem adição de reagente (branco) e uma amostra de *dextran blue* (padrão) também eram lidas no mesmo comprimento de onda. O cálculo para a determinação da densidade da amostra foi realizado por meio da Equação (2).

$$Densidade (g L^{-1}) = \frac{V_{inicial} \times SSV}{V_{biomassa}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

SSV: Sólidos Suspensos Voláteis (g L⁻¹)

V_{inicial}: P₂ - P₁

V_{biomassa}: P₄ - P₁ - V_L

P₁: Peso do recipiente de teste (proveta seca)

P₂: Peso do recipiente de teste com amostra

P₃: Peso do recipiente de teste sem sobrenadante;

P₄: Peso do recipiente de teste após adição de *dextran blue*

A variável V_L é calculada a partir da Equação (3):

$$V_L = \frac{A_{inicial} \times V_{dextran}}{A_{final}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$A_{inicial}$: Absorbância da solução padrão *dextran blue* (1g L⁻¹)

A_{final} : Absorbância da amostra

$V_{dextran}$: Corresponde a diferença entre o P₄ e P₃

Índice Volumétrico de Lodo (IVL) e velocidade de sedimentação

O índice volumétrico de lodo foi determinado usando metodologia proposta por APHA (2005) (Standard Methods - SM 2710 D), porém feito para diferentes tempos de sedimentação, seguindo a recomendação de Schwarzenbeck et al. (2005), usando uma proveta graduada de 1L, nos tempos de 5, 10 e 30 min, e calculado conforme Equação (4).

$$IVL_{5,30} = \frac{H_{5,10,30} \times 10^6}{H_0 \times SST} \quad \text{Equação 4}$$

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);

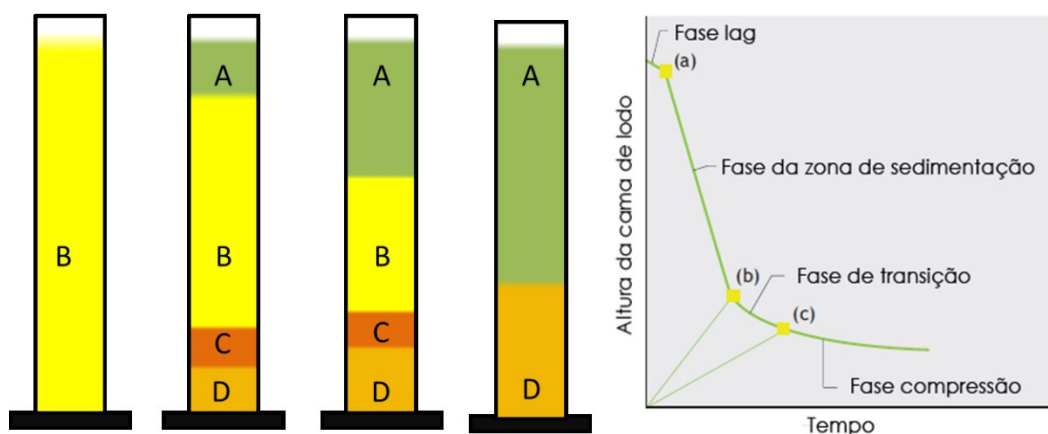
10⁶ = Fator de conversão de miligrama para grama e de litro para mililitro.

A determinação do IVL gera informações generalizadas e momentâneas sobre a sedimentação da biomassa. A real determinação do volume de lodo após 30 minutos de sedimentação depende do comportamento de sedimentação intrínseca e de compressão da biomassa. Esses dois fatores por sua vez são influenciados por diversos fatores como a composição do lodo, tamanho do floco, propriedades da superfície do agregado, reologia, etc. Conseqüentemente, duas amostras de lodo sedimentado podem demonstrar resultados similares para os parâmetros de sedimentação da biomassa, mesmo com comportamentos de sedimentação divergentes (BRDJANOVIC et al. 2016).

Para determinação da velocidade de sedimentação intrínseca das partículas, deve-se construir uma curva de sedimentação, usando-se um reservatório cilíndrico de no mínimo 50 mL, um cronômetro e uma amostra de licor misto, com concentração de SST conhecida. Para o experimento em questão, uma amostra homogeneizada de licor misto era adicionada em

uma proveta graduada de 1000 mL e a altura da cama de lodo era medida ao longo do tempo (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 30; 45; 60 min). Durante o início do ensaio, a biomassa apresenta comportamento de sedimentação mais proeminente, de modo que sejam necessárias medições mais frequentes, contudo, com o passar do tempo esse comportamento se torna mais desacelerado, proporcionando um maior espaçamento entre medições. Durante o ensaio de sedimentação quatro fases podem ser observadas, onde cada uma delas marca a mudança no comportamento de sedimentação da interface suspensão-líquido (Figura 10). A determinação da velocidade de sedimentação é aquela correspondente à maior inclinação entre três pontos consecutivos (BRDJANOVIC et al. 2016).

Figura 10: Processo cronológico do teste de sedimentação separado por quatro fases. Onde 'A' corresponde ao sobrenadante, 'B' zona de sedimentação, 'C' zona de transição e 'D' zona de compressão.



Fonte: Adaptado de Ekama et al. (1997) e Bradjanovic et al. (2016)

FTIR-ATR

A realização da análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) ocorreu, primeiramente, por meio da preparação das amostras, condicionando-as em estufa por 105°C, por aproximadamente 1 hora, e posteriormente armazenadas em dessecador até a realização das leituras. Estas foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. As medidas foram realizadas com um espectrômetro FTIR (Agilent, modelo Carry 660), com um acessório de refletância total atenuada horizontal (ZnSe), com uma média de 20 varreduras no intervalo 4000 - 650cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹.

Extração e caracterização do EPS

A extração de EPS seguiu protocolo adaptado da metodologia proposta por Feltz et al. (2016), que consiste na solubilização do lodo em condições alcalinas (pH ≥ 9), alta temperatura (80°C) e agitação. Primeiramente, o licor misto coletado no final da fase de aeração era centrifugado a 4000 g por 30 minutos. O lodo sedimentado era então transferido para um frasco do tipo Erlenmeyer contendo 50 mL de água deionizada para cada 3 g de lodo centrifugado. A biomassa ficava para banho maria mantido a 80°C, sob constante agitação

(400 rpm), por 45 minutos. Por fim, a solução era centrifugada a 4000 g por 30 minutos. O sobrenadante disponível corresponde ao EPS solubilizado.

As frações de polissacarídeos (PS) e proteínas (PN) no EPS durante as Fases I e II foram determinadas utilizando o método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e folin-fenol (LOWRY et al., 1951). Nas Fases III, IV e V foram adotadas metodologias modificadas para medição de polissacarídeos e proteínas. A seleção do método modificado da antrona (RONDEL et al., 2013) para determinação de açúcares neutros e urônicos é mais adequada uma vez que esta utiliza uma leitura de absorvância dupla (560 nm e 620 nm). A utilização de somente um comprimento de onda pode ocasionar na sub ou superestimação desses compostos para amostras biológicas devido às interferências entre elas (RONDEL et al., 2013).

Para PN foi adotado o método de Lowry modificado (FROLUND et al., 1995), que permite determinar a concentração de proteínas considerando a interferência das substâncias húmicas. Foi verificada a importância dessas substâncias na matriz do EPS secretado no processo de ligação iônica entre partículas em conjunto com as proteínas (FELZ et al., 2020). Logo, torna-se interessante e recomendável a quantificação dos dois compostos, de modo a auxiliar a compreensão acerca da estabilidade do sistema LGA. O método utiliza albumina de soro bovino (BSA), ácidos húmicos e sal sódico, como padrões (0 a 1000 mg L⁻¹). Nesta análise, 1 mL de amostra era misturado com 5 mL de reagente A ou B, os diferenciando pela presença de CuSO₄ na sua composição. Na sequência, após 10 min de incubação em temperatura ambiente, 0,5 mL de Folin-Ciocalteu (1N) era adicionado. Essa solução era então misturada e deixada em repouso em temperatura ambiente e em ausência de luz durante 30 min, até a leitura da absorvância em comprimento de curva único, 720 nm. A concentração tanto de proteínas quanto de substâncias húmicas foram quantificadas a partir das Equações 5, 6 e 7.

$$A_{total} = A_{proteina} + A_{humico} \quad \text{Equação 5}$$

$$A_{proteina} = 1.25 (A_{total} - A_{tampão}) \quad \text{Equação 6}$$

$$A_{humico} = A_{tampão} - 0.2A_{proteina} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

A_{total} = absorvância medida na amostra contendo reagente com CuSO₄

$A_{tampão}$ = absorvância medida na amostra contendo reagente sem CuSO₄

$A_{proteina}$ = Absorvância resultante referente às proteínas

$A_{húmico}$ = Absorvância resultante referente às substâncias húmicas

Após a obtenção das absorvâncias respectivas às proteínas e substâncias húmicas, os resultados eram convertidos em mg de BSA ou mg ácidos húmicos por g de SSV a partir das curvas de calibração.

Os PS foram determinados utilizando uma adaptação do método clássico da antrona desenvolvido por Rondel et al. (2013), o qual permite quantificar as frações de açúcares

neutros e urônicos em um único experimento. Esse método consiste na leitura em dois comprimentos de onda diferentes (560 nm e 620 nm) após hidrólise ácida e a reação de monômeros osídicos com o reagente da antrona. Glicose e ácido gulurônico (0 a 200 mg L⁻¹ e 0 a 500 mg L⁻¹, respectivamente) foram utilizados como padrões para essa análise. As medições foram feitas em triplicatas e os resultados desses parâmetros foram expressos em função da concentração de sólidos voláteis durante o momento de coleta das amostras. O experimento ocorreu a partir da mistura de 2 mL da amostra com 4 mL do reagente antrona (2g L⁻¹, dissolvido em H₂SO₄ 98%), mantendo a relação 1:2 entre amostra e reagente. Os tubos utilizados eram cobertos com papel alumínio antes da adição do reagente, de modo a assegurar a ausência de luz durante a reação e a melhor condução do calor para o frasco, e colocados em um banho-maria (100°C) durante 15 min. A amostra era resfriada antes da leitura nos dois comprimentos de onda sugeridos, 560 nm e 620 nm. A quantificação dos açúcares urônicos e neutros foi determinada usando as Equações 8 e 9.

$$[Glc] = \frac{(A_{560} \times b_{620} - A_{620} \times b_{560})}{(a_{560} \times b_{620} - a_{620} \times b_{560})} \quad \text{Equação 8}$$

$$[Gla] = \frac{(A_{560} \times a_{620} - A_{620} \times a_{560})}{(a_{620} \times b_{560} - a_{560} \times b_{620})} \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

[Glc] = concentração de açúcares neutros expresso em mg de glicose equivalente

[Gla] = concentração de açúcares urônicos expresso em mg de ácido glucurônico equivalente

A_i = absorvância da amostra no comprimento de onda i (560 nm ou 620 nm);

a_i = coeficiente angular da curva de calibração do padrão glicose no comprimento de onda i;

b_i = coeficiente angular da curva de calibração do padrão ácido glucurônico no comprimento de onda i.

Os resultados obtidos pelas equações 8 e 9 eram então convertidos para mg do padrão utilizado por g de SSV.

Microscopia

A biomassa foi avaliada qualitativamente via microscopia, realizada semanalmente utilizando o microscópio óptico (OLYMPUS modelo BX-41), de modo a identificar a comunidade microbiológica e a morfologia do lodo granular. A estrutura dos grânulos também foi observada no microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM-6390LV), juntamente com a análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), medidas que foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para a realização dessas leituras, primeiramente as amostras eram lavadas com glutaraldeído (2,5%) e deixadas em refrigeração por 2 horas. Após esse procedimento, as amostras eram lavadas novamente com álcool etílico a 50, 70 e 100%, e mantidas em solução de álcool a 100% até a

realização da análise. Para a obtenção das micrografias, as amostras foram fixadas em suportes de alumínio (*stubs*) com cola de prata e posteriormente metalizadas com ouro.

DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado por meio da extração do DNA genômico, usando Kit de extração DNA MoBio Power Soil TM (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), conforme protocolo do fabricante. As amostras tratadas foram encaminhadas a um laboratório credenciado, para realizar a taxonomia e a quantificação dos microrganismos. O laboratório utiliza a tecnologia IlluminaMiSeq® de sequenciamento por síntese (*sequencing by synthesis* - SBS). O sistema garante a leitura de 100.000 sequências por amostra com a identificação taxonômica e a quantificação do número de sequências obtidas de cada táxon. Os resultados foram fornecidos já com a interpretação do software do sistema.

3.4 DETERMINAÇÃO DA DOSAGEM DOS BIOPOLÍMEROS EM TESTES DE JARROS

A dosagem de alginato de sódio usada no reator (Fase I) foi a mesma determinada nos estudos de Domingos (2019). Para melhorar a eficiência do aditivo, a autora testou também a adição de íons de cálcio (DEVIRIMCI; YUKSEL; SANIN, 2012).

Para o EPS, os testes de jarros foram realizados com um equipamento micro controlado (Milan 2036), contendo 6 jarros de aproximadamente 2 L cada, sendo utilizado 1 L de amostra em cada jarro. As amostras, durante as Fases I e II, eram compostas por 20% de lodo biológico proveniente de sistema de lodos ativados e 80% de esgoto sanitário. Nas Fases III, IV e V foram adotadas as mesmas concentrações da biomassa do inóculo de 1 g L⁻¹ (Fase III) e 3 g L⁻¹ (Fases IV e V), para cada 1 L de esgoto sanitário do jarro. Em todos os experimentos realizados, um dos jarros correspondeu ao controle, onde não houve adição de EPS. Os parâmetros utilizados para a tomada de decisão foram série de sólidos, IVL_{5,10,30}, turbidez, pH e temperatura. A avaliação da turbidez foi necessária, uma vez que o EPS extraído consistia de uma mistura turva, podendo assim contribuir na concentração de particulados presentes no clarificado. O monitoramento da concentração de sólidos serviu tanto para avaliar a intensidade da adesão entre a biomassa e o biopolímero, quanto para determinação do IVL. A sedimentação da biomassa foi medida por meio dos resultados obtidos para IVL_{5,10,30}. Por fim, o pH e a temperatura foram monitorados uma vez que estes parâmetros contribuem significativamente no processo físico-químico de adesão entre as partículas.

Os testes iniciavam com mistura da amostra e aditivo por uma agitação intensa (120 rpm) durante 15 segundos, com a finalidade de dispersar completamente o aditivo e promover a coagulação, seguida de uma agitação moderada (40 rpm) durante 15 min, para iniciar a floculação, finalizando com a sedimentação das partículas durante 30 minutos (DEVIRIMCI; YUKSEL; SANIN, 2012).

Foram testadas diferentes concentrações (50 mg L⁻¹ a 250 mg L⁻¹) e pH (2 a 6) para o aditivo, em conjunto com a adoção das condições operacionais de 'start-up' do reator. Foram utilizados os resultados obtidos com floculante microbiano (LIANG et al., 2019), alginato

(DOMINGOS et al., 2019), esferas de Ca-alginato (SUN et al., 2017) e goma xantana (LIU et al., 2017) como ponto de partida para a concentração de EPS. A variação do pH do EPS, nos testes, foi necessária principalmente devido às suas características de transição de estado, onde em pH inferior a 8,8 o biopolímero tem uma estrutura do tipo gel, com seu estado ideal sendo encontrado para pH entre 2 e 4 (SEVIOUR et al., 2009).

3.5 APLICAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS NO RBSG

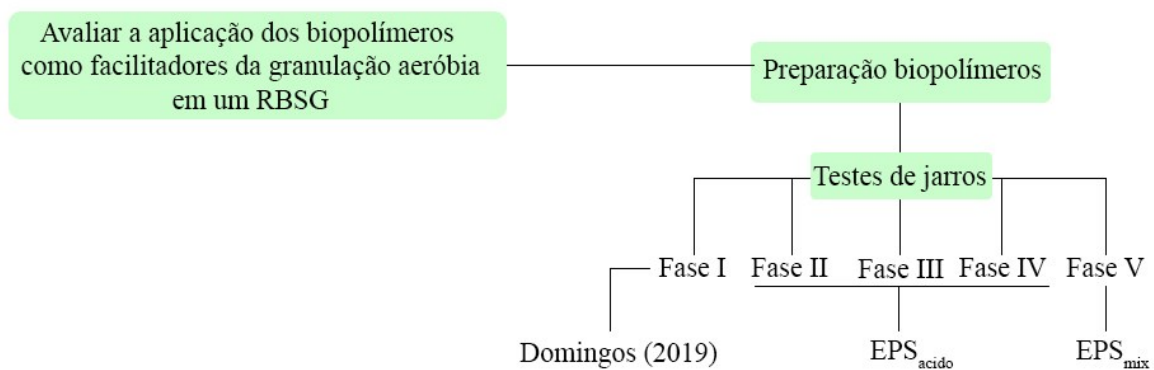
Os biopolímeros foram aplicados durante a Fase I (alginato de sódio) e Fases II, III e IV (EPS) de forma intermitente, em três adições durante o período de ‘start-up’ após inoculação da biomassa no reator, correspondendo à primeira semana. Na Fase V, antes da inoculação do reator, o biopolímero (EPS) foi misturado ao lodo de inóculo através de agitação constante (40 rpm durante 15 min), usando o equipamento de teste de jarros. Os biopolímeros também foram adicionados, diretamente no reator, nos momentos em que houve desintegração e desestabilização do LGA, de forma a avaliar sua atuação como agente acelerador da granulação e recuperação sistema.

Durante o período de ‘start-up’ do reator foram realizadas análises de pH, temperatura, sólidos e turbidez da biomassa em dias intercalados à adição dos biopolímeros (2º, 4º e 6º dia), para amostras de licor misto coletadas ao fim da fase de aeração.

4. RESULTADOS

Para melhor compreensão dos resultados, estes estão apresentados em três itens, onde o primeiro reporta as dosagens de aplicação do EPS obtidos nos testes de jarros (Figura 11); e os demais correspondem às Fases I a V, nas quais, o lodo utilizado como inóculo apresentava péssimas condições de sedimentabilidade ($IVL_{30} > 300 \text{ mL g}^{-1}$) (SPERLING; CHERNICHARO, 2005).

Figura 11: Delineamento metodológico adotado para os testes de jarros.



Fonte: Autor, 2021.

4.1 DOSAGENS DE APLICAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

Para o alginato de sódio, a concentração de 400 mg L^{-1} usada na Fase I, em conjunto com 250 mg L^{-1} de íons de cálcio em pH 6,49, demonstrou o melhor potencial de agregação e sedimentação das partículas, seguindo os resultados apresentados em Domingos (2019),.

As dosagens ótimas de aplicação do EPS foram determinadas nos testes de jarros e comparadas ao jarro controle. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos ensaios realizados para determinar a dosagem de aplicação do EPS para as Fases II, III e IV.

Na Fase II foi considerada a variação da concentração de EPS e o pH de aplicação, para a porção de biomassa de 20% do volume total usado em cada jarro (1 L). A concentração ótima resultante foi de 50 mg EPS L^{-1} em $\text{pH } 2 \pm 0,2$.

Os ensaios de teste de jarros para as Fases III e IV consideraram somente a variação da concentração do EPS (50 a 250 mg L^{-1}) em jarros onde a porção correspondente à biomassa era mantida em 1 g L^{-1} e 3 g L^{-1} , respectivamente. Como resultado, determinou-se para as Fases III e IV os valores de 50 mg EPS L^{-1} e $250 \text{ mg EPS L}^{-1}$, em $\text{pH } 2 \pm 0,2$, respectivamente. Os resultados obtidos para as Fases II, III e IV (Tabela 3) foram utilizados como referência para os ensaios referentes à Fase V.

Tabela 3: Resultados dos testes de jarros para determinar a dosagem de aplicação do EPS.

Fase II – Variação do pH do EPS									
Jarro	pH - Mistura	[EPS] (mg L ⁻¹)	pH - EPS	SST (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	Temperatura (°C)	IVL 5 (mL g ⁻¹)	IVL 10 (mL g ⁻¹)	IVL 30 (mL g ⁻¹)
1	7.25	-	-	1025	59	21.3	-	-	-
2	6.07	50	2	2385	67	21	83.85	71.27	29.35
3	6,1	50	3	3355	62	20.3	89.41	56.63	50.67
4	6.2	50	4	3835	51	21.3	91.26	70.40	49.54
5	6.32	50	5	4245	49	21.1	101.29	77.73	54.18
6	6.35	50	6	3605	57	21	108.18	85.99	61.02
Fase II – Variação da concentração de EPS									
Jarro	pH - Mistura	[EPS] (mg L ⁻¹)	pH - EPS	SST (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	Temperatura (°C)	IVL 5 (mL g ⁻¹)	IVL 10 (mL g ⁻¹)	IVL 30 (mL g ⁻¹)
1	6.85	-	-	3725	39	21.5	110.06	85.90	64.42
2	6.33	50	2	3380	89	21.2	97.63	73.96	56.21
3	5.98	100	2	3780	123	21.2	105.82	76.71	55.55
4	5.63	150	2	3815	108	21.2	123.19	81.25	60.28
5	5.41	200	2	3215	107	20.9	264.38	102.64	77.76
6	5.13	250	2	4290	84	20.6	221.44	107.22	76.92
Fase III – Variação da concentração de EPS em 1 g L⁻¹ de biomassa									
Jarro	[EPS] (mg L ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	IVL 5 (ml g ⁻¹)	IVL 10 (ml g ⁻¹)	IVL 30 (ml g ⁻¹)	Vel. Sedimentação (m h ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)
1	0	6,96	26,1	326,59	256,61	205,29	5,7	1071,67	1,97
2	50	5,88	26,1	353,80	276,25	203,55	10,3	1031,67	5,7
3	100	4,28	26,1	484,85	323,23	222,22	6,4	990,00	4,4
4	150	3,59	26,1	507,99	325,88	210,86	5,5	1043,33	3,1
5	200	3,33	26,1	437,96	315,33	201,46	5,5	1141,67	3,6
6	250	3,24	26,1	455,93	332,83	227,96	6	1096,67	4,1
Fase IV – Variação da concentração de EPS em 3 g L⁻¹ de biomassa									
Jarro	[EPS]	pH	Temperatura (°C)	IVL 5 (ml g ⁻¹)	IVL 10 (ml g ⁻¹)	IVL 30 (ml g ⁻¹)	Vel. Sedimentação (m h ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)
1	0	7,4	26,2	308,53	295,40	233,04	3,9	3046,67	1,83
2	50	6,49	26,2	309,90	300,16	253,11	3,1	3081,67	4,9
3	100	5,67	26,2	312,26	308,99	269,75	2,9	3058,33	-
4	150	4,59	26,2	314,10	309,29	283,65	2,4	3120,00	-
5	200	3,93	26,2	322,49	315,88	271,22	3,7	3023,33	-
6	250	3,71	26,2	312,97	303,24	212,43	5,8	3083,33	3,4

Fonte: Autor, 2021.

A Tabela 4 apresenta os ensaios realizados para a Fase V, com coletas de amostras em triplicatas além da porção do jarro correspondente à biomassa mantida em 3g L⁻¹. Foram

realizadas variações na concentração do EPS e íons de cálcio, além do pH, de modo a determinar a melhor concentração de EPS, íons de cálcio e pH da mistura.

Tabela 4: Ensaios realizados para determinar a dosagem de aplicação para a Fase V.

Fase V - EPS (50mg/L) + Ca (100mg/L) + Variação pH EPS											
Jarro	[EPS] (mg/L)	[Ca] (mg/L)	pH mistura (EPS + Ca)	pH Jarro	Temperatura (°C)	Turbidez (NTU)	IVL 5 (ml g ⁻¹)	IVL 10 (ml g ⁻¹)	IVL 30 (ml g ⁻¹)	VS (m h ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)
1	-	-	-	7,26	24,6	3,1	248,68	238,10	164,02	0,28	3780
2	-	100	-	7,2	24,6	3,1	219,54	210,20	156,48	0,26	4281,6
3	50	100	2	6,85	25,1	4,6	250,22	250,22	207,17	0,16	3716,6
4	50	100	4	7,06	25,3	4,9	245,48	237,73	204,13	0,2	3870
5	50	100	6	7,13	25,3	5,3	236,02	228,57	198,76	0,26	4025
6	50	100	8	7,6	24,8	6,6	215,85	211,35	179,88	0,26	4447,5
Fase V - EPS (50mg/L + pH 8) + Variação concentração de Cálcio											
Jarro	[EPS] (mg/L)	[Ca] (mg/L)	pH mistura (EPS + Ca)	pH Jarro	Temperatura (°C)	Turbidez (NTU)	IVL 5 (ml g ⁻¹)	IVL 10 (ml g ⁻¹)	IVL 30 (ml g ⁻¹)	VS (m h ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)
1	50	-	8	7,34	21	15,7	277,38	271,69	244,67	0,09	3515
2	50	20	8	7,4	20,9	10,5	290,42	278,44	191,62	0,32	3340
3	50	40	8	7,47	21,1	11,7	280,06	269,79	217,01	0,188	3410
4	50	60	8	7,46	21,4	11,7	218,12	214,77	194,63	0,09	4470
5	50	80	8	7,48	21,4	10,7	259,31	255,32	234,04	0,09	3760
6	50	100	8	7,44	21,3	11,8	221,22	218,96	203,16	0,07	4430
Fase V - EPS (250mg/L) + Ca (100mg/L) + Variação pH EPS											
Jarro	[EPS] (mg/L)	[Ca] (mg/L)	pH mistura (EPS + Ca)	pH Jarro	Temperatura (°C)	Turbidez (NTU)	IVL 5 (ml g ⁻¹)	IVL 10 (ml g ⁻¹)	IVL 30 (ml g ⁻¹)	VS (m h ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)
1	-	-	-	7,34	21	15,7	214,08	202,82	164,51	0,17	4437,5
2	-	100	-	7,4	20,9	10,5	225,75	216,34	162,26	0,23	4252,5
3	250	100	2	7,47	21,1	11,7	242,35	239,85	152,40	0,36	4002,5
4	250	100	4	7,46	21,4	11,7	281,11	275,26	243,05	0,11	3415
5	250	100	6	7,48	21,4	10,7	308,19	298,56	263,24	0,11	3115
6	250	100	8	7,44	21,3	11,8	233,70	184,50	135,30	0,42	4065
Fase V - EPS (250mg/L + pH 8) + Variação concentração de Cálcio											
Jarro	[EPS] (mg/L)	[Ca] (mg/L)	pH mistura (EPS + Ca)	pH Jarro	Temperatura (°C)	Turbidez (NTU)	IVL 5 (ml g ⁻¹)	IVL 10 (ml g ⁻¹)	IVL 30 (ml g ⁻¹)	VS (m h ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)
1	250	-	8	7,31	22,3	61	242,12	185,74	132,67	0,83	3015
2	250	20	8	7,71	22,4	57	265,22	262,52	243,57	0,07	3695
3	250	40	8	7,71	22,4	56	317,51	304,42	232,41	0,22	3055
4	250	60	8	7,69	22,6	56	323,97	320,66	284,30	0,11	3025
5	250	80	8	7,75	22,5	53	275,91	273,11	259,10	0,05	3570
6	250	100	8	7,74	22,7	63	196,20	148,73	107,59	2,1	3160
Fase V - Ca (100mg/L) + EPS (pH = 8) + Variação concentração EPS											
Jarro	[EPS] (mg/L)	[Ca] (mg/L)	pH mistura (EPS + Ca)	pH Jarro	Temperatura (°C)	Turbidez (NTU)	IVL 5 (ml g ⁻¹)	IVL 10 (ml g ⁻¹)	IVL 30 (ml g ⁻¹)	VS (m h ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)
1	-	100	-	7,25	21,6	14,7	247,77	240,10	209,45	0,12	3915
2	50	100	8	7,53	21,8	10,7	292,97	287,00	260,09	0,09	3345
3	100	100	8	7,54	21,9	27	278,41	272,73	250,00	0,08	3520
4	150	100	8	7,61	22	38	257,98	255,32	231,38	0,09	3760
5	200	100	8	7,6	22	41	269,23	263,74	244,51	0,07	3640
6	250	100	8	7,66	22,1	51	244,67	238,39	205,77	0,13	3985

Fonte: Autor, 2021.

Para a Fase V, o primeiro teste considerou as concentrações de EPS obtidas para as Fases III e IV (50 e 250 mg L⁻¹), misturadas com 100 mg Ca L⁻¹, variando o pH entre 2 e 8. As duas concentrações demonstraram-se mais eficazes na aglomeração e sedimentação de partículas para o pH 8 ± 0,2.

No segundo teste foram aplicadas as concentrações de EPS obtidas para as Fases III e IV e o pH de 8 ± 0,2, variando-se os íons de cálcio da mistura (20 a 100 mg L⁻¹). Esse teste determinou que, para ambas as concentrações de EPS, os melhores resultados de aglomeração e sedimentabilidade entre partículas ocorreram com 100 mg Ca L⁻¹.

Por fim, o terceiro teste teve como objetivo identificar a melhor concentração de EPS para a mistura utilizando 100 mg Ca L⁻¹ em pH 8 ± 0,2. Foram avaliadas concentrações variando entre 50 e 250 mg EPS L⁻¹ na mistura. Os testes determinaram que o biopolímero (EPS_{mix}) com concentração de 250 mg EPS L⁻¹ e 100 mg Ca L⁻¹, em pH 8 ± 0,2, seria usado durante a fase V. A Tabela 5 apresenta uma síntese dos resultados obtidos nos testes de jarros para as dosagens adotadas e pH dos biopolímeros.

Tabela 5: Síntese das dosagens aplicadas de biopolímeros e íons de cálcio, e de pH em cada fase operacional.

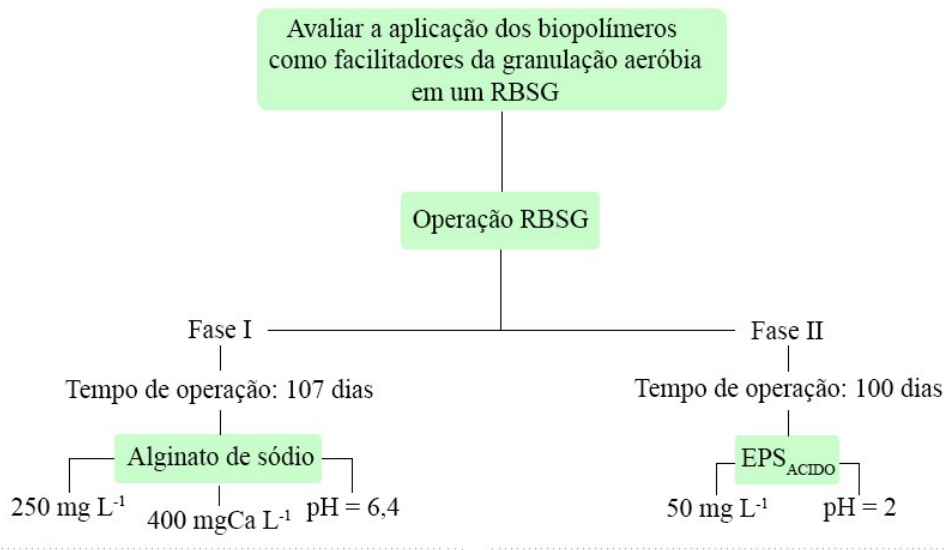
Biopolímero	Fase	Dosagem ótima mg L ⁻¹	Íons de cálcio mg L ⁻¹	pH do biopolímero	Observação
Alginato de sódio	I	400	250	6,49	Domingos (2019)
EPS	II	50	----	2 ± 0,2	EPS _{ácido}
EPS	III	50	----	2 ± 0,2	EPS _{ácido}
EPS	IV	250	----	2 ± 0,2	EPS _{ácido}
EPS	V	250	100	8 ± 0,2	EPS _{mix}

Fonte: Autor, 2021.

4.2 FASES I E II - APLICAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO E EPS COMO AGENTES FACILITADORES DA GRANULAÇÃO

Essa seção corresponde as Fases I e II de operação, as quais consistiram na adição de alginato de sódio e EPS_{ácido} respectivamente, com o intuito de avaliar os efeitos de adesão entre as partículas e a eficiência de tratamento do sistema em longo período de operação (Figura 12).

Figura 12: Delineamento metodológico para as Fases I e II.

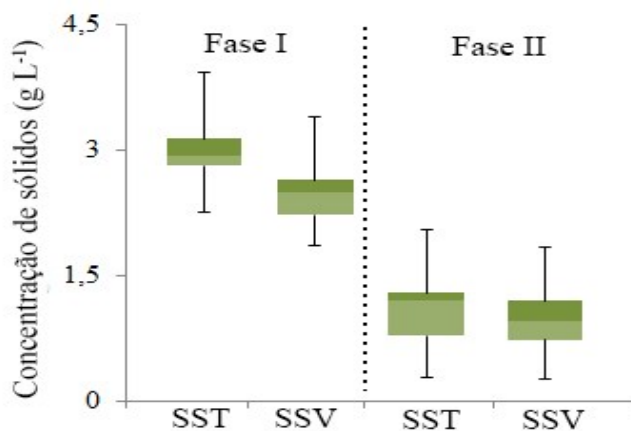


Fonte: Autor, 2021.

4.2.1 Caracterização da biomassa

Os resultados obtidos nas Fases I e II para a concentração de biomassa em termos de SST e SSV estão dispostos na Figura 13. A Fase I apresentou bom desenvolvimento da biomassa, com médias de $2,9 \pm 0,45$ gSST L⁻¹ e $1,3 \pm 0,3$ gSSV L⁻¹. Em contrapartida, na Fase II, o efeito de aglomeração das partículas pelo EPS foi menor que na Fase I, resultando em perda de biomassa durante o primeiro dia de funcionamento do reator, restando apenas 0,5 g SST L⁻¹ em relação à concentração inicial de inóculo de 1,50 g SST L⁻¹. Na sequência, ao longo dos dias de funcionamento do reator, houve desenvolvimento da biomassa, com médias de $1,3 \pm 0,3$ gSST L⁻¹ e $1,1 \pm 0,3$ gSSV L⁻¹ para o período de estudo.

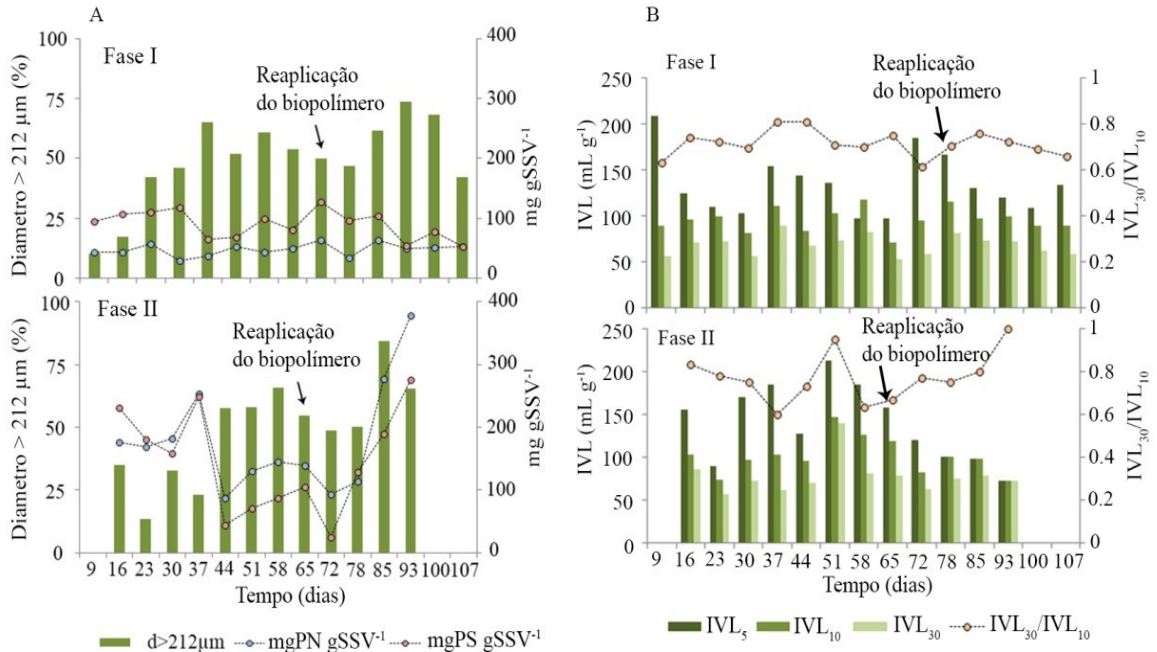
Figura 13: Médias e desvio padrão das concentrações de biomassa nas Fases I e II do estudo.



Fonte: Autor, 2021.

Os resultados de caracterização da biomassa em termos de diâmetro dos grânulos ($> 212 \mu\text{m}$), PS, PN e IVL ao longo do tempo, para as duas fases operacionais, estão apresentados na Figura 14.

Figura 14: (A) Diâmetro dos grânulos, PS e PN ao longo do tempo; (B) $IVL_{5,10,30}$ e relação $IVL_{30/10}$ ao longo do tempo, Fases I e II.



Na Fase I, os resultados de $IVL_{30}/IVL_{10} = 0,71 \pm 0,05$; $IVL_{30} = 68 \pm 11 \text{ mL g}^{-1}$ caracterizam a biomassa como de boa sedimentabilidade ($IVL_{30} < 80 \text{ mL g}^{-1}$) em comparação com sistemas de lodo ativado (SPERLING; CHERNICHARO, 2005). Na Fase II, observou-se também boa sedimentabilidade com valores de $IVL_{30}/IVL_{10} = 0,75 \pm 0,1$ e $IVL_{30} = 78 \pm 21 \text{ mL g}^{-1}$. Nesta fase, os grânulos apresentaram diâmetro superior a 212 μm acima de 50% a partir do dia 44. Apesar da boa sedimentação das partículas, o LGA nas duas fases não se encontrava nas condições ideais em comparação com estudos utilizando sistemas completamente granulares, os quais descrevem uma biomassa de boa sedimentação não só com os resultados isolados de $IVL_{5,30}$, mas também com a relação IVL_{30}/IVL_{10} próximos de 1 (PRONK et al., 2015). Outros estudos desenvolvidos em condições semelhantes, contudo em períodos mais prolongados (+200 dias) e sem aplicação de agentes externos, como o alginato de sódio e $EPS_{\text{ácido}}$, apresentaram resultados similares de agregação da biomassa, além de maior instabilidade dos agregados (JUNGLES et al., 2011; XAVIER et al., 2021).

A aplicação do alginato de sódio favoreceu a aglomeração entre as partículas logo após sua adição e não houve perda de biomassa durante a fase de aclimação do reator nas duas primeiras semanas, a formação de grânulos foi predominante a partir do dia 37°. Essa resposta do sistema pode estar relacionada à interação entre os blocos tipo 'G' da matriz do alginato com íons metálicos, a qual resulta em uma matriz tridimensional com propriedades gelificantes e de proteção também conhecida como '*egg-box model*' (HAY et al., 2013). A aplicação de íons de cálcio em conjunto com o alginato contribuiu na formação de agregados, a partir da redução das cargas repulsivas presentes nas partículas em suspensão. Felz et al. (2020) reportaram que íons de cálcio atuam como agentes facilitadores da agregação, uma vez que estes podem realizar a neutralização das cargas na superfície dos grânulos, atuar como um

núcleo cristalino para adesão microbiana, ou participar em processos de ligação iônica cruzada.

Os valores obtidos para as proteínas e os polissacarídeos durante as duas fases foram contrastantes entre si. A Fase I foi marcada por concentrações mais elevadas de PS ($87 \pm 24 \text{ mg g}^{-1}\text{SSV}$) em relação à PN ($47 \pm 10 \text{ mg g}^{-1}\text{SSV}$), mantendo-se estáveis ao longo do tempo. De acordo com Freitas et al. (2017), a síntese de PS é priorizada em relação à PN em condições limitantes, como a pouca disponibilidade de carbono durante o tratamento. A análise T-student mostrou que o aumento de PS é estatisticamente significativo ($p < 0,01$), o qual foi correlacionado com a adição de alginato de sódio no RBSG. Os valores de PS superiores a PN podem ter contribuído para maior concentração da biomassa no licor misto, sugerindo que o biopolímero pode ter acelerado os estágios iniciais de formação do grânulo aeróbio. Estudos apontam que as propriedades e características químicas do alginato podem ser benéficas para a formação de grânulos, uma vez que ele consegue agir como uma matriz de imobilização para biocatalizadores, como as células presentes no tratamento de efluentes (HAY et al., 2013). A formação de hidrogéis por esse composto é dependente da disponibilidade de blocos contendo residuais de grupos como o ácido gulurônico, assim como a afinidade com os íons metálicos disponíveis (FELZ et al., 2020).

A Fase II apresentou concentrações médias de PS ($145 \pm 82 \text{ mg g}^{-1}\text{SSV}$) inferiores às de PN ($178 \pm 85 \text{ mg g}^{-1}\text{SSV}$), porém, ambas mais elevadas que na Fase I. Para Feng et al. (2021), a presença de polissacarídeos está correlacionada com a formação da estrutura do grânulo e as suas propriedades gelificantes, enquanto a presença de PN pela estabilidade, características hidrofóbicas e cargas da superfície dos agregados. A comparação de ambas as fases demonstrou que a produção de PS e PN na Fase II foi estatisticamente maior que na Fase I ($p < 0,01$), indicando que a adição de EPS foi benéfica para a produção e secreção de PS e PN. Assim, apesar dos efeitos leves na agregação inicial da biomassa na Fase II, a adição de EPS como agente acelerador da granulação afetou a formação dos agregados, a partir da disponibilidade de diversos componentes com pesos moleculares variados para assimilação pelos microrganismos presentes no inóculo. Na Tabela 6 estão apresentadas as condições aplicadas ao reator em termos de cargas e características operacionais para a biomassa.

Tabela 6: Condições operacionais: cargas e biomassa.

Parâmetro	Unidade	Fase I	Fase II
Carga orgânica aplicada	$\text{kgDQO}_T \text{ m}^{-3}\text{d}^{-1}$	$1,066 \pm 0,236$	$0,615 \pm 0,077$
	$\text{kgDBO} \text{ m}^{-3}\text{d}^{-1}$	$0,612 \pm 0,117$	$0,601 \pm 0,148$
Idade do lodo	dia	21 ± 7	$13 \pm 4,5$
μ_{obs}	d^{-1}	$0,054 \pm 0,028$	$0,086 \pm 0,031$
A/M	$\text{gDQO}_T \text{ g}^{-1}\text{SSVd}^{-1}$	$0,448 \pm 0,128$	$0,620 \pm 0,197$

Fonte: Autor, 2021.

Verifica-se que, o esgoto sanitário foi aplicado em baixa carga ($\leq 1,0 \text{ kgDQO}_T \text{ m}^{-3}\text{d}^{-1}$). Para Czarnota & Maslon (2019), o desenvolvimento ideal do LGA ocorre sob condições de

cargas orgânicas variando entre 2,5 e 7,5 kgDQO_T m⁻³d⁻¹. Franca et al. (20198) e Xavier et al. (2021) verificaram ainda que, durante estações chuvosas os compostos orgânicos podem ser diluídos, resultando em valores inferiores de carga aplicada.

A baixa carga aplicada, nas duas fases, conduziu à formação e maturação de grânulos de pequeno diâmetro (< 600 µm), sendo observada uma desintegração dos mesmos nos dias 72 e 65 nas Fases I e II, respectivamente. Dessa forma, o biopolímero proposto para cada fase foi reaplicado, de modo a avaliar sua eficácia na manutenção da biomassa. Esse enfraquecimento foi relacionado às condições de alimentação do sistema (efluente sanitário de baixa concentração), secreção de PN e PS insuficiente pelos microrganismos, transporte deficitário de nutrientes ao longo da estrutura granular e o excesso de íons multivalentes (FELZ et al., 2020; FREITAS et al., 2017; LIN et al., 2020; GUIMARÃES et al., 2018). Após a adição dos biopolímeros observou-se a recuperação e manutenção da biomassa, confirmando seu potencial uso como agentes indutores da granulação (Figura 15).

Comportamento semelhante foi observado por Peyong et al. (2012), que relataram a desestabilização de grânulos maduros (diâmetro médio de 2,2 mm), após 2 meses de operação de reator com LGA alimentado com esgoto sanitário real (0,54 kg DQO_S m⁻³ d⁻¹). Os agregados maiores se desintegraram gradualmente em pequenos fragmentos e foram descartados do reator. Igualmente, Zhang et al. (2011) observaram em reatores operados com carga de 0,58 kg DQO_S m⁻³ d⁻¹ grânulos aeróbios com estrutura oca e instáveis quando seu diâmetro alcançou 1 mm, resultando em deterioração da sedimentabilidade do lodo e redução do conteúdo de EPS. Diante disso, os autores sugeriram que agregados menores são mais favoráveis para o tratamento de efluentes de baixa concentração.

O controle da relação alimento/microrganismo (A/M) também é essencial para atingir grânulos estáveis e de rápida sedimentação (HAMZA et al., 2018). Os resultados obtidos para a primeira fase (0,448±0,128 gDQO_T g⁻¹SSVd⁻¹) estão dentro do intervalo considerado ideal, de 0,4 a 0,5 gDQO_T g⁻¹SSVd⁻¹ (WU et al., 2018), enquanto a Fase II apresentou valores acima do recomendado (0,620 ± 0,197 gDQO_T g⁻¹SSVd⁻¹). No entanto, ambas as fases apresentaram a formação de grânulos aeróbios até o final da operação. Li et al. (2011) observaram uma relação direta e linear entre A/M e o diâmetro dos grânulos. Enquanto a relação A/M de 1,1 g DQO g⁻¹ 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 g DQO g⁻¹SSV d⁻¹ induziu a formação mais lenta de grânulos aeróbios com diâmetro médio de 1,5 mm. Por outro lado, Zhu et al. (2008) verificaram que uma baixa relação A/M (< 0,3 g DQO g⁻¹SSV d⁻¹), promoveu o rápido crescimento de organismos filamentosos nos agregados, levando à sua desintegração, após 200 dias de operação em um reator com LGA. Os autores concluíram que valores relativamente baixos de A/M podem auxiliar a manter os grânulos aeróbios pequenos, densos e estáveis, porém, o aumento de organismos filamentosos pode comprometer a estabilidade do LGA.

Na Fase I, a presença do alginato pode ter proporcionado condições de proteção e agregação entre partículas, suficientes para o desenvolvimento do LGA, conforme discutido anteriormente (HAY et al., 2013). Na Fase II, a adição de EPS, como acelerador da granulação aeróbia, contribuiu não só para aglomeração das partículas, como também serviu de fonte de energia para os microrganismos, conforme os resultados de A/M, µ_{obs}, PS e PN.

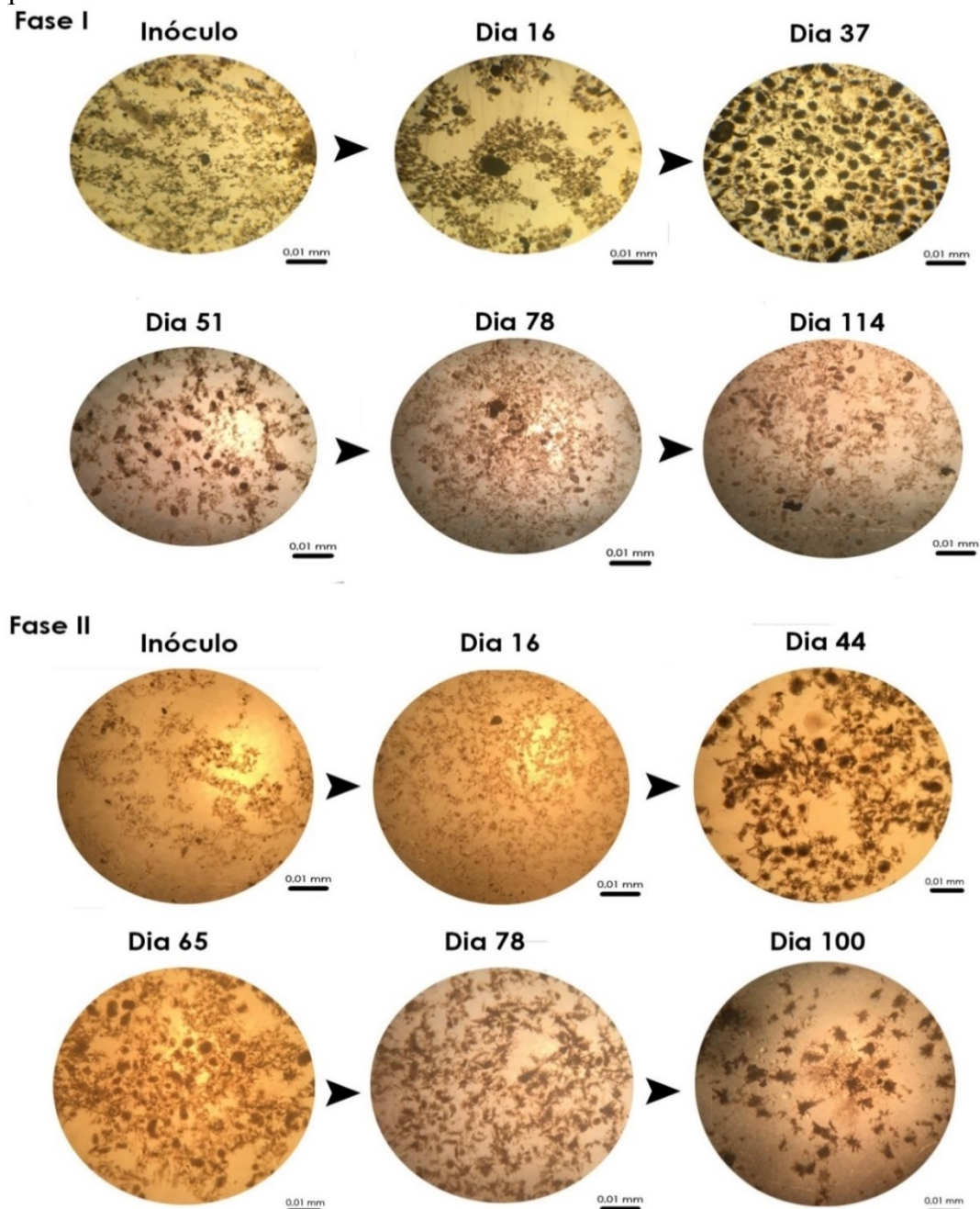
Os valores de μ_{obs} nas Fases I ($0,054 \pm 0,028 \text{ d}^{-1}$) e II ($0,086 \pm 0,031 \text{ d}^{-1}$) corroboram os relatos de Guimarães et al. (2018) e Xavier et al. (2021). A idade do lodo para a primeira e a segunda fase foi de 21 ± 7 e $13 \pm 4,5$ dias, estando dentro da variação adequada para a formação do LGA e remoção de nutrientes e carbono (CAMPO et al., 2020). No entanto, estudos indicaram que idades de lodo superiores a 15 dias são relevantes para o processo de nitrificação (FELZ et al., 2020). É recomendado o controle da idade do lodo, de modo a permitir tempo suficiente para a hidrólise e absorção dos compostos orgânicos de modo a ter o desenvolvimento da biomassa. A lavagem do lodo durante a fase de aclimatação da biomassa na Fase II contribuiu para a idade de lodo inferior à primeira fase. Contudo, a adição de ambos os biopolímeros foi considerada benéfica para a agregação da biomassa e o desenvolvimento da comunidade microbiana.

4.2.2 Morfologia dos grânulos e comunidade microbiana

As mudanças na morfologia dos agregados foram monitoradas por meio de análises de microscopia óptica, realizadas semanalmente ao longo dos períodos de 107 e 100 dias, nas Fases I e II, respectivamente (Figura 15).

Observa-se que o lodo utilizado como inóculo consistia majoritariamente de flocos arranjados em uma estrutura esparsa. A primeira e a segunda fase foram identificadas como predominantemente granulares após o 37º e 44º dia, respectivamente. Os agregados formados apresentaram superfície estrelada e sempre acompanhados de floco. Contudo, os grânulos formados durante a Fase I demonstraram-se mais compactos e com superfície mais arredondada quando comparados à Fase II. Os grânulos apresentaram diâmetros entre 212 μm e 600 μm , caracterizando sistemas com agregados de dimensões consideradas pequenas. A complexidade do efluente, a disponibilidade de carbono e nutrientes e a configuração do reator foram consideradas como os responsáveis por essas características dos agregados (FRANCA et al., 2018).

Figura 15: Fotos do desenvolvimento dos grânulos aeróbios capturadas via microscopia óptica.



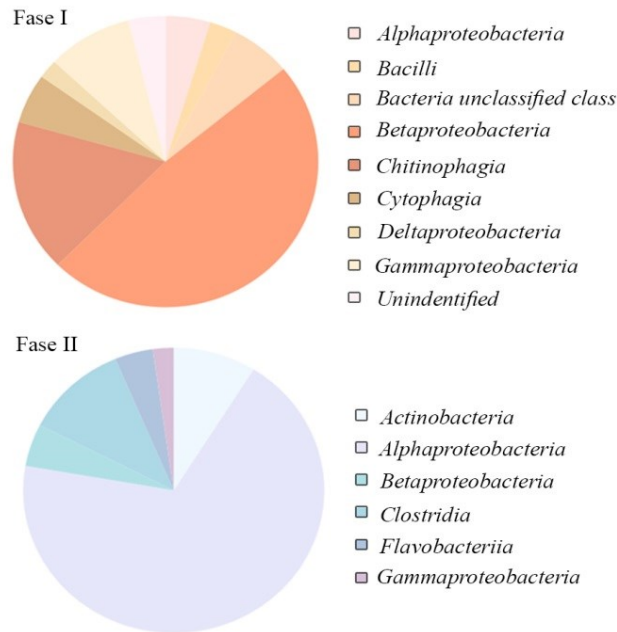
Fonte : Autor, 2021.

Em relação às comunidades microbianas do LGA, a adição dos biopolímeros contribuiu não só para a agregação das partículas, como também para a abundância relativa dos microrganismos. As amostras utilizadas para a determinação dos organismos foram coletadas nos dias 65 e 58 de operação, durante as Fases I e II, respectivamente (Figura 16). As sequências utilizadas para o tratamento de dados foram previamente selecionadas de modo que somente aquelas que correspondessem a pelo menos 1% do total de microrganismos fossem consideradas, correspondendo a 90,25% e 88,63% das sequências identificadas

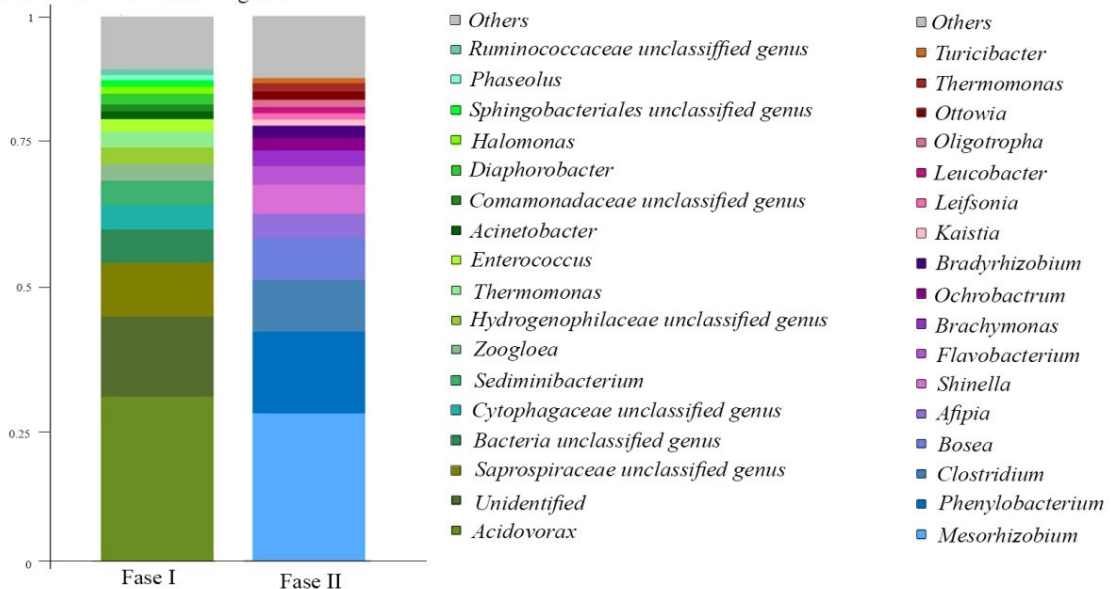
durante as Fases I e II, respectivamente. A Fase I apresentou majoritariamente *Betaproteobactérias* (45%), enquanto a Fase II teve *Alphaproteobactérias* (64%).

Figura 16: Abundância relativa dos microrganismos identificados nas Fases I e II em níveis de família e gênero.

Análise em nível trófico de família



Análise em nível trófico de gênero



Fonte: Autor, 2021.

As famílias dominantes durante a Fase I foram *Comamonadaceae* (35%), *Saprospiraceae* (9,8%) e *Chitinophagaceae* (6%). Nesta fase, destacam-se a ocorrência de organismos desnitrificantes facultativos e heterotróficos, como os gêneros *Acidovorax* (30,2%), *Zoogloea* (3,1%) e *Thermomonas* (3%). *Zoogloea* foram relacionados com a

formação de flocos e identificados a partir da disponibilidade de um efluente complexo (GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2011). Membros da família *Comomonadaceae*, como *Acidovorax*, são reconhecidos por realizarem desnitrificação heterotrófica nas estações de tratamento de esgoto (GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2011). Weissbrodt et al. (2013) reportaram que os organismos das famílias *Comamonadaceae* e *Xanthomonadaceae* são de crescimento lento, sendo reconhecidos como ideais para a formação e estabilização dos grânulos. Enquanto organismos da família *Saprospiraceae* foram reportados em ambientes de água salina e de tratamento de efluentes com lodos ativados, e podem contribuir para a hidrólise de compostos carbonáceos mais complexos no efluente (ROSENBERG, 2014). Em complemento, as famílias *Rhodocyclaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Sphingomonadaceae* estão associadas com uma maior presença de EPS em processos granulação aeróbia (SZABÓ et al., 2017).

Em contrapartida, a Fase II apresentou *Phyllobacteriaceae* (27%), *Bradyrhizobiaceae* (16%), *Caulobacteraceae* (15,4%), *Clostridaceae* (9,5%) e *Rhizobiaceae* (8,2%) como as principais famílias. Verificou-se a ocorrência de organismos desnitrificantes altamente resistentes como *Mesorhizobium*, *Clostridium* e *Brachymonas*, os quais também foram relacionados com elevada produção de EPS, proporcionando um ambiente mais adequado para a formação de grânulos (ZHENG et al., 2020). A presença do gênero *Mesorhizobium* foi correlacionada com a remoção de compostos fenólicos e poluentes refratários (TANG et al., 2021). Ainda, foi relatado que organismos do gênero *Clostridium* são altamente resistentes e adaptáveis, além de produzirem moléculas de biohidrogênio (LERTSRIWONG; GLINWONG, 2020). Os participantes do gênero *Brachymonas* podem também secretar EPS, proporcionando carbono e energia para outras bactérias (LIU et al., 2021).

Os índices Shannon e Simpson foram utilizados para a determinação da diversidade ecológica em ambas as etapas. Foi identificada baixa diversidade e desigualdade entre os microrganismos para a Fase I (Shannon = 2,05; Simpson = 7,41) e Fase II (Shannon = 2,12; Simpson = 8,34). Apesar dessa semelhança na análise da diversidade ecológica, as comunidades dominantes eram distintas entre as duas fases. Como discutido anteriormente, a Fase I destacou organismos ordinários no sistema de tratamento de efluentes, em contraste com a Fase II a qual mostrou organismos resistentes e degradadores de compostos tóxicos. Com isso, entende-se que a adição do EPS_{ácido} na segunda fase proporcionou contribuiu para a seleção de grupos de organismos incomuns e específicos, afetando o processo de granulação em nível não só físico-químico, como biológico.

4.2.3 Desempenho do tratamento do RBSG

Na Tabela 7 têm-se resultados para os principais parâmetros de monitoramento do esgoto afluente e efluente, bem como das eficiências de remoção, durante as Fases I e II. O efluente bruto apresentou relação C/N/P de 100/21/3,2 e 100/27/2,8 nas Fases I e II, respectivamente, demonstrando um excesso de amônia e baixo teor de fósforo total em relação à DBO.

Tabela 7: Desempenho de tratamento do RBSG durante as Fases I e II.

Parâmetro	Unidade	Fase I	Fase II
Efluente bruto		n=15	n= 12
DQO_T	mg L ⁻¹	410 ± 91	237 ± 30
DQOs	mg L ⁻¹	244 ± 47	130 ± 26
DBO	mg L ⁻¹	233 ± 44	231 ± 57
NH₄-N	mg L ⁻¹	51 ± 19	63 ± 9
PT	mg L ⁻¹	7,5 ± 0,8	6,5 ± 1,3
Efluente tratado		n=15	n= 12
pH	----	7,36 ± 0,5	7,20 ± 0,5
Temperatura	°C	23,3 ± 1,8	23,5 ± 2,7
DQO_T	mg L ⁻¹	121 ± 65	91 ± 49
DQOs	mg L ⁻¹	46 ± 12	41 ± 9
DBO	mg L ⁻¹	33 ± 10	32 ± 14
NH₄-N	mg L ⁻¹	15 ± 8	29 ± 16
PT	mg L ⁻¹	5 ± 1,5	5,6 ± 1,2
Eficiência de remoção			
DQO_T	%	69 ± 13	61 ± 19
DQOs	%	81 ± 5	67 ± 8
DBO	%	85 ± 6	85 ± 7
NH₄-N	%	61 ± 30	54 ± 24
PT	%	31 ± 20	13 ± 9

Fonte: Autor, 2021

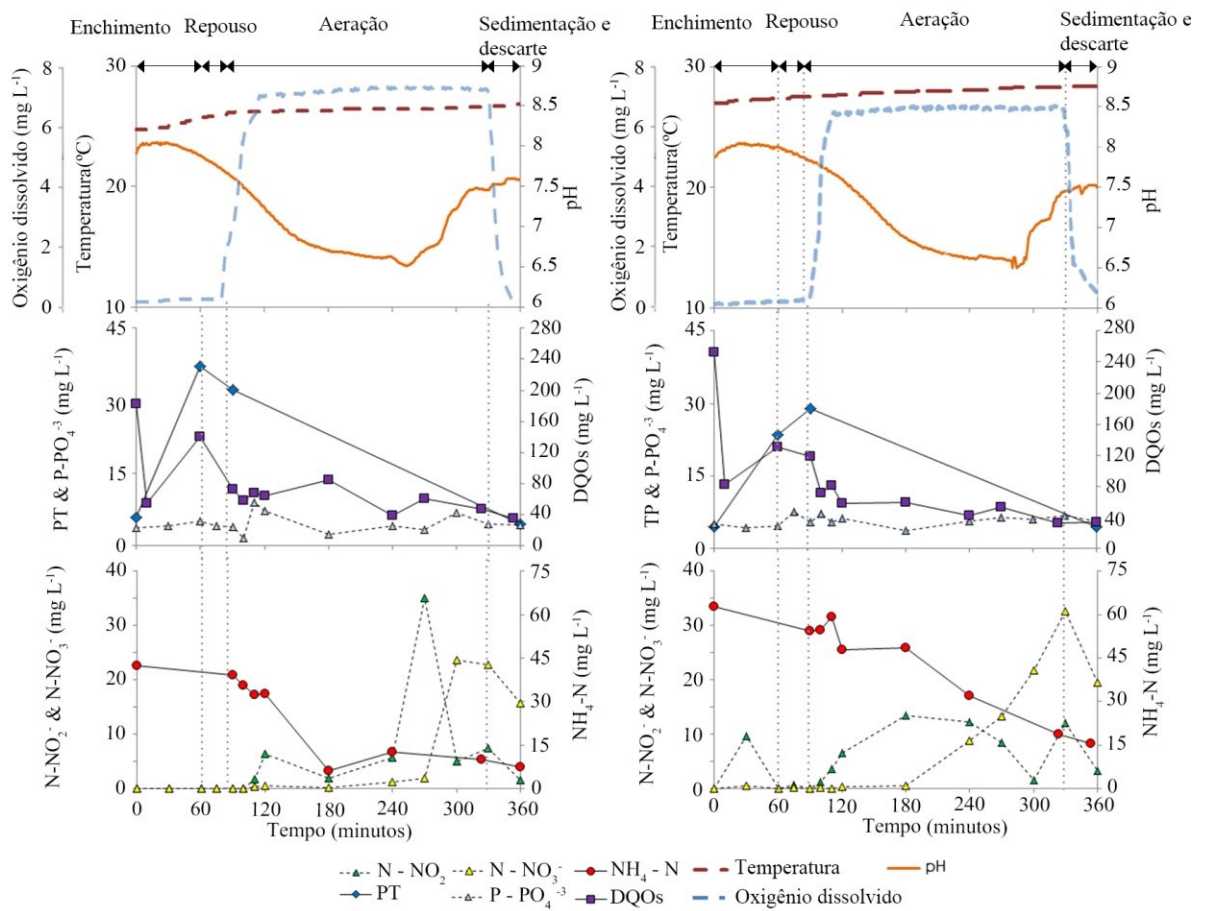
A análise do desempenho do RBSG para as Fases I e II apresentou boa remoção de matéria orgânica (~85% remoção de DBO), em conjunto com a remoção satisfatória de NH₄-N (>50%). A adição dos biopolímeros no sistema LGA contribuiu para o processo de remoção e adsorção de nutrientes, que pode ocorrer devido à presença de diversos compostos na matriz do EPS, como proteínas e grupos funcionais (FENG et al., 2021).

No entanto, a remoção de fósforo foi baixa durante ambas as fases, e pode estar relacionada com a temperatura (> 20 °C) em que o sistema funcionou e a disponibilidade de fósforo e carbono, tendo como resposta a não ocorrência de organismos de crescimento lento responsáveis pela remoção de fósforo (GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2011).

O monitoramento de uma batelada de tratamento (ciclo) ocorreu para a primeira e a segunda fase no 72º e 58º dias de operação, respectivamente, cujos resultados estão dispostos na Figura 17. Em ambas as fases, os ciclos apresentaram pouca variação de temperatura, aumentando cerca de dois graus entre o início e o fim do ciclo; o pH variou entre 6,0 e 8,0; e o oxigênio dissolvido (OD) esteve em níveis de saturação durante a etapa aerada (7 a 8 mg L⁻¹).

Estudos destacam a importância desses três fatores para o desenvolvimento de organismos específicos como os organismos acumuladores de fósforo (PAO) e de glicogênio (GAO) (GUIMARÃES et al., 2018). Sabe-se que sistemas desenvolvidos em condições de temperaturas extremas (< 8° C e > 35° C), baixos teores de OD (< 2 mg L⁻¹) e baixo pH (< 6,0) são fatores de desestabilização do LGA, devido à proliferação de organismos indesejáveis, como os filamentosos, e condições menos adequadas para agregação e adsorção de partículas (FREITAS et al., 2017; LAYER et al., 2020).

Figura 17: Perfis de monitoramento ao longo de um ciclo operacional padrão (360 minutos) – Fase I (esquerda) – aos 72 dias e Fase II (direita)- aos 58 dias de operação.



Fonte: Autor, 2021.

Na Fase I houve consumo de matéria orgânica (DQOs) durante os primeiros 90 min de ciclo, que compreendia as etapas de alimentação anaeróbia e repouso. A presença do gênero *Zoogloea* durante essa fase pode ter contribuído para isso, uma vez que esses organismos são realizadores de processos de fermentação anaeróbia (FU et al., 2019). Estudos recentes demonstraram o potencial sinérgico entre os organismos *Acidovorax* e *Zoogloea*, presentes nessa fase (ZHENG et al., 2020).

A Fase II também apresentou assimilação da matéria orgânica durante a fase anaeróbia do ciclo (90 min), porém foi relacionada à presença do gênero *Clostridium* e do filo *Actinobacteria*. Membros do gênero *Clostridium* podem se adaptar com facilidade a diversos ambientes, produzir elevadas concentrações do gás hidrogênio e degradar substratos complexos para mais formas mais simples a partir do processo de fermentação (LERTSRIWONG; GLINWONG, 2020). Já os membros do filo *Actinobacteria* foram destacados por possuírem papel essencial na hidrólise e acidificação da matéria orgânica disponível em ácidos graxos voláteis (AGV).

Como ambas as fases apresentaram elevada abundância relativa de organismos desnitrificantes heterotróficos ordinários (DOHO), concluiu-se que a assimilação da matéria carbonácea durante a etapa anaeróbia do ciclo não foi substancial a ponto de impedir seu

crescimento. Durante a etapa de aeração, o restante da matéria orgânica disponível foi consumido provavelmente por organismos heterotróficos ordinários (OHO). Ainda nesse momento foi relatada a conversão da amônia para suas formas oxidadas, NO_3^- e NO_2^- .

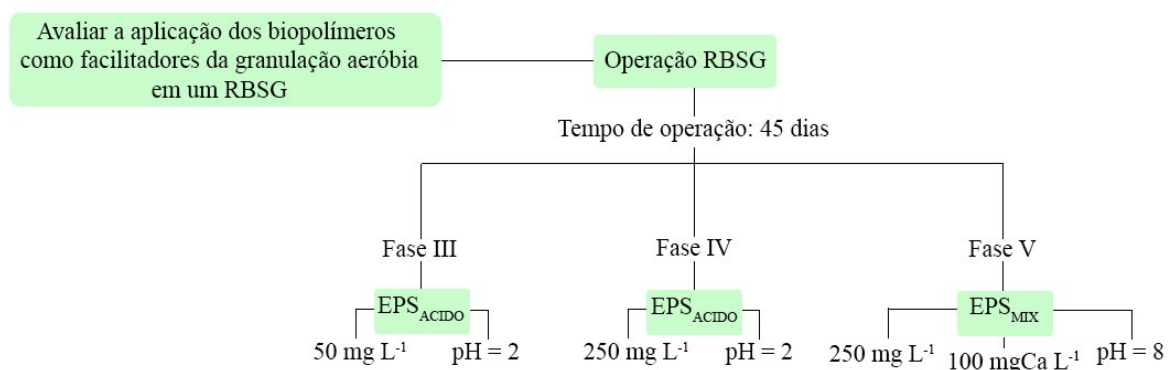
Os perfis de compostos de nitrogênio para ambas as fases foram similares, apesar da diferença na estrutura da comunidade microbiana. Elas destacaram o processo de nitrificação completa da amônia em conjunto com a desnitrificação dos íons NO_2^- e NO_3^- como a rota preferencial de remoção do nitrogênio. Entretanto, apesar de elevada concentração de organismos desnitrificantes nas duas fases analisadas, o efluente final apresentou acima de 20 mg L^{-1} de NO_3^- na sua composição, indicando que esse processo não foi realizado de forma eficaz. Foi reportada a competição por matéria orgânica e a inibição de organismos oxidadores de NO_2^- e NO_3^- em sistemas com uma baixa relação OD/ NH_4 (LOCHMATTER et al., 2014). Em estudo realizado em condições de operação e alimentação similares ao proposto nas Fases I e II, Guimarães et al. (2018) também reportaram acumulação de nitrito durante o tratamento de esgoto sanitário.

A pouca disponibilidade de matéria orgânica e compostos de fósforo no esgoto sanitário, as condições climáticas de operação ($20 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$), e a competição entre os microrganismos podem ter afetado o desenvolvimento de PAO (GUIMARÃES et al., 2018), resultando na baixa remoção de fósforo reportada.

4.3 FASES III, IV E V - APLICAÇÃO DE EPS COMO AGENTE FACILITADOR DA GRANULAÇÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Essa seção corresponde as Fases III, IV e V de operação, de modo a avaliar a adesão entre as partículas e a eficiência de tratamento para diferentes configurações do EPS ($\text{EPS}_{\text{acido}}$ e EPS_{mix}), metodologias de aplicação e condições operacionais durante 45 dias cada (Figura 18).

Figura 18: Delineamento metodológico para as Fases III, IV e V.



Fonte: Autor, 2021.

4.3.1 Caracterização da biomassa

Na Tabela 8 têm-se dados de características da biomassa durante as Fases III, IV e V. Observa-se que os valores médios obtidos para os sólidos (SST e SSV) nas três fases foram similares, sendo ligeiramente superior na Fase IV. A análise de variância, porém, demonstrou que não houve diferença significativa entre as fases nas concentrações de biomassa.

Ressalta-se que, durante as Fases IV e V, houve perda de biomassa do inóculo no período de 'start-up' do reator. A concentração inicial de 3 gSST L⁻¹ resultou em valores de 1,2 e 0,7 gSST L⁻¹, nas Fases IV e V, respectivamente. Apesar dessa perda, a adição do EPS_{ácido} e EPS_{mix} foi eficaz na manutenção do sistema LGA, recuperando a biomassa de forma similar. Destaca-se que nessas duas fases a metodologia de aplicação do EPS foi diferente. Na Fase IV o biopolímero foi adicionado de forma intermitente durante 7 dias, e na Fase V ele foi misturado ao inóculo antes do início de funcionamento do reator. Logo, esses resultados demonstram que o efeito do biopolímero não esteve diretamente relacionado à sua metodologia de aplicação. Os parâmetros de densidade e coeficiente de integridade da biomassa não apresentaram diferenças significativas entre as três fases, indicando que tanto o EPS_{ácido} quanto o EPS_{mix} contribuíram de forma semelhante na melhora desses parâmetros.

Tabela 8: Resultados das análises físico-químicas para o LGA ao longo das Fases III, IV e V.

Parâmetro	Unidade	Fase III	Fase IV	Fase V
Idade do lodo	dias	13 ± 8	6 ± 1,5	12 ± 4
SST	g L ⁻¹	1,5 ± 0,25	2,0 ± 0,25	1,8 ± 1,10
SSV	g L ⁻¹	1,3 ± 0,21	1,6 ± 0,14	1,4 ± 0,76
Velocidade de sedimentação média	m h ⁻¹	3,04 ± 0,58 ^a	3,33 ± 0,62 ^a	7,2 ± 1,8 ^b
Densidade da biomassa	gSSV Lgranulos ⁻¹	30 ± 8,5 ^a	56 ± 12 ^a	44 ± 14 ^a
Coefficiente de integridade	%	10 ± 3 ^a	8,5 ± 3 ^a	7,6 ± 3,8 ^a
IVL₃₀	mL g ⁻¹	99 ± 27 ^a	94 ± 30 ^a	64 ± 7,5 ^b
IVL₁₀	mL g ⁻¹	156 ± 31	138 ± 42	86 ± 13
IVL₅	mL g ⁻¹	293 ± 141	182 ± 66	113 ± 25
IVL_{30/10}	-	0,62 ± 0,07	0,68 ± 0,07	0,75 ± 0,05

^{a,b} = diferença estatística significativa (p < 0,05)

Fonte: Autor, 2021.

As análises estatísticas dos demais parâmetros analisados destacaram a velocidade de sedimentação e o IVL₃₀ na Fase V como estatisticamente significativa (p < 0,05), estes atribuídos a adição de íons de cálcio na matriz do EPS_{mix}. Outros estudos também reportaram a melhora nesses parâmetros após a adição de íons de cálcio em sistemas LGA (BARROS et al., 2020). Logo, entende-se que o aumento da velocidade de sedimentação na Fase V pode

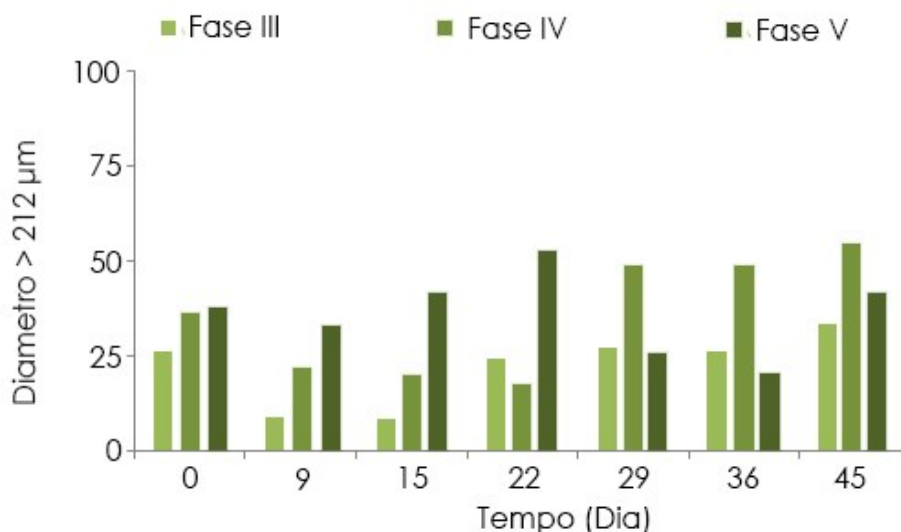
ter ocorrido devido a fatores como alterações no tamanho e na superfície das partículas em suspensão, ou a precipitação de compostos inorgânicos (WINKLER et al., 2012; WINKLER et al., 2013). Estudos relatam que íons de cálcio se ligam com a matriz do EPS formando uma estrutura mais complexa, a qual pode facilitar o desenvolvimento de microrganismos, e formar precipitados orgânicos, como carbonato de cálcio e fosfato de cálcio (SAJJAD; KIM, 2015; LI et al., 2017). Os resultados obtidos por Moraes et al. (2018) corroboram os obtidos na Fase V, indicando melhora na sedimentabilidade e resistência da biomassa devido a adição de íons de cálcio. Igualmente, Ajao et al. (2021) verificaram que a presença de cátions di/multivalentes na formação de grânulos exerceu um papel essencial de interação eletrostática entre a matriz do EPS e as partículas carregadas negativamente no meio (biomassa).

A adição do EPS nas Fases IV e V demonstrou-se benéfica para o aumento da densidade média da biomassa, a qual contribuiu para melhores condições de sedimentação (IVL). Jungles et al. (2017) avaliaram a formação de grânulos aeróbios em três RBSG em escala laboratorial em diferentes condições de 'start-up'. Os autores reportaram valores de densidade inferiores a $30 \text{ gSSV Lgrânulo}^{-1}$, corroborando os resultados obtidos por Domingos et al. (2020), usando nanopartículas de magnetita como aditivo para a granulação ($29 \text{ gSSV Lgrânulo}^{-1}$). Winkler et al. (2013) relacionaram o aumento da densidade do grânulo à formação de precipitados e à presença de bactérias específicas, como as NOB e PAO.

O coeficiente de integridade foi medido semanalmente em cada fase para verificar a resiliência e a compacidade dos agregados. O inóculo utilizado em todas as três fases caracterizava-se como não estável ($S > 20\%$; $\rho < 10 \text{ g SST L}^{-1}$). Valores de S elevados correspondem a um agregado mais propenso ao cisalhamento (NOR-ANUAR et al., 2012). A comparação entre as três fases demonstrou uma melhora gradual do parâmetro em questão ($S_{\text{FaseIII}} = 10 \pm 3$; $S_{\text{FaseIV}} = 8.5 \pm 3$; $S_{\text{FaseV}} = 7.6 \pm 3.8$), entretanto a análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa entre elas ($p > 0.05$). Esses resultados estão de acordo com a literatura, a qual relaciona uma maior resiliência de grânulos com uma menor dimensão (GHOSH; CHAKRABORTY, 2021).

Em relação ao diâmetro dos grânulos, nas Fases III e V não se observou a predominância ($> 50\%$) de agregados acima de $212 \mu\text{m}$ ao final do período analisado; a Fase IV atingiu e manteve esse patamar a partir do 29º dia de operação (Figura 19). Contudo, diversos estudos destacam grânulos de pequenas dimensões como ideais pra longos períodos de operação (FRANCA et al., 2018). Durante os três períodos analisados foram reportados baixas concentrações de matéria orgânica disponível, que pode ter afetado a formação e o tamanho dos grânulos. Conforme relatos de Guimarães et al. (2018) e Xavier et al. (2021), a análise das características da biomassa granular permite inferir que a eficiência do biopolímero EPS como agente melhorador da granulação aeróbia está relacionada tanto com a carga orgânica e de nutrientes presentes no efluente, quanto com a concentração do inóculo durante a inicialização do sistema. Logo, a adição do $\text{EPS}_{\text{acido}}$ e EPS_{mix} demonstrou-se favorável para o desenvolvimento de grânulos aeróbios em um sistema alimentado por efluente sanitário de baixa concentração, com a formação de estruturas compactas e resistentes.

Figura 19: Comparação dos resultados de dimensão, densidade e velocidade de sedimentação entre as fases III, IV e V.



Fonte: Autor, 2021.

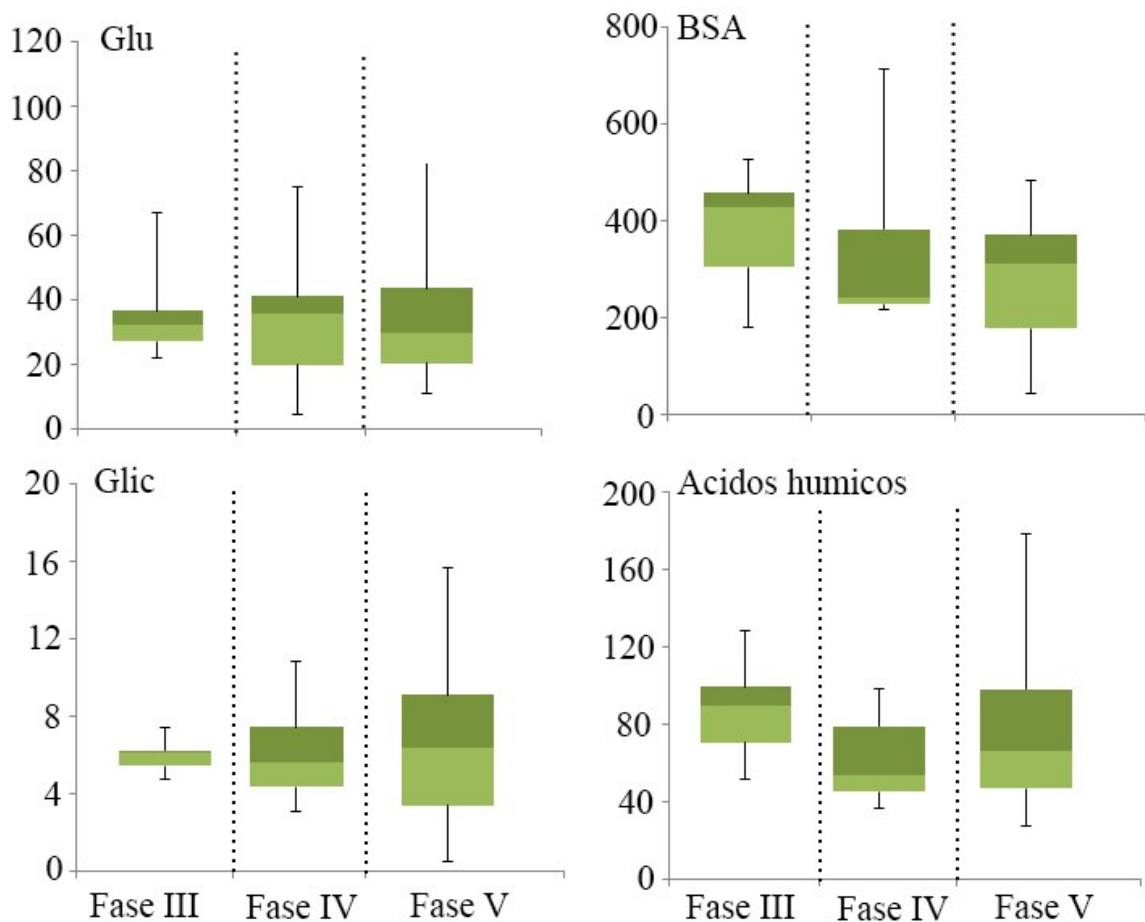
A biomassa coletada nas Fases III, IV e V também foi caracterizada por meio da análise de FTIR (APÊNDICE B). A partir dos resultados obtidos, foi possível identificar semelhanças entre elas, implicando que a adição de cálcio na matriz do EPS, adicionado como agente acelerador da granulação, não alterou a configuração da biomassa, quando comparado com as outras duas fases. Foram destacados picos fortes na região de $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, seguido de picos mais fracos na região $3000 - 2840 \text{ cm}^{-1}$, estes foram associados a vibrações das ligações de O-H e C-H, respectivamente, também relacionados com hidrocarbonetos (SILVERSTEIN et al., 2005). Além disso, na região $1700 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ também foram destacados picos, em todas as fases, que foram correlacionados com a presença de proteínas. Os picos fortes nos comprimentos de onda 1654 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} foram atribuídos as vibrações das ligações C-O das proteínas (região amida-I) e a inclinação da ligação N-H ou as vibrações das ligações C-N nos grupos funcionais $-\text{CO-NH}$ das proteínas presentes na matriz do EPS, respectivamente (KARAKAS et al., 2020). Apesar do pico no comprimento de onda 1452 cm^{-1} mostrar-se mais fraco que os anteriores, ele ainda foi reportado em todas as fases analisadas, e correlacionado com a inclinação das ligações C-H. Essa região ($1500 - 1300 \text{ cm}^{-1}$) é conhecida por alocar os grupos carboxílicos e estruturas tipo-hidrocarbonetos (KARAKAS et al., 2020). Esses resultados estão de acordo com a caracterização do EPS presente na seção seguinte (seção 5.2). Não obstante, os picos fortes relatados para os comprimentos de onda 1060 cm^{-1} (Fases III e IV) e 1034 cm^{-1} (Fase V) correspondem à presença de polissacarídeos na amostra, e estão relacionados com as vibrações do anel C-O-C e a vibração da ligação C-OH. Contudo, outros estudos também relataram na região $1150 - 950 \text{ cm}^{-1}$ vibrações das ligações no anel de piranose (PRONK et al., 2017).

4.3.2 Caracterização do EPS

Diversos estudos destacaram a necessidade de realização de análises mais precisas e adequadas para a determinação de proteínas e polissacarídeos no EPS extraído (SCHAMBECK et al., 2020). Nesse sentido, o EPS secretado pelos microrganismos durante o funcionamento do reator nas Fases III, IV e V foi caracterizado a partir da quantificação de proteínas, substâncias húmicas, açúcares neutros e urônicos.

A análise de variância não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre as fases para os parâmetros medidos, correspondendo às proteínas (BSA), ácidos húmicos, açúcares neutros (Glic) e urônicos (Glu) ($p > 0,05$), dispostos na Figura 20. A Fase III apresentou concentrações médias de $486 \pm 118 \text{ mg}_{\text{BSA}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, $105 \pm 25 \text{ mg}_{\text{ácidos húmicos}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, $45 \pm 20 \text{ mg}_{\text{Glu}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$ e $6,6 \pm 0,9 \text{ mg}_{\text{Glic}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$. Já a Fase IV apresentou concentrações de $445 \pm 221 \text{ mg}_{\text{BSA}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, $86 \pm 40 \text{ mg}_{\text{ácidos húmicos}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, $43,5 \pm 20 \text{ mg}_{\text{Glu}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$ e $6,5 \pm 3,6 \text{ mg}_{\text{Glic}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$. E por fim, a Fase V teve concentrações médias de $467 \pm 292 \text{ mg}_{\text{BSA}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, $76 \pm 22,76 \text{ mg}_{\text{ácidos húmicos}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$, $57 \pm 39 \text{ mg}_{\text{Glu}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$ e $10,2 \pm 5,7 \text{ mg}_{\text{Glic}} \text{ g}^{-1}\text{SSV}$.

Figura 20: Caracterização do EPS a partir das proteínas (BSA), ácidos húmicos, açúcares neutros (Glic) e urônicos (Glu) para as Fases III, IV e V por meio de gráficos tipo box-plot.



Fonte: Autor, 2021.

Assim como identificado nas Fases III, IV e V, outras quantificações do EPS extraído de lodo biológico também apresentaram as proteínas como o componente mais abundante, seguido das substâncias húmicas, açúcares urônicos e neutros (WEI et al., 2019). A presença de PN e PS extracelulares foi relacionada com a interação nos cátions multivalentes no meio (CHEN et al., 2019) e a estabilidade do grânulo (FENG et al., 2021), respectivamente. Além disso, estudos mais aprofundados da matriz EPS destacaram a prevalência dos açúcares urônicos aos neutros (RONDEL et al., 2013; SCHAMBECK et al., 2020b). A concentração de proteínas nas três fases apresentou-se superior a outros estudos quantificando a matriz EPS, usando reatores alimentados por efluente sanitário real (WEI et al., 2019; SCHAMBECK et al., 2020b), implicando que os biopolímeros, EPS_{ácido} e EPS_{mix}, foram assimilados e convertidos em EPS pelos microrganismos, ao invés de somente serem hidrolisados (LIANG et al., 2019). Contrastante a isso, estudos que consideraram a aplicação de cálcio como agente acelerador da granulação reportaram PS como o componente predominante no EPS secretado durante os experimentos (BARROS et al., 2020).

Em paralelo, as análises das comunidades microbianas para as Fases III, IV e V (item 5.4) destacaram a presença de organismos secretores de EPS, como os gêneros *Xanthomonas* e *Thauera*. Assim como, foi reportada a ocorrência de organismos tolerantes, produtores da enzima laccase, e degradadores de compostos fenólicos, como *Phenylobacterium*, *Pseudoxanthomonas*, *Acinetobacter*, *Acidovorax* e *Brachymonas*. Lyu et al. (2021) relacionaram maior secreção de PN em efluentes contendo compostos tóxicos, como fenóis. No presente estudo, a presença desses compostos foi atribuída a partir da degradação da lignina contida no esgoto, por organismos específicos, uma vez que o efluente utilizado não possui tais características inerentes (JIANG et al., 2021).

O componente mais abundante na estrutura do biopolímero correspondeu aos PS, que pode ser devido às características do efluente utilizado na alimentação e das condições operacionais do sistema LGA, além do efeito da adição de biopolímeros como EPS_{ácido} ou EPS_{mix} para melhor desenvolvimento do grânulo aeróbio (ZHENG et al., 2021b).

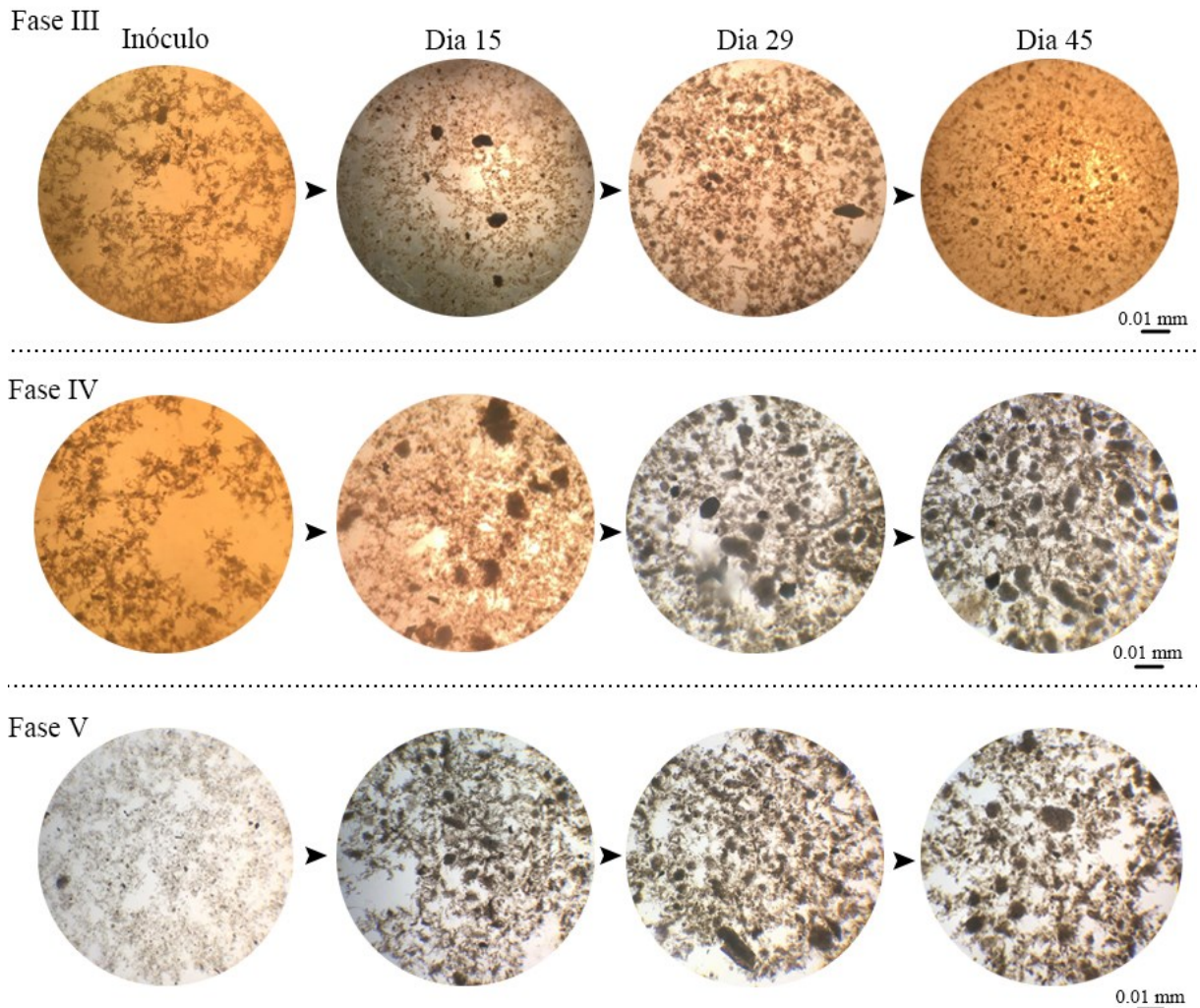
4.3.3 Morfologia dos grânulos

O desenvolvimento dos grânulos aeróbios foi monitorado por meio de microscopia óptica e também em microscópio eletrônico de varredura (MEV), Figuras 21 e 22, respectivamente. Em todas as fases, o inóculo apresentou-se com flocos esparsos e de pequenas dimensões (< 100µm). Ao longo da operação do reator, a biomassa apresentou estrutura mais compacta, em conjunto com a presença de grânulos, a partir do 15º dia de operação. Entretanto, uma falha operacional no 29º dia de operação, na Fase V, ocasionou a desintegração e desestabilização dos grânulos formados, comprometendo a eficácia do processo de aglomeração de partículas. Contudo, foi possível identificar que a adição de íons de cálcio na matriz do EPS, quando utilizado como agente aglomerador da biomassa, foi benéfica para a melhora da velocidade de sedimentação e agregação das partículas.

Estudos atribuem um sistema LGA amadurecido quando pelo menos 80% dos agregados estiverem acima de 212 µm de diâmetro (SHARMA et al., 2019). A partir dos resultados obtidos, somente a Fase IV atingiu um sistema predominantemente granular (>50%

das partículas acima de 212 μm). Contudo, tanto a adição do EPS_{ácido} (Fases III e IV) quanto do EPS_{mix} (Fase V) favoreceu a formação de grânulos.

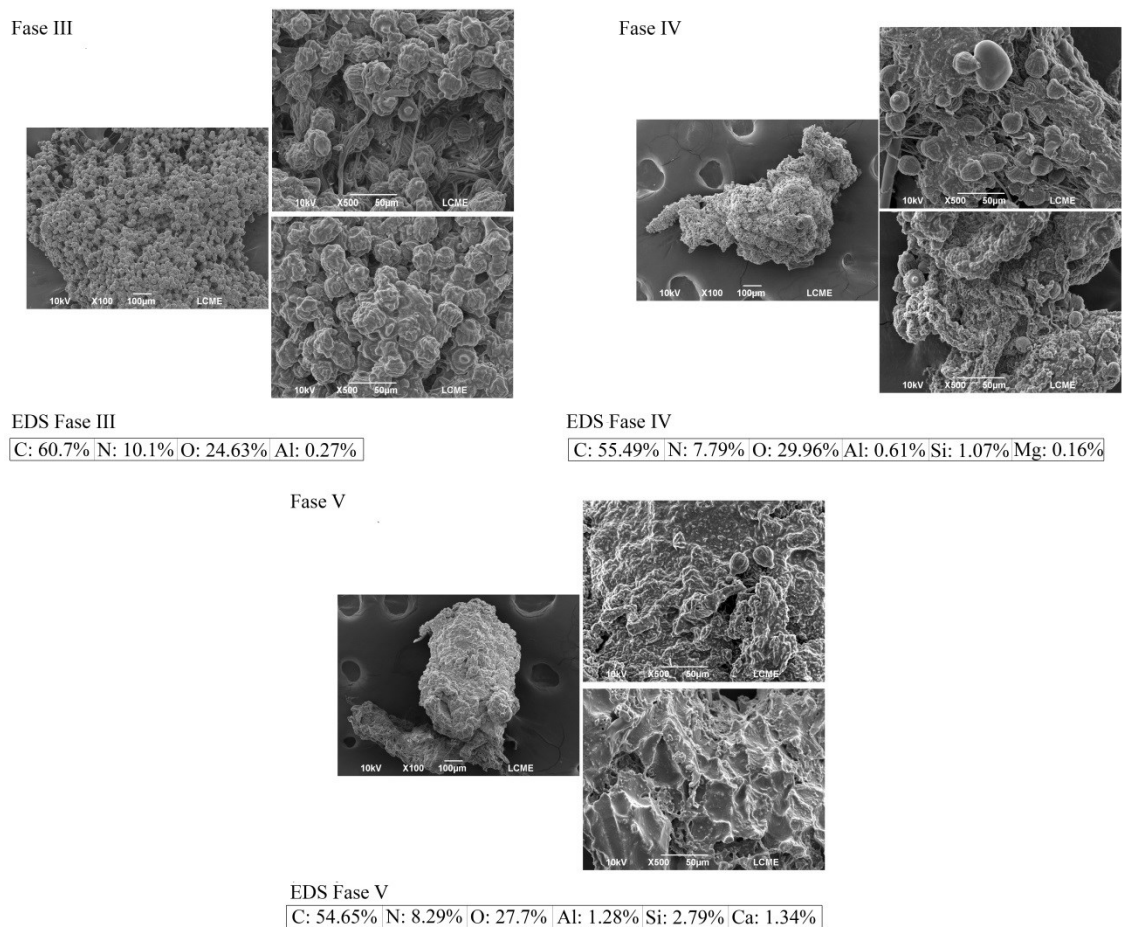
Figura 21: Fotos do desenvolvimento da biomassa granular capturadas por meio de microscopia óptica durante as três fases do estudo.



Fonte: Autor, 2021.

Nas fotos capturadas no MEV, observa-se que, os agregados identificados nas Fases III, IV e V apresentaram formato elíptico e superfície rugosa. As imagens das Fases III e IV mostraram extensiva presença de estruturas ciliadas de protozoários anexadas à superfície do grânulo. Esses organismos são reconhecidos por estarem acompanhados da presença de flocos no sistema, além de atuarem como bioindicadores da estabilidade da biomassa, eficiência de tratamento e agregação entre partículas (LI et al., 2013). Já para a Fase V, as imagens do MEV apresentaram majoritariamente organismos em formato de bastão, presentes na superfície do agregado, corroborando a mudança da comunidade microbiana relacionada com a adição dos íons de cálcio na matriz do EPS adicionado ao sistema.

Figura 22: Fotos capturadas no MEV para a biomassa nas Fases III, IV e V.



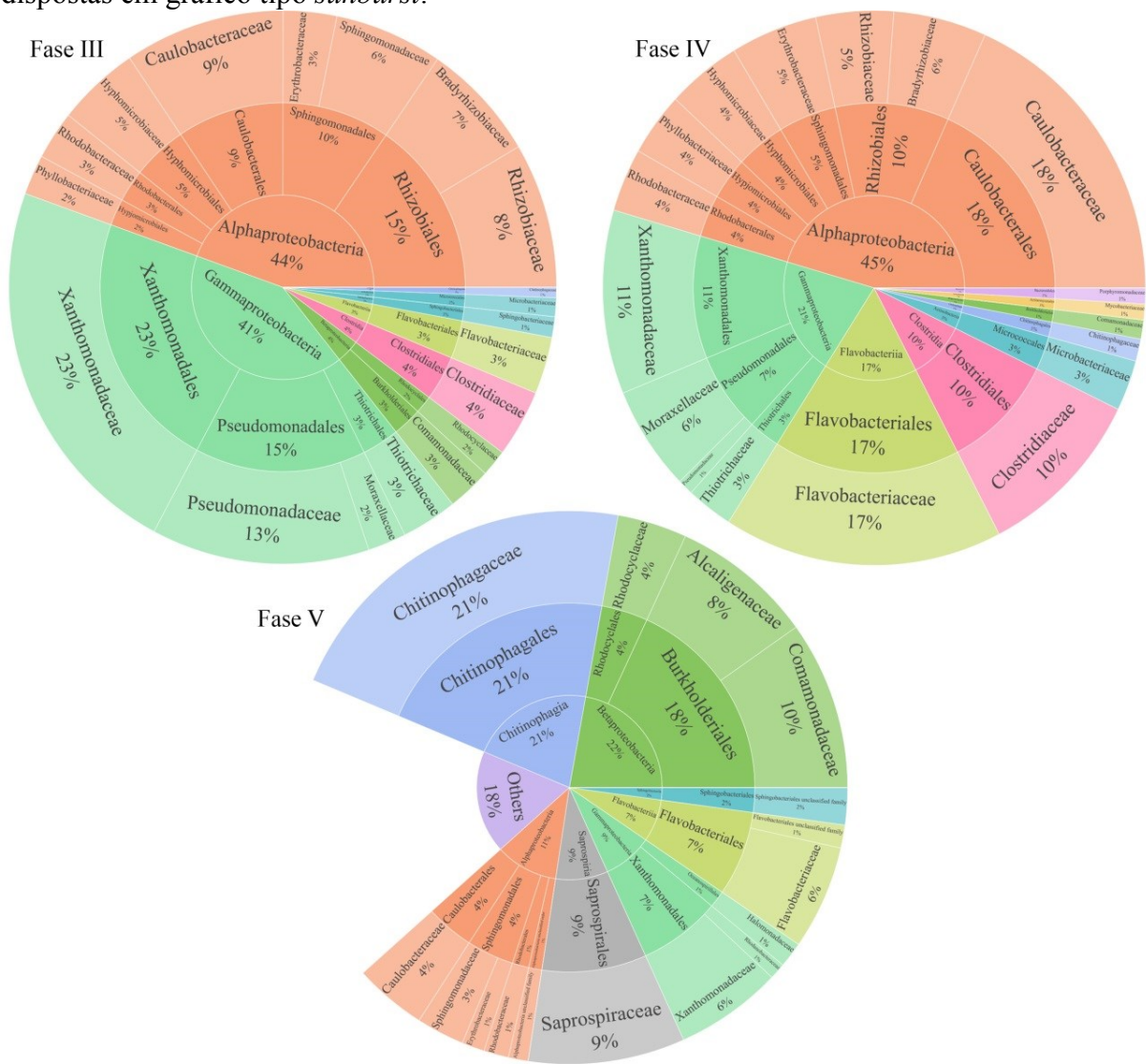
Fonte: Autor, 2021.

A análise complementar de composição elementar dos agregados apresentou similaridade entre as três etapas, destacando nas três fases 90% da composição dos grânulos correspondendo aos elementos C, N e O, além do acúmulo de cálcio durante a Fase V.

4.3.4 Análise da comunidade microbiana

A análise da comunidade microbiana foi realizada em amostras retiradas no 45º dia, o qual correspondeu ao último dia de operação das três fases operacionais. De modo a manter alta qualidade no tratamento dos dados, foram consideradas somente as sequências que contemplavam pelo menos 1% do total, representando 96,4%, 96,7% e 81,5% para as Fases III, IV e V, respectivamente. Os resultados estão apresentados na Figura 23, onde pode ser observado que as Fases III e IV apresentaram *Alphaproteobacterias* como a classe mais abundante, correspondendo a 43,89% e 47,58%, respectivamente. Já a Fase V apresentou organismos da classe *Chitinophagia* como os mais abundantes, correspondendo a 30,51%, essa mudança foi relacionada com a adição de cálcio na matriz do EPS adicionado.

Figura 23: Principais comunidades microbianas (> 1% do total) nas Fases III, IV e V, dispostas em gráfico tipo *sunburst*.



Fonte: Autor, 2021.

A Fase III apresentou as famílias *Xanthomonadaceae* (21,89%), *Pseudomonadaceae* (12,41%), *Caulobacteraceae* (9,13%) e *Rhizobiaceae* (8,17%), enquanto a Fase IV destacou *Caulobacteraceae* (17,71%), *Flavobacteriaceae* (16,10%), *Xanthomonadaceae* (10,37%) e *Clostridiaceae* (9,83%). Não obstante essa diferença, estas fases compartilharam diversas outras famílias em níveis de abundância menor.

Foi reportado que as famílias *Xanthomonadaceae* e *Caulobacteraceae* contribuem para a produção de EPS e a formação do biofilme (ABRAHAM et al., 2014; SZABÓ et al., 2017). Igualmente, a elevada abundância relativa do gênero *Pseudomonas* na Fase III (12,41%) pode estar relacionada com o processo de desnitrificação, com sua alta tolerância e o potencial de degradação de compostos orgânicos recalcitrantes (ZHENG et al., 2021a).

Todas as três fases analisadas apresentaram elevada abundância relativa de organismos identificados como desnitrificantes. Além do gênero *Pseudomonas*, a Fase III também teve

organismos dos gêneros *Clostridium* (3,7%), *Phenylobacterium* (3,7%), *Altererythrobacter* (2,87%) e *Rhizobium* (1,36%) em baixas abundâncias relativas. Na Fase IV observou-se o crescimento de organismos dos gêneros *Flavobacterium* (12,88%), *Cloacibacterium* (9,83%) e *Phenylobacterium* (10,73%) como os desnitrificantes mais abundantes.

Gêneros como *Flavobacterium* e *Cloacibacterium* foram relacionados com o processo simultâneo de nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbica, além de reportados por dependerem de outras bactérias para a realização da desnitrificação completa (LIU; ZHU, 2020). Já o gênero *Phenylobacterium* foi descrito como um organismo tolerante a halogênios e degradante de lignina (JIANG et al., 2021).

Por fim, a adição de íons de cálcio na matriz do EPS (EPS_{mix}), durante a Fase V, apresentou mudanças significativas na comunidade microbiana quando comparada às Fases III e IV. Nessa fase, observou-se a presença de organismos do gênero *Ferruginibacter* (15,2%) e das famílias *Saprospiraceae* (9,1%), *Alcaligenaceae* (8,3%) e *Chitinophagaceae* (5,01%). Os membros do gênero *Ferruginibacter* foram descritos como organismos aeróbios e heterotróficos, e podem participar da secreção do EPS no sistema (HAN et al., 2018). Já os membros das famílias *Alcaligenaceae* e *Saprospiraceae* foram reportados por participar da degradação de compostos complexos presentes no efluente (MCLLROY; NIELSEN, 2014; HERZOG et al., 2017), enquanto organismos da família *Chitinophagaceae* foram relacionados com o controle do processo de bioincrustação (ASLAM et al., 2018). Essas famílias também foram identificadas por atuarem como organismos secretores e formadores do componente estrutural do EPS, o exopolissacarídeo do tipo alginato (ALE) (SCHAMBECK et al., 2020b).

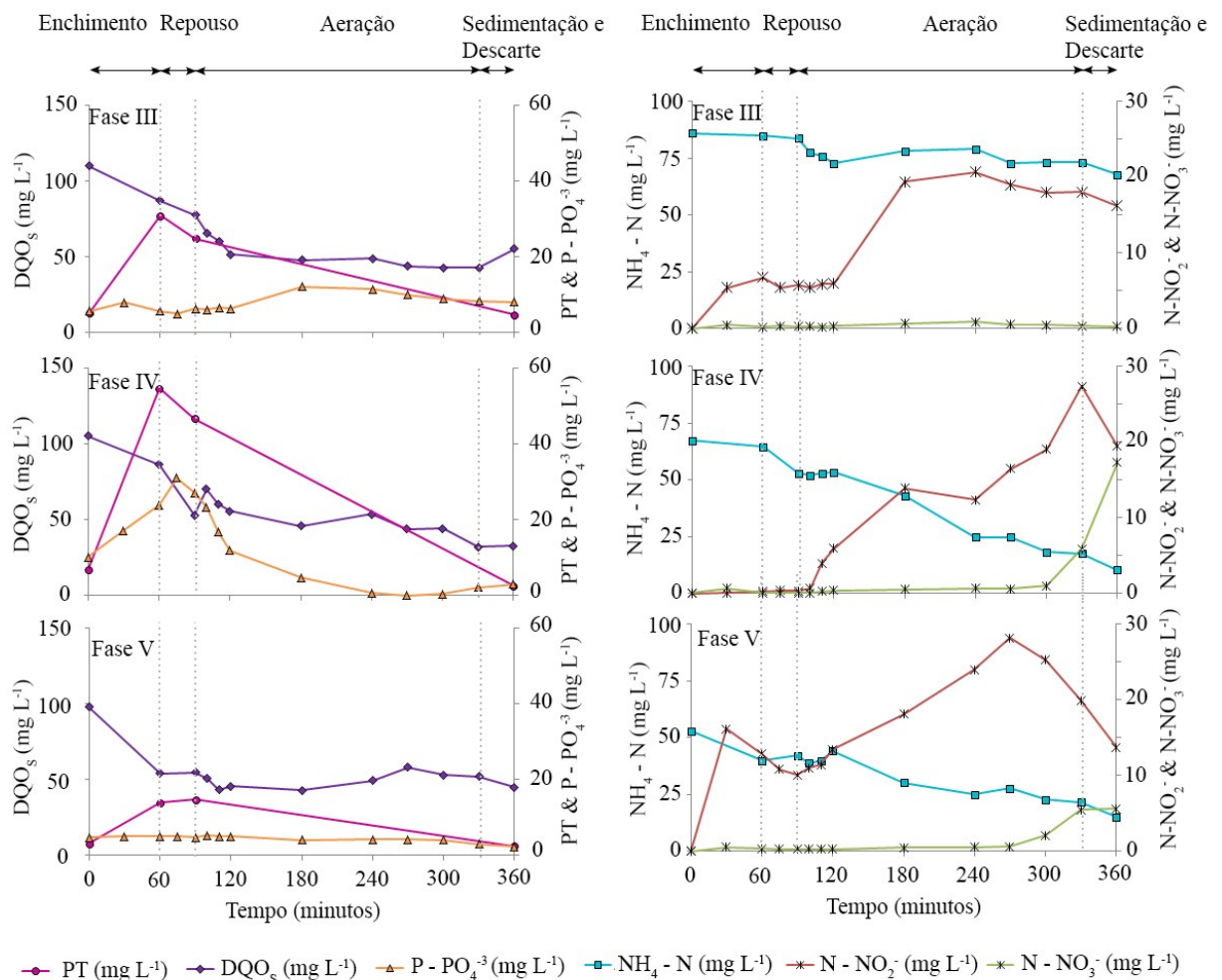
Os índices Shannon e Simpson foram aplicados para determinar a diversidade e semelhança entre os microrganismos para as três fases. Apesar das diferenças reportadas, a análise das sequências presentes apresentaram baixa diversidade e desigualdade entre os organismos para as Fases III (Shannon = 2,6; Simpson = 8,21), IV (Shannon = 2,47; Simpson = 10,51) e V (Shannon = 2,6; Simpson = 8,21). Pode-se confirmar a influência do EPS_{ácido} sobre a seleção dos microrganismos uma vez que os resultados obtidos para as Fases III e IV estão de acordo com o reportado para a Fase II. Além disso, a adição de cálcio na estrutura do EPS_{mix} também causou alteração na estrutura da comunidade microbiana da Fase V, apesar de índices de diversidade semelhantes às Fases III e IV.

4.3.5 Análise completa de um ciclo operacional

O desempenho de tratamento do reator foi monitorado em ciclos operacionais, realizados no 45º dia de operação, em todas as três fases, cujos resultados estão dispostos na Figura 24. Os experimentos ocorreram em temperaturas correspondentes ao clima subtropical e demonstraram pouca variação ao longo da operação do sistema (Fase III = 19,81 ± 0,2°C; Fase IV = 22,76 ± 0,08°C; Fase V = 23,82 ± 0,35°C). O OD esteve em níveis de saturação durante a etapa de aeração, entre 7 e 8 mg L⁻¹. O pH ficou dentro do intervalo de 6,0 a 8,0, considerado ideal para o desenvolvimento do sistema LGA. Este parâmetro está diretamente relacionado com as cargas na superfície do grânulo, e processos de adsorção de nutrientes e contaminantes presentes no efluente (SHARMA et al., 2019).

Esses três parâmetros são considerados como essenciais para a seleção de microrganismos e a formação do LGA uma vez que, o crescimento excessivo de organismos filamentosos tem sido identificado como resposta a baixos valores de pH, OD e temperatura, de modo a ocasionar o intumescimento do lodo e estrutura granular enfraquecida (FREITAS et al., 2017).

Figura 24: Perfis de parâmetros monitorados para o tratamento do efluente durante ciclos operacionais nas Fases III, IV e V.



Fonte: Autor, 2021.

O reator foi abastecido por esgoto sanitário real e de baixa concentração, que apresenta limitações para o bom desenvolvimento do LGA (XAVIER et al., 2021). Contudo, em todas as fases, foi observada remoção suficiente de carbono e nutrientes. Exceto a concentração final de amônia na Fase III, o efluente tratado atendeu o padrão de lançamento de efluentes disposto na Resolução CONAMA 430/2011.

As três fases apresentaram tendências similares no perfil de DQO₅, destacando consumo durante os primeiros 90 min e no restante da etapa de aeração. Esse comportamento foi relacionado com a habilidade de alguns organismos, como *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Xanthomonas*, em oxidar a matéria orgânica em condições anaeróbias para produzir elétrons e

transferi-los a aceptores insolúveis, de modo a proporcionar melhor sobrevivência aos organismos no sistema (CHEN et al., 2021). A presença de organismos filamentosos ou bactérias formadoras de flocos também foi associada com esse comportamento, uma vez que estes podem armazenar carbono como polihidroxibutirato (PHB) quando em um sistema operando em fortes condições de alimento-fome (*feast-famine*) (GONZALEZ-GIL; HOLLIGER, 2011).

Em contraste ao perfil do carbono, a oxidação da amônia foi singular para cada fase analisada. A Fase III apresentou nitrificação parcial da amônia, que resultou na acumulação de nitrito no sistema ($\sim 15 \text{ mg L}^{-1}$). Outros estudos, utilizando condições similares de alimentação e operação, também identificaram esse mesmo evento, indicando que as AOB prevaleceram sob as NOB em temperaturas mesofílicas e elevadas concentrações de amônia livre (GUIMARÃES et al., 2018).

Na Fase IV, observou-se oxidação da amônia para nitrito e nitrato ao final do ciclo, além da ausência de íons NO_x durante as etapas de alimentação e repouso (primeiros 90 min de operação). Estes resultados confirmam a realização do processo de nitrificação, além da desnitrificação das formas oxidadas remanescentes do ciclo anterior. No entanto, apesar da elevada abundância de organismos desnitrificantes, a Fase IV apresentou concentração elevada de nitrato ($>15 \text{ mg L}^{-1}$) no final do ciclo, que pode estar relacionada ao tamanho dos grânulos, onde as espessuras das camadas interiores, anóxicas e anaeróbias, não são suficientes para a realização do processo (FRANCA et al., 2018).

A adição dos íons de cálcio no EPS na Fase V demonstrou-se benéfica para a oxidação da amônia. A partir do perfil obtido, foi observado que esta ocorreu em duas etapas: nitritação e nitratação, já que foi identificada redução de nitrito durante as fase de aeração e sedimentação, além de baixa concentração residual de nitrato no efluente ($<7 \text{ mg L}^{-1}$).

Os perfis de fósforo apresentaram pouca remoção desse nutriente ao final dos ciclos. Isto pode ter acontecido devido às baixas concentrações de fósforo no efluente, às elevadas temperaturas para o desenvolvimento de organismos de interesse (PAO), ou até por aceptores de elétrons em excesso, como O_2 e NO_x , durante a operação (DUQUE et al., 2021).

Mesmo assim, na Fase IV verifica-se que houve a liberação de íons PO_4^{-3} durante a fase anaeróbia do ciclo, após o enchimento, que foi relacionada com a presença de organismos como *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, os quais são considerados como PAO putativos (BUNCE et al., 2018).

5. DISCUSSÃO INTEGRADA

O presente estudo avaliou a aplicação de biopolímeros naturais: alginato de sódio e EPS extraído de LGA, como agentes de aglomeração da biomassa em cinco fases operacionais. A Tabela 9 descreve de forma resumida os resultados integrados obtidos.

Tabela 9: Tabela resumo apresentando os resultados obtidos no presente trabalho.

Fase	Biopolímero	Conclusão
Fase I	Alginato de sódio	Aglomeração entre partículas ocasionada pela interação dos grupos tipo 'G' da matriz do alginato com os cátions disponíveis
		PS influenciado pelo biopolímero
		Organismos predominantes: - <i>Comamonadaceae</i> - <i>Saprospiraceae</i> - <i>Chitinophagaceae</i>
Fase II Fase III Fase IV	EPS _{ácido}	pH ácido adotado para o biopolímero por influenciar na conformação da matriz EPS, proporcionando maior adesão
		Adesão das partículas ocasionada pelo aumento na produção de PN e PS pelos microrganismos
		Secreção predominante de PN a PS
		Organismos predominantes: - Organismos tolerantes - Desnitrificantes - Produtores da enzima lacase - Degradadores de compostos tóxicos
Fase V	EPS _{mix}	Adição de cálcio proporcionou melhora na velocidade de sedimentação da biomassa
		Adição de cálcio não

		interferiu na assimilação do EPS pelos microrganismos
		Adesão entre as partículas ocasionada pelo aumento na secreção de PN e PS pelos microrganismos
		Organismos predominantes: - <i>Saprosiraceae</i> - <i>Alcaligenaceae</i> - <i>Ferruginibacter</i>

Fonte: Autor, 2021.

As Fases I e II tiveram como objetivo promover uma melhor compreensão sobre o potencial do EPS como um aditivo para a granulação aeróbia, em longo período de operação do reator (> 100 dias). Para tal, foi efetuada na Fase I a aplicação de alginato de sódio, um biopolímero já estabelecido e reconhecido por suas propriedades de formar hidrogel, semelhantes ao EPS secretado pelos microrganismos. Esse aditivo demonstrou elevado potencial na aglomeração entre as partículas, atribuído à interação entre os grupos tipo ‘G’ da matriz do alginato com os cátions disponíveis, reduzindo as cargas repulsivas presentes nas partículas em suspensão. Na sequência, na Fase II foi aplicado o EPS como agente flocculante, comparando com os resultados obtidos para o alginato de sódio. Os resultados confirmaram que o EPS também favoreceu a formação de grânulos, contudo atuou de forma contrária ao alginato de sódio, promovendo uma adesão entre as partículas em suspensão menos intensa e uma maior produção de proteínas e polissacarídeos pelos microrganismos.

As Fases III, IV e V visaram melhor conhecimento da eficiência do EPS como agente aglomerador de partículas, a partir de análises complementares de caracterização da biomassa, como densidade, coeficiente de integridade e velocidade de sedimentação. Foram estudadas diferentes condições operacionais tanto de concentração inicial de biomassa (1 e 3 g L⁻¹), quanto de concentração do EPS e modo de aplicação no reator (EPS_{ácido} e EPS_{mix}), em um tempo curto de funcionamento do sistema (45 dias). Ressaltando-se que na Fase V foi estudada a aplicação de íons de cálcio na matriz EPS, que são reconhecidos por proporcionar maior adesão entre as partículas e consequentemente melhorar a sedimentação da biomassa (BARROS et al., 2020). Diversos estudos indicaram que a interação entre cátions multi/divalentes, como o cálcio, e os compostos e grupos funcionais presentes na matriz EPS resultariam em uma estrutura tipo gel mais estável e resistente (FELZ et al., 2020).

Foi possível identificar por meio dos testes de jarros que o EPS quando aplicado sob condições ácidas (Fases III e IV) proporcionava uma melhor adesão entre as partículas. Mas, quando da adição dos íons de cálcio, o pH alcalino foi mais eficiente (Fase V).

As três fases em questão mostraram resultados similares entre si em termos de sedimentabilidade e características dos grânulos formados, e remoção de nutrientes. Nas Fases III e IV ocorreu perda de biomassa durante o período de aclimação, indicando que o bioflocculante agiu de forma contínua e gradativa ao invés da aglomeração imediata entre as partículas. A adição de íons de cálcio (Fase V) mostrou-se positiva uma vez que resultou em

maiores velocidades de sedimentação, maior densidade dos agregados quando comparado com as fases anteriores, além da remoção adequada de nutrientes.

A quantificação das proteínas, substâncias húmicas, açúcares neutros e urônicos, nas Fases III, IV e V, demonstraram aumento significativo, quando comparados com seus respectivos inóculo, evidenciando que o EPS adicionado como biofloculante foi assimilado e convertido em uma nova matriz EPS pelos microrganismos presentes na biomassa. Diversos estudos relatam sobre a quantificação indevida desses compostos a partir da interferência entre eles, decorrente das análises colorimétricas (SCHAMBECK et al., 2020b; RONDEL et al., 2013). Com isso, os resultados das Fases III, IV e V resultaram em concentrações contrastantes aos das Fases I e II, sendo identificada a subestimação de PN e superestimação de PS. No entanto, a tendência apresentada nessas duas fases foi similar à identificada nas Fases III, IV e V. Igualmente, observaram-se semelhanças entre as concentrações de PN, substâncias húmicas, açúcares neutros e urônicos nas três últimas fases, indicando que a adição de cálcio na Fase V não interferiu na assimilação do EPS adicionado como biofloculante.

A análise das comunidades microbianas apresentou resultados contrastantes entre as fases, sendo caracterizadas por três diferentes comunidades. A Fase I apresentou organismos das famílias *Comamonadaceae*, *Saprospiraceae* e *Chitinophagaceae*. Nas Fases II, III e IV destacaram-se organismos tolerantes, desnitrificantes, produtores da enzima lacase e degradadores de compostos tóxicos. Algumas famílias em destaque nessas três fases corresponderam aos membros da *Phyllobacteriaceae*, *Clostridaceae*, *Rhizobiaceae*, e *Caulobacteraceae*. A adição de cálcio na Fase V resultou na alteração da biota, destacando membros das famílias *Saprospiraceae* e *Alcaligenaceae*, e do gênero *Ferruginibacter*, onde o primeiro e o segundo foram relacionados com a degradação de compostos complexos no efluente e o terceiro por participar da secreção do EPS.

Considerando todos os resultados, concluiu-se que a adição dos biopolímeros testados foi benéfica para a aceleração e manutenção da granulação aeróbia em um RBSG, alimentado por um efluente de baixa concentração, não interferindo no processo de remoção de matéria orgânica e nutrientes. O EPS extraído de LGA pode atuar como um bioproduto obtido do lodo excedente do processo de tratamento de efluentes, incluindo as ETE na concepção de uma biorrefinaria.

6. CONCLUSÃO

A partir dos objetivos gerais e específicos definidos para esse trabalho, acerca da aplicação de biopolímeros como o alginato de sódio e as substâncias poliméricas extracelulares em um RGSB, alimentado com efluente sanitário de baixa concentração, têm-se que:

1. A aplicação de alginato de sódio, por suas propriedades formadoras de gel e de neutralização de cargas das superfícies das partículas em suspensão, foi benéfica para a aglomeração das partículas de forma imediata, destacando concentrações superiores de PS em relação à PN; elevada concentração da biomassa ($2,9 \pm 0,45$ gSST L⁻¹) formada por 50% de grânulos com diâmetro superior a 212 µm, a partir do 37º dia de operação; e boa sedimentabilidade (IVL₃₀ = 68 ± 11 mL g⁻¹). Os organismos encontrados nessa fase corresponderam àqueles geralmente observados em reatores alimentados por esgoto sanitário real de baixa concentração.
2. A aplicação de EPS (Fases II, III, IV e V) apresentou resultados diferentes aos obtidos para o alginato de sódio. Na Fase II, os grânulos apresentaram diâmetro superior a 212 µm acima de 50% a partir do dia 44, com concentração de biomassa de $1,3 \pm 0,3$ gSST L⁻¹ de boa sedimentabilidade (IVL₃₀ = 78 ± 21 mL g⁻¹). O efeito do EPS como agente aglomerador foi relacionado à sua assimilação pelos microrganismos, a partir da disponibilidade de diversos componentes com pesos moleculares variados para assimilação pelos microrganismos presentes no inóculo, facilitando e aumentando a produção do biopolímero durante a operação do sistema. As proteínas foram a componente principal da matriz EPS secretada pelos organismos, proporcionando uma maior aglomeração entre as partículas. Houve seleção de microrganismos específicos, tais como os degradadores de compostos tóxicos, incomuns em um sistema LGA alimentado por um efluente sanitário de baixa concentração.
3. A análise de variância dos resultados entre as Fases III, IV e V não apresentou diferenças significativas para as características da biomassa, exceto na velocidade de sedimentação e densidade, quando sob influência do biopolímero contendo os íons de cálcio (Fase V), confirmando que sua aplicação na estrutura do EPS foi positiva.
4. O desempenho de tratamento do efluente em todas as fases do experimento não foi afetado pela adição dos biopolímeros. As eficiências de remoção ficaram entre 70 e 80% de DQO_S; 50 e 60% de NH₄-N; e 10-31% de PT.

Conclui-se que os biopolímeros naturais como o alginato de sódio e as substâncias poliméricas extracelulares (EPS) auxiliam no processo de formação e manutenção dos grânulos aeróbios, cultivados em um reator em bateladas sequenciais granular, alimentado por um efluente de baixa concentração, sem prejudicar a eficiência de tratamento do sistema.

7. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos na utilização do EPS como um agente facilitador da granulação aeróbia, seguem algumas recomendações para trabalhos futuros:

- Avaliar diferentes formulações de EPS com outros componentes (como cátions metálicos) e seu efeito de floculação sobre a biomassa, em comparação com outros coagulantes/aditivos.
- Avaliar os efeitos da adição do EPS sobre processos aeróbios de biomassa suspensa (lodo ativado) em relação à formação e estabilização do floco biológico.
- Explorar o potencial do EPS extraído de lodo biológico (aeróbio e anaeróbio) como um facilitador da granulação aeróbia, devido à sua ampla disponibilidade.
- Explorar o potencial da matriz de EPS extraído de lodo residual para remoção de nutrientes e poluentes de efluentes.

8. REFERÊNCIAS

- ADAV, S. S. et al. Aerobic granular sludge: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 411–423, 2008.
- AJAO, V. et al. Natural flocculants from fresh and saline wastewater: Comparative properties and flocculation performances. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, n. May, p. 622–632, 2018.
- AJAO, V. et al. Bioflocculants from wastewater: Insights into adsorption affinity, flocculation mechanisms and mixed particle flocculation based on biopolymer size-fractionation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 581, p. 533–544, 2021.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater**. 23rd. ed. [s.l: s.n.].
- ARTAN, N.; ORHON, D. Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal. v. 19, p. 99, 2005.
- ASLAM, M.; AHMAD, R.; KIM, J. Recent developments in biofouling control in membrane bioreactors for domestic wastewater treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 206, n. February, p. 297–315, 2018.
- BARROS, A. R. M. et al. Effect of calcium addition to aerobic granular sludge systems under high (conventional SBR) and low (simultaneous fill/draw SBR) selection pressure. **Environmental Research**, v. 194, n. August 2020, 2021.
- BEUN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. **Water Research**, v. 36, n. 3, p. 702–712, 2002.
- BUNCE, J. T. et al. A review of phosphorus removal technologies and their applicability to small-scale domestic wastewater treatment systems. **Frontiers in Environmental Science**, v. 6, n. FEB, p. 1–15, 2018.
- CAI, F. et al. A review of aerobic granular sludge (AGS) treating recalcitrant wastewater: Refractory organics removal mechanism, application and prospect. **Science of the Total Environment**, v. 782, p. 146852, 2021.
- CAI, W. et al. Influence of ferrous iron dosing strategy on aerobic granulation of activated sludge and bioavailability of phosphorus accumulated in granules. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 7–14, 2018.
- CAMPO, R. et al. The role of extracellular polymeric substances on aerobic granulation with stepwise increase of salinity. **Separation and Purification Technology**, v. 195, n. August 2017, p. 12–20, 2018.

CAMPO, R. et al. Efficient carbon, nitrogen and phosphorus removal from low C/N real domestic wastewater with aerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, v. 305, p. 122961, 2020.

CARRERA, P. et al. Pulsed aeration enhances aerobic granular biomass properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 149, 2019.

CHEN, Z. et al. Linking Exoproteome Function and Structure to Anammox Biofilm Development. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 1490–1500, 2019.

CZARNOTA, J.; MASŁOŃ, A.; ZDEB, M. Powdered keramsite as unconventional method of AGS technology support in GSBR reactor with minimum-optimum OLR. **E3S Web of Conferences**, v. 44, 2018.

DA COSTA, N. P. A. V. et al. Impact of additive application on the establishment of fast and stable aerobic granulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 13, p. 5697–5709, 2020.

DALL'AGNOL, P. et al. A comparative study of phosphorus removal using biopolymer from aerobic granular sludge: A factorial experimental evaluation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 2, p. 103541, 2020.

DALL'AGNOL, P. et al. Biosorption of Phosphorus Using Alginate-Like Exopolymers: Investigation of Removal Mechanism, Kinetic and Thermodynamic Properties. **Journal of Polymers and the Environment**, n. 0123456789, 2021.

DE GRAAFF, D. R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; PRONK, M. Stable granulation of seawater-adapted aerobic granular sludge with filamentous *Thiothrix* bacteria. **Water Research**, v. 175, p. 115683, 2020.

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. Formation of aerobic granules with domestic sewage. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, n. 6, p. 694–697, 2006.

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.

DEVIRIMCI, H. A.; YUKSEL, A. M.; SANIN, F. D. Algal alginate: A potential coagulant for drinking water treatment. **Desalination**, v. 299, p. 16–21, 2012.

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, 2015.

DOMINGOS, D. G. **Uso de alginato e Np-magnetita para agregação de lodo biológico no tratamento de esgoto sanitário**. Dissertação de Mestrado, Engenharia Ambiental, UFSC, 2019.

DOMINGOS, D. G. et al. The effect of Np-magnetite on the granulation process of an SBR reactor used for domestic wastewater treatment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 1, p. 161–171, 2020.

DRAGET, K. I.; TAYLOR, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 251–256, 2011.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. v. 28, n. 3, 1956.

DUQUE, A. F. et al. Simultaneous nitrification and phosphate removal by bioaugmented aerobic granules treating a fluoroorganic compound. **Water Science and Technology**, p. 1–10, 2021.

ESHERDEN, M. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. **Water Environment Research**, v. 31, n. 12, p. 3191–3194, 1997.

ESPARZA-SOTO, M.; WESTERHOFF, P. K. Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 87–95, 2001.

FELZ, S. et al. Extraction of structural extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2016, n. 115, p. 1–8, 2016.

FENG, C. et al. Extracellular biopolymers recovered as raw biomaterials from waste granular sludge and potential applications: A critical review. **Science of the Total Environment**, v. 753, p. 142051, 2021.

FERREIRA, T. J. et al. Integrated review of resource recovery on aerobic granular sludge systems: Possibilities and challenges for the application of the biorefinery concept. **Journal of Environmental Management**, v. 291, n. April, 2021.

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.

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, n. PartB, p. 1674–1683, 2017.

FROLUND, B.; GRIEBE, T.; NIELSEN, P. H. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 755–761, 1995.

FU, X. et al. Enhanced butyrate production by transition metal particles during the food waste fermentation. **Bioresource Technology**, v. 291, n. July, p. 121848, 2019.

GAO, B.; YUE, Q. Effect of $\text{SO}_4^{2-}/\text{Al}^{3+}$ ratio and $\text{O}^-/\text{Al}^{3+}$ value on the characterization of coagulant poly-aluminum-chloride-sulfate (PACS) and its coagulation performance in water treatment. **Chemosphere**, v. 61, n. 4, p. 579–584, 2005.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1–14, 2006.

GHOSH, S.; CHAKRABORTY, S. Aerobic granulation of single strain oil degraders: Salt tolerance enhancing organics and nitrogen removal from high-strength refinery wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 42, n. February, p. 102104, 2021.

GONZALEZ-GIL, G.; HOLLIGER, C. Dynamics of microbial community structure of and enhanced biological phosphorus removal by aerobic granules cultivated on propionate or acetate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 8041–8051, 2011.

GUIMARÃES, Lorena Bittencourt. **Caracterização microbiológica do lodo granular na remoção de nutrientes e potencial de recuperação de exopolímeros de efluentes reatores em bateladas sequenciais**. 2017. 261 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis', 2017.

GUIMARÃES, L. B. et al. Elucidating performance failures in use of granular sludge for nutrient removal from domestic wastewater in a warm coastal climate region. **Environmental Technology** (United Kingdom), v. 41, n. 15, p. 1896–1911, 2020.

GUO, H. et al. Structural extracellular polymeric substances determine the difference in digestibility between waste activated sludge and aerobic granules. **Water Research**, v. 181, n. May, p. 115924, 2020.

HALIM, M. H. A. et al. Development of Aerobic Granules in Sequencing Batch Reactor System for Treating High Temperature Domestic Wastewater. **Jurnal Teknologi**, p. 57–66, 2019.

HAMZA, R. A. et al. Impact of food-to-microorganisms ratio on the stability of aerobic granular sludge treating high-strength organic wastewater. **Water Research**, v. 147, p. 287–298, 2018.

HAN, S. et al. Nitrite-oxidizing bacteria community composition and diversity are influenced by fertilizer regimes, but are independent of the soil aggregate in acidic subtropical red soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–12, 2018.

HAY, I. D. et al. Microbial alginate production, modification and its applications. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 637–650, 2013.

HE, Q. L. et al. Enhanced formation of aerobic granular sludge with yellow earth as nucleating agent in a sequencing batch reactor. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 39, n. 1, 2016.

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

HERZOG, B. et al. Profiling 5-tolyltriazole biodegrading sludge communities using next-generation sequencing and denaturing gradient gel electrophoresis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 508–515, 2017.

HOU, M. et al. Performance and bacterial characteristics of aerobic granular sludge in response to alternating salinity. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 142, n. January, p. 211–217, 2019.

HUANG, J. et al. The role of quorum sensing in granular sludge: Impact and future application: A review. **Chemosphere**, v. 236, p. 124310, 2019.

Jl, Y. et al. Enhancement of biological treatment of wastewater by magnetic field. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8535–8540, 2010.

JIANG, Z. et al. Impacts of red mud on lignin depolymerization and humic substance formation mediated by laccase-producing bacterial community during composting. **Journal of Hazardous Materials**, v. 410, n. November 2020, p. 124557, 2021.

JORDAO, E. P.; PESSOA, C. A. Tratamento de Esgotos Domésticos. v. 4, p. 906, 2005.

JUNGLES, M. K.. **Desenvolvimento de grânulos aeróbios no tratamento de esgoto sanitário em reatores operados em bateladas sequenciais (RBS)**. 2011. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis', 2011.

JUNGLES, M. K. et al. Effects of inoculum type and aeration flowrate on the performance of aerobic granular SBRS. **Processes**, v. 5, n. 3, 2017.

KEHREIN, P. et al. A critical review of resource recovery from municipal wastewater treatment plants-market supply potentials, technologies and bottlenecks. **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 6, n. 4, p. 877–910, 2020.

LADNORG, S. et al. Alginate-like exopolysaccharide extracted from aerobic granular sludge as biosorbent for methylene blue: Thermodynamic, kinetic and isotherm studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, 2019.

LAGUNA, A. et al. A simple and low cost technique for determining the granulometry of upflow anaerobic sludge blanket reactor sludge. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 1–8, 1999.

LARSEN, P. et al. Amyloid-like adhesions produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1517–1526, 2008.

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.

LEMAIRE, R. et al. Microbial distribution of *Accumulibacter* spp. and *Competibacter* spp. in aerobic granules from a lab-scale biological nutrient removal system. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 354–363, 2008.

LERTSRIWONG, S.; GLINWONG, C. Newly-isolated hydrogen-producing bacteria and biohydrogen production by *Bacillus coagulans* MO11 and *Clostridium beijerinckii* CN on molasses and agricultural wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 51, p. 26812–26821, 2020.

LI, A. J. et al. 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, D. et al. Performance and operational strategy of simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal system under the condition of low organic loading rate in wet weather. **Chemosphere**, v. 270, p. 129464, 2021.

LI, J. et al. Aerobic granules dwelling vorticella and rotifers in an SBR fed with domestic wastewater. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 127–131, 2013.

LI, X. M. et al. Enhanced aerobic sludge granulation in sequencing batch reactor by Mg²⁺ augmentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 64–67, 2009.

LI, Z. et al. Understanding the role of extracellular polymeric substances in the rheological properties of aerobic granular sludge. **Science of the Total Environment**, v. 705, n. 2005, p. 135948, 2020.

LIANG, Z. et al. Formation, extracellular polymeric substances and microbial community of aerobic granules enhanced by microbial flocculant compared with poly-aluminum chloride. **Journal of Cleaner Production**, v. 220, p. 544–552, 2019.

LIBARDI, N. et al. A non-waste strategy for enzymatic hydrolysis of cellulose recovered from domestic wastewater. **Environmental Technology** (United Kingdom), n. 0, p. 1–22, 2020.

LIN, H. et al. Reviewing bottlenecks in aerobic granular sludge technology: Slow granulation and low granular stability. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114638, 2020.

LINLIN, H. et al. The formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactor (SBR) by seeding anaerobic granules. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 5–11, 2005.

LIU, A. et al. Phenanthrene desorption from soil in the presence of bacterial extracellular polymer: Observations and model predictions of dynamic behavior. **Water Research**, v. 35, n. 3, p. 835–843, 2001.

LIU, S. et al. Rapid cultivation of aerobic granular sludge by xanthan gum in SBR reactors. **Water Science and Technology**, n. 2, p. 360–369, 2017.

LIU, X. et al. Investigation of extracellular polymeric substances (EPS) in four types of sludge: Factors influencing EPS properties and sludge granulation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, n. December 2020, p. 101924, 2021.

LIU, X. M. et al. Contribution of extracellular polymeric substances (EPS) to the sludge aggregation. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 11, p. 4355–4360, 2010.

LIU, X.; ZHU, H. Treatment of low C/N ratio wastewater by a carbon cloth bipolar plate multicompartiment electroenhanced bioreactor (CBM-EEB). **ACS Omega**, v. 5, n. 43, p. 27823–27832, 2020.

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

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

LIU, Z. et al. Study on the process of aerobic granule sludge rapid formation by using the poly aluminum chloride (PAC). **Chemical Engineering Journal**, v. 250, p. 319–325, 2014.

LIU, Z. et al. Poly aluminum chloride (PAC) enhanced formation of aerobic granules: Coupling process between physicochemical-biochemical effects. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 1127–1135, 2016.

LOCHMATTER, S.; MAILLARD, J.; HOLLIGER, C. Nitrogen removal over nitrite by aeration control in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 7, p. 6955–6978, 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. Department of Pharmacology, Washington University, 1951.

LYU, Y. et al. New insights into interaction of proteins in extracellular polymeric substances of activated sludge with ciprofloxacin using quartz crystal microbalance with dissipation. **Chemosphere**, v. 263, p. 128044, 2021.

MAGNUS, B. S.. **Efeito da configuração de ciclo e rotas metabólicas na produção e emissão de óxido nitroso em reator em bateladas sequenciais com lodo granular**. 2019. 162 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis', 2019.

- MCCARTY, P. L.; BAE, J.; KIM, J. Domestic wastewater treatment as a net energy producer-can this be achieved? **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 17, p. 7100–7106, 2011.
- MCLLROY, S. J.; NIELSEN, P. H. The family Saprospiraceae. In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014.
- METCALF; EDDY. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 2003.
- MISHIMA, K.; NAKAMURA, M. Self-immobilization of aerobic activated sludge - A pilot study of the Aerobic Upflow Sludge Blanket Process in municipal sewage treatment. **Water Science and Technology**, v. 23, n. 4–6, p. 981–990, 1991.
- MOHAMMED, J. N.; DAGANG, W. R. Z. W. Role of Cationization in Biofloculant Efficiency: a Review. **Environmental Processes**, v. 6, n. 2, p. 355–376, 2019.
- MORAIS, I. L. H. et al. Structural stabilization of granular sludge by addition of calcium ions into aerobic bioreactors. **BioResources**, v. 13, n. 1, p. 176–191, 2018.
- NANCHARAI AH, Y. V.; KIRAN KUMAR REDDY, G. Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 1128–1143, 2018.
- NOR-ANUAR, A. et al. Strength characteristics of aerobic granular sludge. **Water Science and Technology**, v. 65, n. 2, p. 309–316, 2012.
- NOUHA, K. et al. Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 66, p. 225–245, 2018.
- PFAFF, N. M. et al. Formation and ripening of alginate-like exopolymer gel layers during and after membrane filtration. **Water Research**, v. 195, p. 116959, 2021.
- 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. Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment. **Water Research**, v. 84, p. 207–217, 2015.
- PRONK, M. et al. The acid soluble extracellular polymeric substance of aerobic granular sludge dominated by *Deffluviococcus* sp. **Water Research**, v. 122, p. 148–158, 2017.
- PURBA, L. D. A. et al. Various applications of aerobic granular sludge: A review. **Environmental Technology and Innovation**, v. 20, 2020.
- REN, X. et al. The influence of Fe²⁺, Fe³⁺ and magnet powder (Fe₃O₄) on aerobic granulation and their mechanisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, n. July, p. 1–11, 2018.

- ROLLEMBERG, S. L. et al. Aerobic granular sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 270, n. July, p. 678–688, 2018.
- RONDEL, C.; MARCATO-ROMAIN, C. E.; GIRBAL-NEUHAUSER, E. Development and validation of a colorimetric assay for simultaneous quantification of neutral and uronic sugars. **Water Research**, v. 47, n. 8, p. 2901–2908, 2013.
- ROSENBERG, E. The Family Chitinophagaceae. In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014.
- SALAMA, Y. et al. Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 35, p. 16220–16237, 2016.
- SAM, S. B.; DULEKGURGEN, E. Characterization of exopolysaccharides from floccular and aerobic granular activated sludge as alginate-like-exoPS. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 6, p. 2534–2545, 2016.
- SARMA, S. J.; TAY, J. H.; CHU, A. Finding Knowledge Gaps in Aerobic Granulation Technology. **Trends in Biotechnology**, 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, 2020a.
- SCHAMBECK, C. M. et al. Chemical and physical properties of alginate-like exopolymers of aerobic granules and flocs produced from different wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 312, n. May, p. 123632, 2020b.
- SEVIOUR, T. et al. Gel-forming exopolysaccharides explain basic differences between structures of aerobic sludge granules and floccular sludges. **Water Research**, v. 43, n. 18, p. 4469–4478, 2009.
- SEVIOUR, T. et al. Structural determination of a key exopolysaccharide in mixed culture aerobic sludge granules using NMR spectroscopy. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 23, p. 8964–8970, 2010.
- SEVIOUR, T. et al. Aerobic sludge granulation: A tale of two polysaccharides? **Water Research**, v. 46, n. 15, p. 4803–4813, 2012.
- SEVIOUR, T. et al. Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis. **Water Research**, v. 151, p. 1–7, 2019.
- SGUANCI, S. et al. Long-term stability of aerobic granular sludge for the treatment of very low-strength real domestic wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 222, p. 882–890, 2019.

- SHARMA, S.; SARMA, S. J.; TAY, J. H. Aerobic granulation in wastewater treatment: A general overview. **Microbial Wastewater Treatment**, p. 57–81, 2019.
- 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.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 2005.
- SIMPSON, N. E. et al. The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated β TC3 cells. **Biomaterials**, v. 25, n. 13, p. 2603–2610, 2004.
- SNIS, S. N. D. I. S. S. Diagnóstico dos Serviços de água e esgotos. 2018.
- SPERLING, M. VON; CHERNICHARO, C. A. DE. Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions. **IWA Publishing**, p. 1–856, 2005.
- SUN, C.; GUNASEKARAN, S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 165–174, 2009.
- SUN, C.; ZHAN, H.; WANG, L. Enhanced Aerobic Sludge Granulation by Seeding Concentrated Activated Sludge with Ca-Alginate Gel. **Water Environment Research**, v. 89, n. 12, p. 2078–2087, 2017.
- SZABÓ, E. et al. Microbial population dynamics and ecosystem functions of anoxic/aerobic granular sludge in sequencing batch reactors operated at different organic loading rates. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–14, 2017.
- TANG, L. et al. Effect of extracellular polymeric substances on the phosphorus adsorption characteristics of sediment particles. **International Journal of Sediment Research**, n. March, p. 1–9, 2021.
- TOMSKA, A.; WOLNY, L. Enhancement of biological wastewater treatment by magnetic field exposure. **Desalination**, v. 222, n. 1–3, p. 368–373, 2008.
- VAN DER HOEK, J. P.; DE FOUIJ, H.; STRUKER, A. Wastewater as a resource: Strategies to recover resources from Amsterdam's wastewater. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 113, p. 53–64, 2016.
- VAN DER ROEST, H. et al. Recovery and reuse of alginate from granular Nereda sludge. **Water21 magazine**, v. 21, p. 48, 2015.
- VAN LOOSDRECHT, M. C. M. et al. Experimental Methods in Wastewater Treatment. [s.l.] **IWA Publishing**, 2016.

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.

WAGNER, J. **Processo de granulação aeróbia em reatores em bateladas sequenciais em condições de baixa carga orgânica**. 2015. 191 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

WAGNER, J. et al. Aerobic granular sludge technology and nitrogen removal for domestic wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 71, n. 7, p. 1040–1046, 2015.

WANG, B. BIN et al. Composition and functional group characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in activated sludge: the impacts of polymerization degree of proteinaceous substrates. **Water Research**, v. 129, p. 133–142, 2018.

WANG, L. et al. Enhanced aerobic granulation by inoculating dewatered activated sludge under short settling time in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 286, n. 1, 2019.

WANG, X. H. et al. Enhanced aerobic nitrifying granulation by static magnetic field. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 105–110, 2012.

WEI, L. et al. Adsorption behaviors of Cu²⁺, Zn²⁺ and Cd²⁺ onto proteins, humic acid, and polysaccharides extracted from sludge EPS: Sorption properties and mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 291, n. July, p. 121868, 2019.

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.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function.

WINKLER, M. K. H. et al. Temperature and salt effects on settling velocity in granular sludge technology. **Water Research**, v. 46, n. 12, p. 3897–3902, 2012.

WINKLER, M. K. H. et al. Factors influencing the density of aerobic granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7459–7468, 2013.

WINKLER, M. K. H. et al. An integrative review of granular sludge for the biological removal of nutrients and recalcitrant organic matter from wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 336, n. July 2017, p. 489–502, 2018.

WU, D. et al. Optimization of F/M ratio for stability of aerobic granular process via quantitative sludge discharge. **Bioresource Technology**, v. 252, n. 866, p. 150–156, 2018.

XAVIER, J. A.. **Granulação e estabilidade de lodo granular aeróbio desenvolvido em reatores em bateladas sequenciais operados em diferentes condições operacionais**. 2021.

169 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis', 2021.

XAVIER, J. A. et al. 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, n. August 2020, 2021.

YU, G. H.; HE, P. J.; SHAO, L. M. Characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) fractions from excess sludges and their effects on bioflocculability. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3193–3198, 2009.

ZHANG, L. et al. Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 551–557, 2007.

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

ZHANG, S. et al. Effect of static magnetic field on growth of *Escherichia coli* and relative response model of series piezoelectric quartz crystal. **Analyst**, v. 127, n. 3, p. 373–377, 2002.

ZHANG, Y. et al. Rapid granulation of aerobic granular sludge: A mini review on operation strategies and comparative analysis. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. March, p. 100206, 2019.

ZHENG, M. et al. Ecological and functional research into microbiomes for targeted phenolic removal in anoxic carbon-based fluidized bed reactor (CBFBR) treating coal pyrolysis wastewater (CPW). **Bioresource Technology**, v. 308, n. April, p. 123308, 2020.

ZHENG, Z.; LI, J.; WANG, C. Rapid cultivation of the aerobic granules for simultaneous phenol degradation and ammonium oxidation in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 325, n. November 2020, p. 124414, 2021.

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.

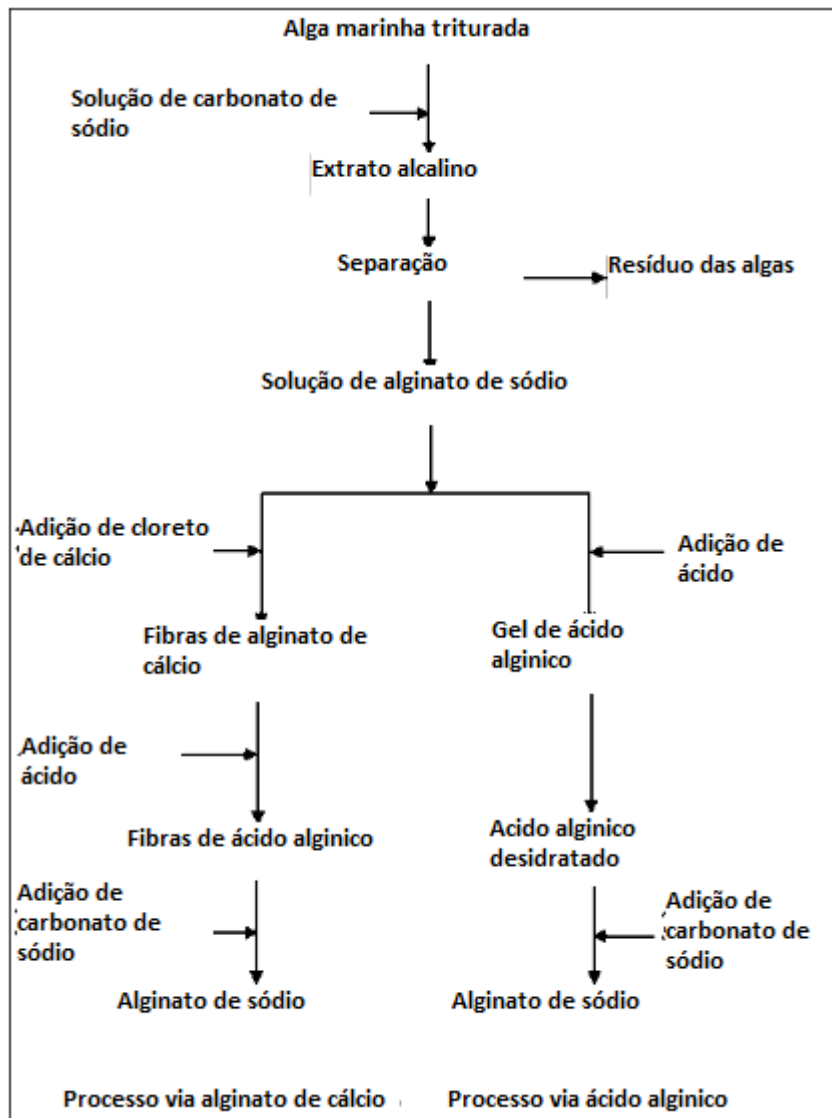
LISTA DE PUBLICAÇÕES

DA COSTA, N. P. A. V. et al. Impact of additive application on the establishment of fast and stable aerobic granulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 13, p. 5697–5709, 2020.

DA COSTA, N.P.A.V; LIBARDI, N.; DA COSTA, R.H.R. Aplicação de substâncias poliméricas extracelulares e alginato de sódio como agentes aceleradores da granulação aeróbia.

In: 31º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (Apresentação oral).

APENDICE A – Processo de obtenção de alginato via algas marinhas marrons



Fonte: Adaptado de Mchugh, 2003.

APENDICE B – Perfis do espectro FTIR para as fases III, IV e V.

