



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

ANTÔNIO RICARDO MENDES BARROS

**LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA): EFEITO DE CÁTIOS DIVALENTES E
MICROPOLUENTES EMERGENTES NA FORMAÇÃO, REMOÇÃO,
MICROBIOLOGIA E ESTABILIDADE OPERACIONAL**

FORTALEZA

2020

ANTÔNIO RICARDO MENDES BARROS

LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA): EFEITO DE CÁTIOS DIVALENTES E
MICROPOLUENTES EMERGENTES NA FORMAÇÃO, REMOÇÃO, MICROBIOLOGIA
E ESTABILIDADE OPERACIONAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Engenharia civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos.
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B2731 Barros, Antônio Ricardo Mendes.
Lodo granular aeróbio (LGA) : efeito de cátions divalentes e micropoluentes emergentes na formação, remoção, microbiologia e estabilidade operacional / Antônio Ricardo Mendes Barros. – 2020.
185 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos .
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino .
1. Lodo granular aeróbio. 2. Cátions divalentes. 3. Cálcio. 4. Micropoluentes emergentes. 5. Microbiologia. I. Título.

CDD 628

ANTÔNIO RICARDO MENDES BARROS

LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA): EFEITO DE CÁTIOS DIVALENTES E
MICROPOLUENTES EMERGENTES NA FORMAÇÃO, REMOÇÃO, MICROBIOLOGIA
E ESTABILIDADE OPERACIONAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Engenharia civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 29/04/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Savia Gavazza dos Santos Pessôa
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Luciano Matos Queiroz
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof. Dr. Neyson Martins Mendonça
Universidade Federal do Pará (UFPA)

À Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pela sua presença constante em minha vida.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Antônio Barros (Barrim), por serem exemplo de amor, companheirismo, dedicação e responsabilidade. Eles que não mediram esforços em me apoiar em todos os momentos e situações.

Ao meu orientador e coordenador do LABOSAN, Prof. Dr. André Bezerra dos Santos, pela amizade, paciência e, principalmente, por exercer um excelente trabalho, com muito zelo e responsabilidade.

Ao Prof. Dr. Paulo Igor Firmino, coorientador e amigo, pela paciência e dedicação.

À minha noiva, Conceição Sousa, pelo amor, companheirismo e carinho.

À minha equipe de trabalho no laboratório: Clara Amorim, Ian Moura, Mardones Marques, Suiane Albuquerque, Paloma Matias e Taynara Freitas. A ajuda de vocês foi fundamental para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação, Jessyca, Camylla, Plínio, e especialmente a Thaís, Sílvio e Gilmar, pela ajuda na aprendizagem e realização de experimentos.

A todos os professores do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da UFC, pelo aprendizado e disponibilidade.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) ETEs Sustentáveis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

RESUMO

O lodo granular aeróbio (LGA) é uma das tecnologias mais recentes desenvolvidas na área de tratamento biológico de efluentes domésticos e industriais. Apesar de o LGA apresentar propriedades físicas, químicas e microbiológicas que resultam em menor demanda de área, menor demanda energética e boas eficiências de remoção simultânea de C, N e P, a tecnologia ainda apresenta alguns problemas na formação e manutenção dos grânulos, especialmente em longos períodos operacionais. Ademais, pouco se conhece sobre os efeitos da presença de micropoluentes emergentes em sistemas de LGA, assim como suas remoções. Nessa perspectiva, o trabalho avaliou o efeito de cátions divalentes e micropoluentes emergentes (fármacos e parabenos) na formação, remoção, microbiologia e estabilidade operacional de sistemas de LGA. No primeiro e segundo estudo, pela falta de pesquisas com reatores em batelada sequencial (RBS) de alimentação/descarte simultâneos operados com baixa velocidade ascensional do líquido ($1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) com a diminuição do tempo de sedimentação, foi investigado o efeito da adição de Ca^{2+} na ligação entre as substâncias poliméricas extracelulares (SPE) negativamente carregadas e a superfície microbiana e se cinza de carvão de termelétricas poderia atuar como núcleo de granulação, fonte de cátions e elemento abrasivo em LGA, respectivamente. Observou-se que a adição de cálcio e cinzas não acelerou a formação de grânulos nem melhorou o desempenho de eficiência dos sistemas. A estrutura microbiana, especialmente em termos de bioatividade, também não foi afetada. Possivelmente, o processo de seleção, gerado pelo tipo de RBS utilizado e curto período de sedimentação, teve maior efeito para a formação dos grânulos do que a presença do cátion divalente e das cinzas, as quais provavelmente foram lavadas do sistema. Com o intuito de elucidar as diferenças operacionais sobre o efeito de cátions divalentes em RBS de alimentação/descarte simultâneos e RBS convencional, um terceiro estudo foi conduzido com quatro reatores em paralelo, dois com a adição de cálcio e dois como controle. Nos reatores controle sem a adição de cálcio, foi observado que a operação do RBS influenciava na sedimentabilidade do lodo, resultando em valores de $\text{IVL}_{30} < 30 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ e $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_5 > 0,9$, para o RBS convencional, e IVL_{30} entre 50 e 60 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ e $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_5 > 0,8$, para o RBS de alimentação/descarte simultâneos. Para os reatores suplementados com cálcio, verificou-se que a adição deste diminuiu o tempo de granulação, principalmente no reator convencional, sugerindo que a adição de cátions divalentes, como cálcio e magnésio, é mais acentuada no RBS convencional, no qual a pressão de seleção é maior. O quarto estudo avaliou o

desempenho operacional da tecnologia de LGA no tratamento de água residuária sintética contendo os parabenos (200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cada) metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP) e butilparabeno (BuP). Além do impacto desses compostos no processo de granulação aeróbia e na estabilidade dos grânulos cultivados em um RBS, foi avaliada a remoção de matéria orgânica, nutrientes (N e P) e dos próprios parabenos, para os quais também foram identificados os possíveis mecanismos de remoção. Associado a isso, também foi avaliada a influência dos parabenos na atividade microbiana de remoção de matéria orgânica e nutrientes (N e P). Na presença de parabenos, foram desenvolvidos grânulos aeróbios com boa sedimentabilidade, porém com estrutura frágil e desuniforme devido à menor produção de SPE, o que também afetou a concentração de sólidos do sistema. Em relação à eficiência de remoção de C, N e P, não foi evidenciado efeito significativo dos parabenos. Já em relação à remoção de parabenos em sistemas LGA, foram obtidas elevadas eficiências de remoção (> 85%). Embora os parabenos tenham sido parcialmente removidos na fase anaeróbia, a fase aeróbia foi a principal responsável pela remoção desses compostos, muito provavelmente por cometabolismo. Enquanto a adsorção não contribuiu evidentemente para a remoção de etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP) e butilparabeno (BuP), foi o mecanismo inicial de remoção de metilparabeno (MeP) (~57%), o qual foi sugerido como provável intermediário da degradação dos demais parabenos. Sob os mesmos aspectos metodológicos aplicados à remoção de parabenos, o quinto estudo avaliou a remoção dos antibióticos trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) no LGA associado ou não ao suplemento de mediador redox antraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS). Quando avaliado apenas o desempenho do LGA, foram observadas remoções de ~30% para TMP e ~60% para SMX. Porém, quando associado ao AQDS, as remoções chegaram a 75% para TMP e 95% para SMX. O aumento dos percentuais de remoção pode estar associado à ação catalítica do mediador redox em processos cometabólicos.

Palavras-chave: Lodo granular aeróbio. Cátions divalentes. Cálcio. Micropoluentes emergentes. Microbiologia.

ABSTRACT

Aerobic granular sludge (AGS) is one of the most recent technologies developed in the field of biological treatment of domestic and industrial effluents. Although AGS has physical, chemical, and microbiological properties that result in lower footprint, lower energy demand, and good efficiencies for simultaneous removal of C, N, and P, the technology still presents some problems in the formation and maintenance of granules, especially in long operating periods. Furthermore, little is known about the effects of emerging micropollutants presence in AGS systems, as well as their removal. In this perspective, this research evaluated the effect of divalent cations and emerging micropollutants (antibiotics and parabens) on the formation, removal, microbiology, and operational stability of AGS systems. In the first and second study, due to the lack of research with sequential batch reactors (SBR) for simultaneous fill/draw operated with low upflow speed of the liquid ($1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) with the reduction of sedimentation time, the effect of the addition of Ca^{2+} on the bonding between the negatively charged extracellular polymeric substances (EPS) and the microbial surface was investigated as well as whether coal ash of thermoelectric plants could act as a granulation core, source of cations, and abrasive element in AGS, respectively. It was observed that the addition of calcium and ash did not accelerate the formation of granules or improve the efficiency performance of the systems. The microbial structure, especially in terms of bioactivity, was also not affected. Possibly, the selection process, generated by the type of RBS used and the short sedimentation period, had a greater effect on the formation of granules than the presence of the divalent cation and the ashes, which were probably washed out of the system. In order to elucidate the operational differences on the effect of divalent cations in simultaneous fill/draw SBRs and conventional SBRs, a third study was conducted with four reactors in parallel, two with the addition of calcium and two as controls. In the control reactors without the addition of calcium, the SBR operation influenced sludge settleability, resulting in values of $\text{VSI}_{30} < 30 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ and $\text{VSI}_{30}/\text{VSI}_5 > 0.9$, for conventional SBR, and VSI_{30} between 50 and 60 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ and $\text{VSI}_{30} / \text{VSI}_5 > 0.8$, for simultaneous fill/draw SBR. For reactors supplemented with calcium, its addition decreased the granulation time, mainly in the conventional reactor, suggesting that the addition of divalent cations, such as calcium and magnesium, is more accentuated in conventional SBRs, in which the pressure of selection is greater. The fourth study evaluated the operational performance of the AGS technology in the treatment of synthetic wastewater containing parabens ($200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ each)

methylparaben (MeP), ethylparaben (EtP), propylparaben (PrP), and butylparaben (BuP). In addition to the impact of these compounds on the aerobic granulation process and on the stability of the granules cultivated in an SBR, the removal of organic matter, nutrients (N and P), and the parabens themselves was evaluated, for which possible removal mechanisms were also identified. Associated with this, the influence of parabens on the microbial activity of removing organic matter and nutrients (N and P) was also evaluated. In the presence of parabens, aerobic granules were developed with good settleability, but with a fragile and uneven structure due to the lower EPS production, which also affected the concentration of solids of the system. As to the removal efficiency of C, N, and P, there was no significant effect of parabens. Regarding the removal of parabens in AGS systems, high removal efficiencies were obtained (> 85%). Although parabens were partially removed in the anaerobic phase, the aerobic phase was mainly responsible for the removal of these compounds, most likely by cometabolism. While adsorption evidently did not contribute to the removal of ethylparaben (EtP), propylparaben (PrP), and butylparaben (BuP), it was the initial mechanism for removing methylparaben (MeP) (~57%), which was suggested as a probable intermediary of degradation of the other parabens studied. Under the same methodological aspects applied to parabens removal, the fifth study evaluated the removal of the antibiotics trimethoprim (TMP) and sulfamethoxazole (SMX) in AGS associated or not with the supplementation of the redox mediator anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS). When only the AGS performance was evaluated, removals of ~30%, for TMP, and ~60%, for SMX, were observed. However, when associated with AQDS, removals reached 75% for TMP and 95% for SMX. The increase of removal percentages may be associated with the catalytic action of the redox mediator in cometabolic processes.

Keywords: Aerobic granular sludge. Divalent cations. Calcium. Emerging micropollutants. Microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 –	Estrutura geral da tese.	23
Figura 3.1 –	Tipos de reatores em bateladas sequenciais (RBS): RBS com alimentação/descarte simultâneos ou volume constante (A) e RBS convencional ou volume variável (B).	34
Figura 3.2 –	Esquema representativo dos processos envolvidos no metabolismo dos organismos acumuladores de fósforo (OAF)	39
Figura 3.3 –	Esquema representativo dos processos envolvidos no metabolismo de organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo (ODAF).	42
Figura 3.4 –	Esquema de transformação dos nutrientes no grânulo.	43
Figura 3.5 –	Estrutura química dos parabenos mais comumente encontrados no meio ambiente.	47
Figura 3.6 –	Estrutura química dos antibióticos Trimetoprima (TMP) e Sulfametoxazol (SMX).	52
Figura 4.1 –	SSV e IVL ao longo das quatro fases do experimento para o (a) R1 (controle) e (b) R2 (suplementado com Ca ²⁺). (■) IVL ₅ , (●) IVL ₁₀ , (▲) IVL ₃₀ e (○) SSV.	64
Figura 4.2 –	Distribuição do tamanho do grânulo (% massa) ao final da Fase IV (190o dia) para LGA cultivado em RBS com alimentação/descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca ²⁺).	66
Figura 4.3 –	Distribuição das frações de nitrogênio em diferentes condições operacionais no (a) R1 (controle) e (b) R2 (suplementado com Ca ²⁺). (■) desnitrificação, (■) nitrificação no efluente, (■) NH ₄ ⁺ no efluente e (□) nitrogênio presente no lodo.	71
Figura 4.4 –	Fotografia em microscopia óptica (esquerda) e microscopia eletrônica de varredura (MEV, direita) dos LGA cultivados em RBS com alimentação/descarte simultâneos (a) R1 - Controle e (b) R2 - Suplementados com Ca ²⁺	72
Figura 4.5 –	Comunidade microbiana em nível de filo (a), classe (b) e família (c) no LGA cultivado em RBS com alimentação/descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca ²⁺). Amostras foram coletadas no 205° dia de operação (Fase IV).	78
Figura 4.6 –	Distribuição funcional da taxonomia a nível familiar do LGA cultivado nos RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca ²⁺). Amostras foram coletadas no 205° dia de operação (fase IV).	79
Figura 5.1 –	Índice Volumétrico de Lodo e concentração de sólidos suspensos voláteis para RBS com alimentação e descarte simultâneos, operado na ausência (R1, controle, a) e na presença (R2, b) de cinza de carvão (■) IVL ₅ , (●) IVL ₁₀ , (▲) IVL ₃₀ , (○) SSVLM e (■) SSVLM/SSLM.	87
Figura 5.2 –	Micrografias obtidas por microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV), respectivamente, dos grânulos em um RBS com alimentação e descarte simultâneos, operado na ausência (R1, controle, a) e presença (R2, b) de cinza de carvão mineral.	88
Figura 5.3 –	Esquema das zonas com presença de oxigênio nos LGAs.	92

Figura 5.4 –	Distribuição da população microbiana do inóculo e amostras coletadas do sistema operado na ausência (R1, controle) e presença (R2) de cinza de carvão mineral, no nível de filo, família e gênero, respectivamente(abundância >10%).	97
Figura 6.1 –	Relação IVL_{30}/IVL_5 e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) para os RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).	102
Figura 6.2 –	Valores de IVL_{30} para os RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).	104
Figura 6.3 –	Tamanho dos grânulos para os RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).	105
Figura 6.4 –	Perfil operacional dos RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).	109
Figura 6.5 –	Composição de SPE durante as etapas de operação para os RBS com alimentação/descarte simultâneos (R1 e R2) e RBS convencionais (R3 e R4) e o percentual de cálcio na matriz de SPE.	110
Figura 6.6 –	Composição dos grânulos por EDX na quantidade de cálcio na matriz de SPE dos RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (a, controle) e R2 (b, suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (c, controle) e R4 (d, suplementado com Ca^{2+}).	112
Figura 6.7 –	Esquema da ação do cálcio na formação de grânulos em enchimento/extração simultâneo e SBRs convencionais.....	113
Figura 7.1 –	Exemplo de um respirograma com detalhamento das etapas.	118
Figura 7.2 –	Caracterização do LGA dos reatores R ₁ e R ₂ ao longo do experimento.....	122
Figura 7.3 –	Micrografia eletrônica por varredura dos grânulos dos reatores R1 e R2 (etapa III).....	123
Figura 7.4 –	Concentrações afluentes e efluentes e eficiências de remoção de parabenos do reator R2.....	127
Figura 7.5 –	Remoção de parabenos (a), matéria orgânica, N e P (b) ao longo de um ciclo do R ₂ no final da etapa III.....	129
Figura 7.6 –	Rotas de degradação dos parabenos sob condições aeróbias.	131
Figura 7.7 –	Remoção de parabenos ao longo de um ciclo do R2 quando alimentado sem MeP.....	132
Figura 7.8 –	Balanço de massa de parabenos no R2.....	133
Figura 7.9 –	Perfil de liberação e assimilação de P pelos OAF para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).....	137
Figura 7.10 –	Perfil de liberação e assimilação de P pelos ODAF – via nitrato para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).	137

Figura 7.11 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos ODAF – via nitrito para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).	137
Figura 7.12 – Diversidade dos microrganismos por gênero do inóculo e dos reatores R1 e R2 (abundância >1%).....	139
Figura 8.1 – Evolução de sedimentabilidade do lodo, retenção de biomassa e matrix de SPE ao longo das etapas de operação.....	148
Figura 8.2 – Estrutura dos grânulos no 180º dia de operação (a) reator controle R1 e (b) reator R2 com TMP e SMX.....	149
Figura 8.3 – Remoção de TMP e SMX ao longo das etapas de operação.	152
Figura 8.4 – Acompanhamento de um ciclo de operação - Etapa III (190º dia de operação).....	153
Figura 8.5 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos OAF para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).	160
Figura 8.6 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos ODAF – via nitrato para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).	160
Figura 8.7 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos ODAF – via nitrito para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).	160
Figura 8.8 – Diversidade dos microrganismos por filo (a) e família (b) do inóculo e dos reatores R1 e R2.	163
Figura 8.9 – Distribuição da microbiologia a nível de gênero (abundância >1%) nos reatores controle (R1) e no exposto aos compostos fármacos TMP e SMX (R2).....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 –	Eficiência de remoção de parabenos em diferentes tipos de tratamento biológicos	47
Tabela 3.2 –	Tecnologias de tratamento de águas residuárias para remover TMP e SMX	52
Tabela 4.1 –	Desempenho operacional do LGA cultivado em RBS com alimentação/descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}).....	66
Tabela 4.2 –	Composição das SPE (Fase IV) do LGA cultivado em RBS com alimentação/descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}).....	71
Tabela 4.3 –	Indicadores de riqueza e diversidade das espécies da população microbiana do LGA cultivado em RBS com alimentação e descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}). Amostras foram coletadas no 205º dia de operação (fase IV).....	72
Tabela 5.1 –	Desempenho operacional do RBS com alimentação e descarte simultâneos, operado na ausência (R1, controle) e presença (R2) de cinza de carvão mineral.....	92
Tabela 5.2 –	Indicadores de riqueza e diversidade das espécies da comunidade bacteriana presente no lodo de inóculo, reator na ausência (R1) e presença (R2) de cinza de carvão mineral.	93
Tabela 6.1 –	Desempenho operacional dos RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).....	106
Tabela 7.1 –	Detalhamento dos ciclos de operação (6 h) dos reatores R1 e R2 durante as etapas I, II e III.	117
Tabela 7.2 –	Eficiência de remoção de matéria orgânica, N e P dos reatores R1 e R2.	127
Tabela 7.3 –	Valores médios das concentrações afluentes e efluentes e das eficiências de remoção de parabenos do reator R2.	128
Tabela 7.4 –	Valores das constantes cinéticas das bactérias nitrificantes para os reatores R1 (controle) e R2 (parabenos).	136
Tabela 7.5 –	Taxas de consumo médias ($mg\ N \cdot g\ SSV^{-1} \cdot h^{-1}$) no processo de desnitrificação para os reatores R1 (controle) e R2 (parabenos).	137
Tabela 7.6 –	Valores de absorção de fosfato ($mg\ P-PO_4^{3-} \cdot g\ SSV^{-1} \cdot h^{-1}$) dos OAF e ODAF para os reatores R1 (controle) e R2 (parabenos).	138
Tabela 8.1 –	Etapas da operação dos reatores de LGA e divisão entre as diferentes fases do ciclo do RBS.....	145
Tabela 8.2 –	Remoção de DQO, nitrogênio e fósforo.	152
Tabela 8.3 –	Valores das constantes cinéticas das bactérias nitrificantes para os reatores LGA R1 (controle) e R2 (fármacos).	159
Tabela 8.4 –	Taxas de consumo médias ($mg\ N \cdot g\ SSV^{-1} \cdot h^{-1}$) no processo de desnitrificação para os reatores LGA R1 (controle) e R2 (fármacos).	159

Tabela 8.5 –	Tabela 8.5 – Valores de absorção de fosfato ($\text{mg PO}_4^{3-}\text{-P}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) dos OAF e ODAF para os reatores LGA R1 (controle) e R2 (fármacos).	161
--------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácido benzoico
AGV	Ácidos graxos voláteis
AQDS	Antraquinona-2,6-dissulfonato
BOA	Bactéria oxidante de amônia
BON	Bactéria oxidante de nitrito
BuP	Butilparabeno
DQO	Demanda química de oxigênio
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de esgoto
EtP	Etilparabeno
IVL	Índice volumétrico de lodo
LA	Lodo ativado
LGA	Lodo granular aeróbio
MeP	Metilparabeno
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NDS	Nitrificação e desnitrificação simultânea
OAF	Organismos acumuladores de fósforo
OAG	Organismos acumuladores de glicogênio
OD	Oxigênio dissolvido
ODAF	Organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo
ODAG	Organismos desnitrificantes acumuladores de glicogênio
ODH	Organismos desnitrificantes heterotróficos
OHO	Organismos heterotróficos ordinários
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PrP	Propilparabeno
RBS	Reator em bateladas sequenciais
RFC	Reator de fluxo contínuo
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TCO	Taxa de consumo de oxigênio
TDH	Tempo de detenção hidráulica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1	Tecnologia de lodo granular aeróbio	25
3.2	Formação dos agregados microbianos	26
3.2.1	<i>Lodo de inóculo</i>	27
3.2.2	<i>Granulação aeróbia</i>	27
3.2.2.1	<i>Influência das SPE</i>	28
3.2.2.2	<i>Influência de cátions na granulação</i>	29
3.2.2.3	<i>Tipos de sistema (configuração do reator)</i>	31
3.2.2.4	<i>Tipos de pressão de seleção</i>	32
3.2.2.5	<i>Estabilidade dos grânulos</i>	34
3.2.2.6	<i>Outras estratégias para promover a granulação e possíveis alternativas</i>	37
3.3	Mecanismos de remoção envolvidos na granulação	38
3.3.1	Microrganismos no processo de granulação	41
3.3.1.1	<i>Organismos Heterotróficos (OH)</i>	41
3.3.1.2	<i>Organismos acumuladores de fósforo (OAF)</i>	41
3.3.1.3	<i>Organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo (ODAF)</i>	42
3.3.1.4	<i>Organismos acumuladores de glicogênio (OAG)</i>	42
3.3.1.5	<i>Nitrificantes/Desnitrificantes</i>	42
3.4	Remoção de micropoluentes emergentes em LGA	43
3.4.1	<i>Parabenos</i>	44
3.4.2	<i>Trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX)</i>	50
3.4.3	<i>Antraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS) e micropoluentes</i>	55
4	EFEITO DA ADIÇÃO DE CÁLCIO NA FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA) EM REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS (RBS) DE ALIMENTAÇÃO/DESCARTE SIMULTÂNEOS	56
4.1	Introdução	56
4.2	Material e métodos	58

4.2.1	<i>Configuração do sistema</i>	58
4.2.2	<i>Métodos Analíticos</i>	59
4.2.3	<i>Caracterização física, química e morfológica da biomassa</i>	59
4.2.4	<i>Extração de DNA, sequenciamento do gene 16S RNAr e processamento de dados</i>	60
4.2.5	<i>Métodos Estatísticos</i>	61
4.3	Resultados e discussão	61
4.3.1	<i>Granulação através das características de sedimentação</i>	61
4.3.2	<i>Desempenho do sistema LGA durante o processo de granulação</i>	64
4.3.3	<i>Características dos grânulos</i>	69
4.3.4	<i>Análise da comunidade microbiana</i>	72
4.4	Conclusão	78
5	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CINZAS DE CARVÃO MINERAL EM LODO GRANULAR AERÓBIO CULTIVADO EM RBS COM ALIMENTAÇÃO/DESCARTE SIMULTÂNEOS	79
5.1	Introdução	79
5.2	Material e métodos	80
5.2.1	<i>RBS: configuração e operação</i>	80
5.2.2	<i>Inóculo e solução de alimentação</i>	80
5.2.3	<i>Métodos analíticos</i>	81
5.2.4	<i>Caracterização do grânulo maduro</i>	82
5.3	Resultado e discussão	84
5.3.1	<i>Sedimentabilidade e retenção de lodo</i>	84
5.3.2	<i>Caracterização do grânulo maduro</i>	86
5.3.3	<i>Mecanismos de formação e manutenção do grânulo na presença de cinza de carvão mineral</i>	87
5.3.4	<i>Remoção de matéria orgânica e nutrientes</i>	89
5.3.5	<i>Diversidade da comunidade microbiana</i>	93
5.4	Conclusão	96
6	EFEITO DA ADIÇÃO DE CÁLCIO EM SISTEMAS DE LGA SUBMETIDOS À ELEVADA (RBS CONVENCIONAL) E BAIXA (RBS COM ALIMENTAÇÃO/DESCARTE SIMULTÂNEOS) PRESSÃO DE SELEÇÃO	97
6.1	Introdução	97
6.2	Materiais e métodos	98

6.2.1	<i>Configuração dos sistemas</i>	98
6.2.2	<i>Análises de acompanhamento</i>	99
6.3	Resultados e discussão	100
6.3.1	<i>Sedimentabilidade e tamanho dos grânulos</i>	100
6.3.2	<i>Desempenho dos sistemas durante o processo de granulação</i>	104
6.3.3	<i>Composição dos grânulos</i>	108
6.3.4	<i>Mecanismo de ação e imobilização do cálcio na matriz de SPE da biomassa granular aeróbica</i>	110
6.4	Conclusão	111
7	PARABENOS EM SISTEMA DE LODO GRANULAR AERÓBIO: IMPACTOS NA GRANULAÇÃO E EFICIÊNCIAS DE REMOÇÃO	113
7.1	Introdução	113
7.2	Metodologia	114
7.2.1	<i>Configuração experimental</i>	114
7.2.2	<i>Perfil de remoção de parabenos, matéria orgânica, N e P ao longo do ciclo</i> ..	115
7.2.3	<i>Monitoramento do sistema</i>	115
7.2.3.1	<i>Análises físico-químicas</i>	116
7.2.3.2	<i>Análises morfológicas e microbiológicas do lodo</i>	117
7.2.4	<i>Metabolismo dos principais grupos funcionais</i>	117
7.2.4.1	<i>Atividade heterotrófica aeróbia e nitrificante</i>	117
7.2.4.2	<i>Testes de desnitrificação</i>	119
7.2.4.3	<i>Atividade biodesfosfatadora</i>	120
7.3	Resultados e discussão	121
7.3.1	<i>Formação, estabilidade e características do LGA</i>	121
7.3.2	<i>Remoção de matéria orgânica, N e P</i>	124
7.3.3	<i>Remoção de parabenos</i>	126
7.3.4	<i>Perfil de remoção de parabenos, matéria orgânica, N e P ao longo do ciclo</i> ..	128
7.3.5	<i>Balanco de massa de parabenos</i>	132
7.3.6	<i>Metabolismo bacteriano</i>	134
7.3.7	<i>Caracterização microbiológica</i>	138
7.4	Conclusão	140
8	REMOÇÃO DE TRIMETOPRIMA E SULFAMETOXAZOL EM SISTEMAS DE GRANULAÇÃO AERÓBIA	141
8.1	Introdução	141

8.2	Materiais e métodos.....	142
8.2.1	<i>Configuração dos sistemas e condições operacionais.....</i>	142
8.2.2	<i>Monitoramento do sistema.....</i>	143
8.2.3	<i>Quantificação de TMP e SMX.....</i>	144
8.2.4	<i>Quantificação de TMP e SMX no lodo.....</i>	144
8.2.5	<i>Bioatividade dos principais grupos microbianos.....</i>	145
8.3	Resultados e discussão.....	147
8.3.1	<i>Granulação.....</i>	147
8.3.2	<i>Remoção de carbono, nitrogênio e fósforo.....</i>	150
8.3.3	<i>Remoção de TMP e SMX.....</i>	151
8.3.3.1	<i>Remoção de TMP e SMX na ausência de AQDS.....</i>	151
8.3.3.2	<i>Remoção de TMP e SMX na presença de AQDS.....</i>	155
8.3.4	<i>Metabolismo bacteriano.....</i>	156
8.3.5	<i>Dinâmica populacional microbiana.....</i>	161
8.4	Conclusão.....	165
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	166
	REFERÊNCIAS.....	167

1 INTRODUÇÃO

O sistema de lodo ativado (LA) é usado em todo o mundo para o tratamento biológico de águas residuárias municipais e industriais. Apesar de essa tecnologia estar ligada diretamente com a qualidade ambiental, atualmente tem desvantagens em relação a algumas tecnologias emergentes de tratamento de esgotos que apresentam menores custos de implantação, operação e manutenção (BENGTSSON et al., 2018; NANCHARAIAH; SARVAJITH, 2019; SHEIK; MULLER; WILMES, 2014). Ademais, muitas dessas tecnologias produzem menos lodo e oferecem maior capacidade de recuperação de recursos (biogás, fósforo na forma de estruvita, alginato, triptofano etc.).

Nesse sentido, surgiu há aproximadamente duas décadas a tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) (MORGENROTH et al., 1997). Desde o primeiro estudo, o LGA atraiu a atenção de muitos profissionais da área de tratamento de efluentes devido às suas possíveis aplicações no tratamento aeróbio de águas residuárias. O LGA é o resultado da conclusão da granulação aeróbia, ou seja, do processo de transformação de flocos de lodo em grânulos, induzida normalmente pela aplicação de elevadas pressões de seleção. Caracteriza-se pela pequena quantidade de microrganismos filamentosos e agregados floculentos, mas principalmente pela predominância de grânulos, nos quais diferentes espécies de bactérias possuem funções específicas na degradação de poluentes presentes no esgoto e crescem na ausência de um meio suporte (LIU; TAY, 2004). Devido ao grande tamanho das partículas (> 2 mm), estrutura microbiana compacta e respiração aeróbia na região externa do grânulo, é possível manter microambientes aeróbios, anóxicos e anaeróbios em um único grânulo, mesmo em um ambiente aerado (WINKLER et al., 2018).

Entre as principais vantagens da referida tecnologia em comparação ao LA, destacam-se: não necessidade de decantação secundária, de tanques específicos para remoção de N e P, de sistemas de recirculação etc., o que acaba por reduzir entre duas a três vezes a demanda de área, até duas vezes a demanda energética, três vezes a redução de formação de lodo excedente, além da formação de uma biomassa com elevada capacidade de sedimentação e menos sujeita a problemas operacionais como intumescimento de lodo.

Geralmente, o desenvolvimento de grânulos se dá com o uso de LA como inóculo, em reatores em batelada sequencial (RBS), operados com diferentes tempos de ciclo do tipo A/O (fases anaeróbia e aeróbia) ou A/O/A (fases anaeróbia, aeróbia e anóxica), com um curto período de sedimentação após a última fase (NANCHARAIAH; SARVAJITH, 2019; SUJA et al., 2015). Essas condições operacionais permitem a seleção de microrganismos de

crescimento lento, como bactérias nitrificantes, organismos acumuladores de polifosfatos (OAF) e organismos acumuladores de glicogênio (OAG) como agregados densos, tornando o tamanho dos grânulos maior que os flocos de LA, que resulta na obtenção de maiores velocidades de sedimentação.

Os principais fatores que ajudam no processo de iniciação da granulação são a força de cisalhamento hidrodinâmica, definida com base na velocidade ascensional das bolhas de ar, e o regime de alimentação *feast-famine* (termo em inglês para denominação de períodos sequenciais de abundância e escassez de substrato) (NANCHARAI AH; REDDY, 2018), os quais ajudam na indução de fenótipos agregadores, na produção de SPE e na modelagem dos agregados sob a forma de grânulos densos e compactos (LVet al., 2014).

Além destes, outros fatores também são reportados como grandes influenciadores das características macroscópicas e das atividades metabólicas dos grânulos, como a carga orgânica aplicada, o nível de oxigênio dissolvido no reator, o tipo de substrato, as composições de nitrogênio e carbono, a configuração do reator, o tempo de retenção de sólidos (TRS), o tempo de ciclo, o tempo de sedimentação e a taxa de troca volumétrica (FRANCA et al., 2018; ROLLEMBERG et al., 2018).

Mesmo com um vasto conhecimento sobre a tecnologia de LGA, ainda são encontrados alguns problemas na formação e manutenção dos grânulos, como: instabilidade da biomassa, devido à desintegração dos grânulos, longo período de formação, formação de grânulos pequenos, principalmente quando são usados RBS com alimentação/descarte simultâneos, também conhecidos como de volume constante (DERLON et al., 2016; WANG et al., 2018), acumulação de nitrogênio oxidado (nitrito e nitrato) e baixa remoção de fósforo. Por esses motivos, estudos demonstraram com o uso de RBS convencional, que a adição de cálcio (JIANG et al., 2003; LIU et al., 2010a), magnésio (LI et al., 2009) e policloreto de alumínio (PAC) (LIU et al., 2015) podem proporcionar uma granulação mais rápida e, desse modo, melhorar a sedimentabilidade do lodo e sua estabilidade.

Cabe destacar que os cátions bivalentes podem atuar como uma ponte entre a carga negativa das substâncias poliméricas extracelulares e a superfície dos microrganismos, facilitando a agregação bacteriana, além de servir como meio suporte na sua forma precipitada onde as bactérias podem se ligar (JIANG et al., 2003; REN et al., 2008). Além disso, os íons servem como importantes cofatores das enzimas envolvidas no metabolismo de remoção de carbono, nitrogênio e fósforo (LIU; TAY, 2002).

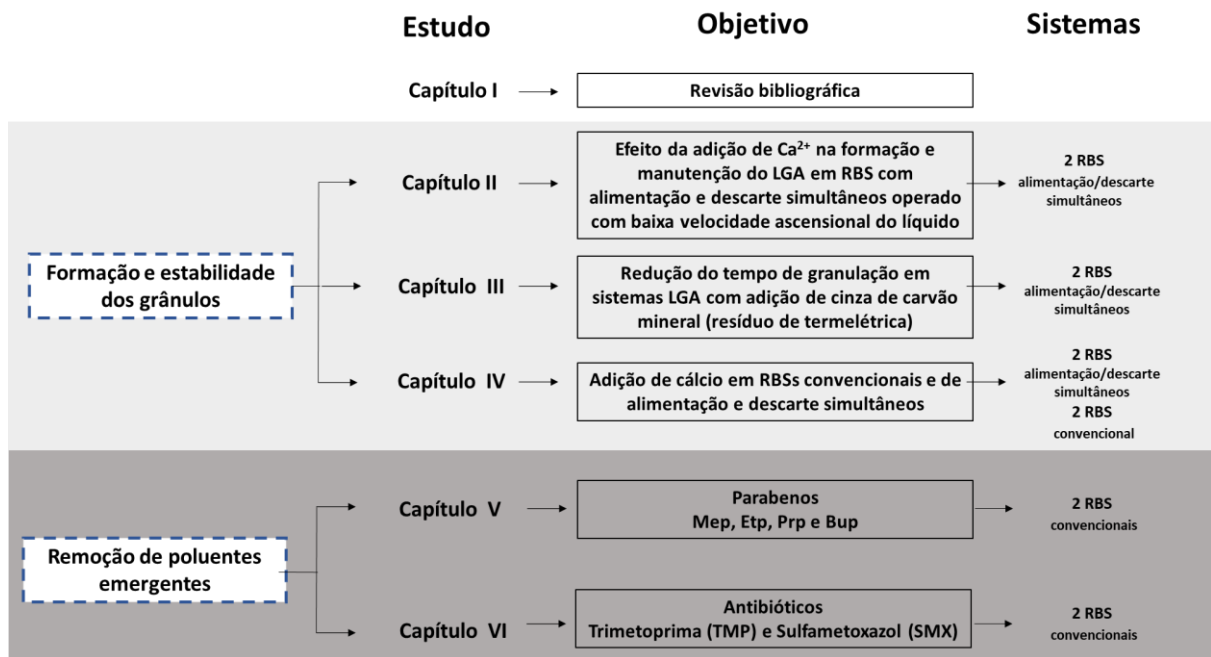
Associado a essas estratégias, uma das possibilidades de aperfeiçoamento é a utilização de cinzas de carvão mineral, subprodutos resultantes da combustão do carvão em

caldeiras. Além do seu impacto ambiental positivo de reutilização de resíduo em tecnologias de tratamento de efluentes, esse rejeito pode atuar como material inerte e facilitar a nucleação dos grânulos, semelhante ao biocarvão (*biochar*) utilizado por Zhang et al. (2017), assim como fonte de íons, como: Si^{4+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} ou como elemento abrasador para quebra de filamentos (LIU et al., 2019).

Além do aprimoramento das técnicas de granulação e a aplicação do LGA na remoção simultânea de matéria orgânica e nutrientes, vários estudos têm testado a remoção de micropoluentes emergentes, como produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, compostos xenobióticos recalcitrantes ou tóxicos e íons metálicos. Dentre eles, 17α -etinilestradiol, 4-nonilfenol e carbamazepina, fenol, 4-nitrofenol, fenóis clorados, pentaclorofenol, piridina, ácidos ftálico e ésteres, terc-butil álcool, éter metil-terc-butil, cloroanilinas, metais agentes quelantes, corantes têxteis, 2,4- dinitrotolueno, corantes azo e ésteres organofosforados (AMORIM et al., 2016; KENT; TAY, 2019; NANCHARAI AH; REDDY, 2018; ROLLEMBERG et al., 2018). Contudo, muitos estudos não investigaram a fundo o impacto dos referidos poluentes na formação do grânulo, assim como na mudança populacional microbiana e nos mecanismos envolvidos. Ademais, para várias categorias de micropoluentes emergentes, como os parabenos, ainda não há relatos de remoção em sistemas de LGA nem do seu impacto sobre a formação e a estabilidade dos grânulos, mesmo sendo compostos altamente utilizados na indústria de cosméticos como conservantes pela elevada capacidade antimicrobiana (MA et al., 2018).

Nesse contexto, este trabalho se divide em dois grandes objetivos: (i) investigar o processo de granulação e estabilidade utilizando RBS convencional e RBS com alimentação/descarte simultâneos (volume constante) com auxílio da suplementação de Ca^{2+} e cinza de carvão mineral (resíduo de termelétrica) e (ii) avaliar o impacto dos micropoluentes emergentes, parabenos (metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP) e butilparabeno (BuP)) e dos antibióticos (trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX)), na formação e estabilidade dos grânulos, no desempenho operacional, na atividade dos principais grupos funcionais que realizam os processos de remoção de carbono, nitrogênio e fósforo, e na dinâmica microbiana. A pesquisa foi dividida em cinco partes como apresentado na Figura 1.1.

Figura 1.1 – Estrutura geral da tese.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de cátions divalentes e micropoluentes emergentes (fármacos e parabenos) na formação, remoção, microbiologia e estabilidade operacional de sistemas de LGA.

2.2 Objetivos específicos

- (i) Investigar o efeito da adição de Ca^{2+} na formação e manutenção do LGA em RBS com alimentação e descarte simultâneos (volume constante) operado com baixa velocidade ascensional do líquido;
- (ii) Investigar se a cinza de carvão de termelétricas poderia atuar como núcleo de granulação, fonte de cátions (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e elemento abrasivo em LGA, reduzindo o tempo de granulação e afetando positivamente a estabilidade operacional;
- (iii) Avaliar o efeito da adição de cálcio em sistemas de elevada (RBS convencional) e de baixa (RBS com alimentação/descarte simultâneos) pressão de seleção;
- (iv) Avaliar o impacto dos parabenos (MeP, EtP, PrP e BuP) no processo de granulação aeróbia e na estabilidade dos grânulos. Buscou-se também avaliar a remoção de matéria orgânica, nutrientes (N e P) e dos próprios parabenos, para os quais também foram identificados os possíveis mecanismos de remoção. Associado a isso, também foi avaliado a influência dos parabenos na atividade microbiana de remoção de matéria orgânica e nutrientes (N e P);
- (v) Avaliar o efeito dos antibióticos TMP e SMX na formação e manutenção do lodo aeróbio, produção de SPE, eficiência de remoção, e na capacidade de remover adicionalmente carbono, nitrogênio e fósforo.

3 CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A granulação aeróbia é uma variante do processo de lodo ativado (JORDÃO; PESSÔA, 2014) e surgiu apenas no final da década de 1990, sendo desenvolvida preferencialmente em reatores em bateladas sequenciais (RBS) (MORGENROTH et al., 1997), os quais se consagraram como métodos de cultivo preferencial dos grânulos aeróbios (BASSIN, 2011). É importante destacar que o desenvolvimento da granulação se deu primeiramente em reatores anaeróbios, especialmente em reatores do tipo *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB), na década de 1980 (LETTINGA, 1980 apud ADAV et al., 2008). A configuração dos RBS também teve origem em estudos envolvendo sistemas anaeróbios, datando de 1960 (WIRTZ; DAGUE, 1996).

Os grânulos aeróbios se mostram capazes de realizar diversos processos biológicos, entre eles: biodegradação, bioacumulação e biossorção de contaminantes (SARMA; TAY; CHU, 2017). A maioria dos estudos de granulação aeróbia em escala laboratorial utiliza esgotos sintéticos, porém existem exemplos em escala real com esgoto doméstico, apesar de terem levado um tempo muito maior, de cerca de 400 dias, para se obter uma predominância de grânulos no reator (LIU et al., 2010b). Sabe-se que os grânulos aeróbios já foram utilizados para processos de remoção de carbono orgânico, fósforo, amônia (AB HALIM et al., 2016), fenol, o-cresol, p-nitrofenol (RAMOS; SUÁREZ-OJEDA; CARRERA, 2015), além de fármacos e produtos de higiene pessoal (ZHAO et al., 2015b).

Entretanto, ainda há muitas questões a serem descobertas e melhoradas nesta tecnologia, sendo as principais delas: a estabilidade dos grânulos aeróbios, os longos períodos de partida (*start-up*) em escala plena, a desidratação e digestibilidade do LGA e as condições necessárias para se obter elevadas eficiências de remoção simultâneas de C, N e P (NANCHARAIH; REDDY, 2018). Além dessas dificuldades, um dos maiores problemas ainda não resolvidos dessa tecnologia é entender o motivo da instabilidade dos grânulos, especialmente para longos períodos operacionais, e como resolvê-la (LEE et al., 2010). Vários fatores podem contribuir para esta, por exemplo decorrente de um aumento da carga orgânica (BECH, 2011), pelo desenvolvimento de um núcleo anaeróbio (YANG et al., 2014), presença de micropoluentes (ZHAO et al., 2015b), entre outras.

3.1 Tecnologia de lodo granular aeróbio

A pesquisa e o desenvolvimento de LGA começaram nos anos de 1990, no entanto, apenas em 2002, foi obtida granulação estável em escala laboratorial na Holanda. A patente do

processo para tratamento de esgoto com LGA foi concedida em 2004 a Mark Van Loosdrecht e Merle de Kreuk, após a qual a Universidade Técnica de Delft em parceria com a empresa Royal Haskoning DHV batizaram a tecnologia comercialmente como Nereda®. O primeiro protótipo Nereda® em escala industrial foi implementado em 2005, adaptando-se uma estação de lodo ativado. A primeira ETE em escala real foi inaugurada em 2011 na cidade de Epe e a segunda em 2013 em Garmerwolde, ambas na Holanda, para o tratamento de esgotos sanitários (SANTOS, 2019; GIESEN et al., 2013). Desde então, várias plantas foram construídas, e outras estão em construção, para o tratamento de esgotos sanitários e mesmo industriais. No Brasil, a primeira estação construída foi a ETE de Deodoro no Rio de Janeiro, operacionalizada desde 2016 para atender a demanda dos jogos olímpicos, com vazão de $6.120 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Estima-se que hoje existam doze ETEs em escala real com a referida tecnologia no nosso país, tanto em operação quanto em construção.

Embora bem difundida e amplamente caracterizada como sustentável, pela redução do custo operacional e espaço requerido em comparação com o lodo ativado, é claro que o custo de implantação (CAPEX, *capital expenditure*) é na maioria das vezes superior às tecnologias de baixo custo do tratamento de águas residuais. Rollembert (2020) avaliou o projeto de ETEs no Brasil com a tecnologia LGA (Tatu e Jardim Novo), e foram estimados custos *per capita* de implantação da ordem de R\$ 210,00 hab^{-1} (US\$ 42,00 hab^{-1}). Entretanto, é importante destacar que esses dados são preliminares, não sendo encontrados na literatura avaliações econômico-financeiras aprofundadas.

3.2 Formação dos agregados microbianos

Geralmente, os grânulos aeróbios são formados a partir de lodo ativado convencional (MORGENROTH et al., 1997). Esta biomassa é submetida a sucessivos ciclos em reatores em bateladas sequenciais (RBS), configuração que se mostrou mais adequada à formação de grânulos (LEE et al., 2010). Quando operado na modalidade convencional o ciclo do RBS é dividido entre as fases de alimentação (enchimento), aeração (reação), sedimentação e descarte de efluente. Sabe-se que, após alguns ciclos, e aplicadas algumas pressões de seleção fundamentais, como o tempo de sedimentação e a taxa de troca volumétrica, induz-se a formação de grânulos aeróbios (ROLLEMBERG et al., 2018).

Zhang, Hu e Lee (2016) propuseram um mecanismo de formação destes em quatro etapas, sendo elas a adesão de células, a formação de microagregados, a produção de SPE e a maturação dos grânulos, em que se tornam compactos.

3.2.1 Lodo de inóculo

O lodo ativado convencional (LAC) é o mais utilizado como inóculo em reatores tanto em escala laboratorial quanto em escala plena, com o intuito de promover a partida (*start-up*) do processo de formação de grânulos aeróbios (LEE et al., 2010). Os microrganismos presentes no lodo ativado são usualmente hidrofóbicos, as quais são mais propensas a formarem agregados sob a forma de flocos, ao contrário dos hidrofílicos (ZITA; HERMANSSON, 1997). Quanto maior a quantidade de microrganismos hidrofóbicos no lodo de inóculo, mais rápido será o processo de granulação (WILÉN et al., 2008).

Cabe ressaltar que esse tipo de lodo apresenta uma predominância de microrganismos com morfologia filamentosa, resultando em flocos maiores e de baixa densidade e, conseqüentemente, com menor capacidade de sedimentação.

3.2.2 Granulação aeróbia

O lodo granular aeróbio (LGA) é o resultado da conclusão da granulação aeróbia, ou seja, do processo de transformação de flocos de lodo em grânulos, induzida por pressões de seleção. Caracteriza-se pela pequena quantidade de microrganismos filamentosos e agregados floculentos, mas principalmente pela predominância de grânulos, nos quais diferentes espécies de microrganismos possuem funções específicas na degradação de poluentes presentes no esgoto, e crescem na ausência de um meio suporte (LIU; TAY, 2004). A principal forma de identificação dos grânulos foi proposta por De Kreuk; Kishida; Van Loosdrecht (2007), como agregados microbianos com tamanho mínimo de 0,2 mm.

Os grânulos aeróbios possuem uma estrutura microbiana forte, com excelentes capacidades de sedimentação e retenção de biomassa, além da habilidade de suportar grandes variações de carga orgânica (ZHENG et al., 2006). Entretanto, a característica mais promissora dessa tecnologia em comparação à de lodo ativado convencional é a possibilidade remoção simultânea de C, N e P em um único reator. Ademais, usualmente tem-se maiores remoções de metais pesados, como níquel, cádmio, cobre e zinco (LIU et al., 2003; XU; LIU; TAY, 2006), micropoluentes emergentes, como fármacos, produtos de higiene pessoal, entre outros, além de produtos químicos industriais (SARMA; TAY; CHU, 2017).

De acordo com o alcance de penetração do oxigênio no grânulo, há a formação de três zonas distintas: 1) zona aeróbia, a mais externa, que caracteriza-se pela predominância de microrganismos heterotróficos, responsáveis pela degradação de matéria orgânica; 2) zona

intermediária, com a presença de oxigênio suficiente para oxidação de amônia, onde predominam os microrganismos nitrificantes, responsáveis pelos processos de nitrificação; e 3) zona anóxica-anaeróbia, no centro do grânulo, em que há uma predominância dos processos de desnitrificação, remoção de fósforo e anammox (abreviação em inglês de “oxidação anaeróbia de amônia, *AnaerobicAmmoniumOxidation*”) (SENGAR et al., 2018), também de células microbianas mortas (SARMA; TAY; CHU, 2017).

Os principais fatores que ajudam no processo de iniciação da granulação são a força de cisalhamento hidrodinâmica, definida com base na velocidade ascensional das bolhas de ar, e o regime de alimentação *feast-famine* (termo em inglês para denominação de períodos sequenciais de abundância e escassez de substrato) (NANCHARAI AH; REDDY, 2018), os quais ajudam na indução de fenótipos agregadores, na produção de SPE, e na modelagem dos agregados sob a forma de grânulos densos e compactos (LV et al., 2014). Esse regime de alimentação caracteriza-se pela alternância de períodos com abundância de substrato (anaeróbio-anóxico), quando há a degradação da DQO e a liberação dos íons fosfato presentes e a maior parte da produção de SPE, com períodos de consumo e posterior ausência de substrato (aeróbio), seguido de uma rápida captura dos íons fosfato (LIN; LIU; TAY, 2003; ROLLEMBERG et al., 2018).

Outras condições também são reportados como grandes influenciadores das características macroscópicas e das atividades metabólicas dos grânulos, como a carga orgânica aplicada, o nível de oxigênio dissolvido no reator, o tipo de substrato, as composições de nitrogênio e carbono, a configuração do reator, o tempo de retenção de sólidos (TRS), o tempo de ciclo, o tempo de sedimentação e a taxa de troca volumétrica (FRANCA et al., 2018; ROLLEMBERG et al., 2018).

3.2.2.1 Influência das SPE

As substâncias poliméricas extracelulares (SPE) é uma mistura complexa de polímeros biológicos entrelaçados. As SPE fornecem estabilidade mecânica e suporte que permitem que as células de biofilme estabeleçam consórcios sinérgicos, melhoram a retenção de água e a absorção de nutrientes, fornecem proteção contra vírus, predação, agentes antimicrobianos e desinfetantes e, finalmente, atuam como ambiente de reciclagem de nutrientes (ADAV et al., 2008). Essas funções podem ser fornecidas por uma grande variedade de biopolímeros, particularmente polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos.

Os compostos das SPE são originários de diferentes membros da comunidade e

um organismo específico pode produzir polímeros diferentes em função do tempo ou condição operacional do reator (SEVIOUR et al., 2019). Além disso, as SPE produzidas por uma determinada população microbiana podem persistir muito tempo, mesmo depois do desaparecimento da população que a originou. Todos esses componentes diferentes contribuem para a função e organização da matriz. Além disso, muitos dos biopolímeros produzidos pelas células são processados por enzimas extracelulares incorporadas na matriz extracelular (WHITFIELD; MARMONT; HOWELL, 2015).

Por esses fatores, os polímeros auxiliam e são extremamente necessários aos processos de agregação de microrganismos, formação dos grânulos aeróbios e estabilidades desses agregados. Geralmente, a tensão de cisalhamento hidrodinâmica causada pelas bolhas da aeração induz a produção de SPE e a um aumento na hidrofobicidade das superfícies celulares, melhorando o processo de formação granular (NANCHARAI; REDDY, 2018).

Muitos estudos demonstraram que a maior parte das SPE são produzidas durante a presença de alimento, ou seja, logo após o período de alimentação em sistemas RBS, no qual a DQO é preferencialmente degradada. Na falta de substrato, há uma tendência ao consumo dessas substâncias poliméricas, fazendo com que as bactérias utilizem as SPE como fonte de carbono e energia para fazer a respiração endógena (CORSINO et al., 2015).

3.2.2.2 *Influência de cátions na granulação*

A influência da adição de cátions, sobretudo de cálcio, sobre a granulação aeróbia, é um fator que inspira diversos estudos até hoje (BARAT et al., 2006; FERNÁNDEZ-NAVA et al., 2008; HAO et al., 2016; KOŃCZAK; KARCZ; MIKSCH, 2014; LIU; SUN, 2011; LIU; LAN; ZENG, 2016; REN et al., 2008; WAN et al., 2015; WANG et al., 2012; YE et al., 2016; ZHANG et al., 2015). Os cátions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , K^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+}) influenciam o desenvolvimento de biofilmes a partir de culturas bacterianas de vida livre, afetando a quantidade de biomassa que é aderida, bem como a produção de SPE, além de atuar como uma ponte entre polissacarídeos carregados negativamente (PATRAUCHAN et al., 2005).

Para investigar o efeito do Ca^{2+} na granulação, Jiang et al. (2003) utilizaram um reator controle (R1) e um reator onde foi suplementado uma concentração de $100 \text{ mg Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ (R2). O reator adicionado de cálcio formou grânulos mais rapidamente (R1: 32 dias, R2: 16 dias). Além disso, após os dois reatores atingirem a estabilidade, o reator R2 apresentou grânulos maduros maiores (R1: 2 mm, R2: 2,8 mm), maior retenção de biomassa (R1: 2 g SS L^{-1} , R2: $7,9 \text{ g SS} \cdot \text{L}^{-1}$), menor IVL_{30} (R1: $150 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, R2: $100 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$) e maior eficiência na

remoção de DQO (R1: 93%, R2: 98%). Apesar de a quantidade de proteínas extracelulares geradas ter sido equivalente (em torno de $60 \text{ mg}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ em ambos), o R2 apresentou mais que o dobro de polissacarídeos extracelulares (R1: $41 \text{ mg}\cdot\text{gSSV}^{-1}$, R2: $92 \text{ mg}\cdot\text{gSSV}^{-1}$). Para os autores, os íons de cálcio serviram como pontes para unir superfícies bacterianas ou substâncias extracelulares carregadas negativamente, favorecendo a aglomeração no formato de grânulos. A maior produção de polissacarídeos, estimulada pelos íons cálcio, fortaleceria a integridade estrutural dos grânulos.

Li et al. (2009) também encontraram resultados semelhantes com a adição de Mg^{2+} ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). O reator adicionado de magnésio (R2) formou grânulos primeiro (R1: 17 dias, R2: 4 dias) e atingiu a granulação (considerada pelos autores como alcançada depois que mais de 15% dos grânulos fossem maiores que 0,6 mm) mais rapidamente (R1: 32 dias, R2: 18 dias). Além disso, os grânulos no reator R2 foram consistentemente maiores que os do reator R1 ao longo do experimento, tendo se estabilizado em torno de 2,9 mm, enquanto R1 atingiu 1,8 mm. Entretanto, os reatores tiveram processos similares de evolução do formato e coloração dos grânulos, diferindo somente quanto ao ritmo. Os grânulos também eram similares, sendo compactos, habitados por microrganismos filamentosos na camada externa e colonizados por bacilos e microrganismos de forma esférica (cocos) na camada interna.

Devido à similaridade dos resultados obtidos entre os dois estudos, Li et al. (2009) concluíram que os íons magnésio desempenharam um papel similar aos íons cálcio e supuseram os mesmos dois mecanismos levantados por Jiang et al. (2003) para explicar a influência do magnésio sobre a granulação.

A interação química dos cátions com as SPE pode acontecer de várias formas. A maioria dos trabalhos ressaltam que o cálcio tende a se ligar preferencialmente à fração de polissacarídeos da SPE (JIANG et al., 2003; LIU et al., 2010a; REN et al., 2008). Entretanto, a ligação do cálcio às proteínas está frequentemente envolvida na adesão bacteriana à superfície, além de ser essencial para a agregação célula-célula e a formação de colônias (ROSE, 2000). Sajjad e Kim (2015) analisaram a interação de Ca^{2+} e Mg^{2+} em reatores suplementados com os cátions ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) com os grupos NH, CN e CO das proteínas e o grupo OH dos polissacarídeos, e observaram que a adição de Ca^{2+} teve forte interação com os grupos OH e pequena interação com os grupos NH e CN. No entanto, para o reator suplementado com Mg^{2+} , havia maior interação com o grupo CN da ligação peptídica das proteínas. O trabalho também revelou que os grupos CN e NH das proteínas estavam mais envolvidos do que o grupo CO, sugerindo que o nitrogênio tinha maior relação com os cátions divalentes.

Outros cátions que se mostraram positivos aos grânulos aeróbios foram o Al^{3+} (WANG et al., 2012) e o Fe^{3+} (KOŃCZAK; KAR CZ; MIKSCH, 2014). Além disso, a adição de K^+ mostrou ser capaz de aumentar a capacidade de agregação entre microrganismos de lodos granulares e floculentos, e Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} apresentaram efeito similar em lodos floculentos quando em baixas concentrações, apesar de se mostrarem inibidores (por efeito de toxicidade) para lodos granulares em maiores concentrações (acima de $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)(HAO et al., 2016).

3.2.2.3 Tipos de sistema (configuração do reator)

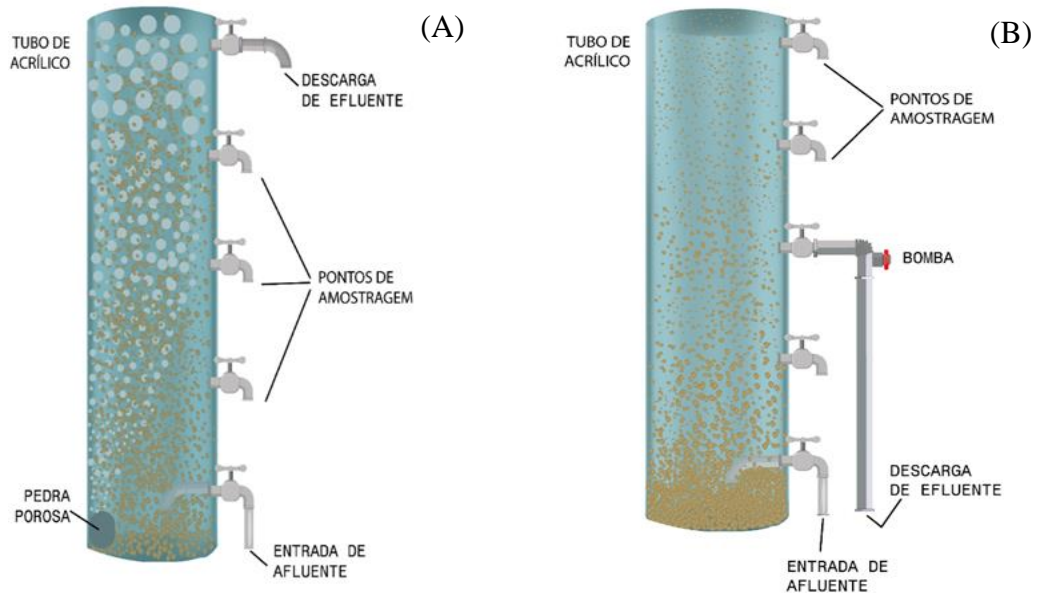
Pesquisas demonstram que grânulos aeróbios já foram cultivados em reatores sob as mais diversas condições operacionais, inclusive em relação ao fluxo. Como abordado anteriormente, normalmente são utilizados reatores em bateladas sequenciais (RBS), onde a granulação vem se mostrando mais favorável, além da maior estabilidade operacional. Entretanto, a granulação também vem sendo investigada em reatores em fluxo contínuo (RFC), estes últimos com a presença de câmaras com diferentes finalidades, mas se diferenciando dos sistemas de lodo ativado, pois não há a utilização da bombas de recirculação, controle de idade de lodo nas diferentes câmaras etc.(NANCHARAI AH; REDDY, 2018).

O tratamento de esgoto em reatores RBS leva em consideração a função da variável “tempo”, e não em função do espaço como ocorre nos sistemas de fluxo contínuo, onde as operações unitárias de oxidação biológica, sedimentação etc., ocorrem em um único tanque. Os RBS podem ser divididos em dois tipos (Figura 3.1):

- RBS com alimentação/descarte simultâneos ou de volume constante: operados sob regime de alimentação e descarte simultâneos, marcado pelo bombeamento de afluente pela parte inferior do reator concomitante ao descarte pela parte superior, mantendo sempre o mesmo volume da fase líquida no seu interior (DERLON et al., 2016; WANG et al., 2018).
- RBS convencional ou de volume variável: caracterizados por possuírem saída de efluente em uma altura definida (com exceção da parte superior) e ter as fases de enchimento e descarte separadas, sendo o esgoto bombeado até um nível próximo ao superior do reator e, depois das fases de aeração e sedimentação, descartado todo o efluente tratado localizado acima do ponto no qual foi instalada a saída, fazendo o

volume total do reator variar (MORGENROTH et al., 1997; ROLLEMBERG et al., 2019a).

Figura 3.1 – Tipos de reatores em bateladas sequenciais (RBS): RBS com alimentação/descarte simultâneos ou volume constante (A) e RBS convencional ou volume variável (B).



3.2.2.4 Tipos de pressão de seleção

A pressão de seleção é uma situação de estresse que induz uma mudança no comportamento da população microbiana, sendo uma peça chave para uma granulação efetiva (ROLLEMBERG et al., 2018). De uma forma geral, o princípio básico desse mecanismo é fazer com que os agregados que tenham baixa capacidade de sedimentação sejam lavados do reator, selecionando e mantendo neste somente os grânulos com boa/ótima sedimentabilidade, fato que ajuda consideravelmente na melhoria da qualidade do efluente tratado final.

Os principais parâmetros do reator para que possa haver uma seleção dos agregados com melhor sedimentabilidade, a fim de obter LGA como lodo predominante, são o tempo de sedimentação, a taxa de troca volumétrica e o tempo de descarte, os quais podem ser matematicamente unificados em um único parâmetro denominado velocidade mínima de sedimentação ($(V_s)_{\min}$) (LIU et al., 2005a).

Uma boa/excelente sedimentabilidade significa que os grânulos possuem uma velocidade de sedimentação (V_s) grande, e, conseqüentemente, o tempo que as partículas levam para chegar até a saída do reator (por exemplo, posicionada na metade da altura útil para um volume de troca de 50%) é pequeno. Isso significa que os agregados que possuem

tempo de sedimentação (t_s) maior que aquele para o qual o reator foi projetado serão descartados, pois se situarão acima da altura de saída, e serão retirados nas sucessivas trocas do RBS(LIU; WANG; TAY, 2005).

A taxa de troca volumétrica pode ser definida como um percentual que representa a permuta de volume dos líquidos misturados no interior do reator e está diretamente ligada à profundidade da porta de descarte (L) deste ou à distância que as partículas percorrem até serem eliminadas na fase de descarte (LIU; WANG; TAY, 2005). Quanto maior o valor de L , maior é o valor de $(V_s)_{min}$ e, conseqüentemente, maior é a pressão de seleção sobre os grânulos.

Por fim, existe um parâmetro denominado tempo de descarte mínimo ($t_{d,min}$), o qual representa um tempo de descarte definido para que a fração de grânulos aeróbios no reator seja a mais próxima possível de 100%, ou seja, quando o processo de granulação está completo. Com isso, sabe-se que se o tempo de descarte (t_d) configurado para determinado reator for maior que $t_{d,min}$, uma parte do licor misto que está acima da altura da porta de descarte continuará sedimentando durante o processo de descarte, diminuindo a pressão de seleção ao longo do tempo (LIU; WANG; TAY, 2005).

Combinando essas três principais pressões de seleção citadas, Liu, Wang e Tay (2005) conseguiram elaborar uma equação que define de maneira mais fácil e prática o parâmetro da velocidade mínima de sedimentação ($(V_s)_{min}$):

$$(V_s)_{min} = \frac{L}{t_s + \frac{(t_d - t_{d,min})^2}{t_d}} \quad (1)$$

Essa fórmula indica que se pode melhorar a seleção de biopartículas para uma rápida granulação através do controle adequado do tempo de sedimentação, do tempo de descarte e da taxa de troca volumétrica do reator.

Os mesmos autores afirmam que é possível observar um aumento na fração de grânulos aeróbios a partir do aumento de $(V_s)_{min}$. Para valores menores que $1,0 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ existe a tendência de se desenvolver somente flocos e nenhum grânulo. Ultrapassando-se esse valor, iniciou-se a formação de grânulos no reator em questão, os quais passam a prevalecer sobre os flocos no sistema a partir de um valor de $4,0 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. Por fim, observou-se que $(V_s)_{min}$ não deveria ser menor do que $8 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ para se obter uma granulação aeróbia melhorada, com um quase domínio de espécies granulares sobre as floculentas.

3.2.2.5 Estabilidade dos grânulos

O conceito de estabilidade abrange não somente a invariabilidade das propriedades de tamanho e bioatividade de um LGA, como também a ausência de desintegração e lavagem de grânulos do reator (FRANCA et al., 2018). Apesar do elevado número de estudos e pesquisas acerca do assunto de granulação aeróbia, as quais relatam suas diversas vantagens em comparação aos processos de tratamento por lodo ativado convencional, a questão da instabilidade dos grânulos, principalmente em operações de reatores a longo prazo, ainda é um grande desafio a ser enfrentado, atrasando a sua aplicação prática em escala real, a partir de um número maior de estações.

Um dos objetivos mais observados na maioria dos estudos recentes é justamente avaliar como os parâmetros de operação do reator podem influenciar e melhorar a estabilidade dos grânulos aeróbios, pois esses fatores estão intimamente relacionados (SHOW; LEE; TAY, 2012). Parâmetros, como carga orgânica, condições do regime *feast/famine*, tensão de cisalhamento, nível de OD e tipo de substrato, podem influenciar nas características morfológicas e de sedimentabilidade dos agregados microbianos, além da distribuição interna dos microrganismos e suas atividades metabólicas. Consequentemente, espera-se que esses fatores também afetem a estabilidade dos grânulos em questão (FRANCA et al., 2018).

Peyong et al. (2012) cultivaram grânulos maduros, com tamanho médio de 2,2 mm, alimentados com esgoto real de baixa carga orgânica ($0,54 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$), os quais sofreram deterioração depois de dois meses de operação. Os grânulos maiores foram se desintegrando aos poucos em pequenos detritos, que eram posteriormente lavados para fora do reator. Ademais, Zhang et al. (2011) reportaram que grânulos aeróbios cultivados sob baixa carga orgânica ($0,58 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) e baixas taxas de aeração, apresentaram estrutura frouxa e porosa e se mostraram instáveis quando atingiam diâmetros maiores que 1 mm. Esse último fato fortalece a teoria de que grânulos pequenos são mais favoráveis para longos períodos operacionais de tratamento de esgotos.

No entanto, altas cargas orgânicas ($7,5 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) apresentaram comportamento semelhante, com o crescimento excessivo de organismos filamentosos, resultando em instabilidade de operação do RBS (BEUN et al., 1999). Essa instabilidade sob alta carga orgânica tem sido indicada como tendo três razões principais: o excesso de crescimento de microrganismos filamentosos (LIU; LIU, 2006), a hidrólise das proteínas intracelulares e degradação do núcleo anaeróbio do grânulo (ZHENG et al., 2006), e a perda da capacidade de agregação das bactérias em decorrência da deficiência de produção de SPE

(ADAV; LEE; LAI, 2010).

Em decorrência dos resultados bastante diferentes em relação à estabilidade dos grânulos com variadas taxas de carga orgânica, pode-se observar que não existe um valor fixo ideal desse parâmetro, o qual pode variar dependendo das outras condições de operação do reator em questão. No entanto, alguns estudos reportaram valores ou faixas de valores ideais para isso. Por exemplo, Kim, Kim e Jang (2008) determinaram que a carga orgânica ideal para a não desintegração dos grânulos era de $2,52 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Tay, Jiang e Tiong-Lee Tay (2004), notaram a impossibilidade de se atingir a granulação com taxas de carga orgânica volumétrica inferiores a $2 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$.

Com relação à taxa de aeração, sabe-se que o suprimento de oxigênio e a tensão de cisalhamento hidrodinâmica são fatores que influenciam na formação e estabilidade dos grânulos aeróbios (TAY; LIU; LIU, 2001a). Estudos indicam que baixos níveis de OD ($0,7 - 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), em decorrência de baixas taxas de aeração, favorecem o crescimento de microrganismos filamentosos, levando ao colapso dos grânulos (LIU; LIU, 2006). Por outro lado, uma alta intensidade de aeração favorece a formação de grânulos estáveis, não somente por impor uma grande tensão hidráulica de cisalhamento, com a consequente compactação dos agregados microbianos, mas também por inibir o supercrescimento de bactérias filamentosas e de grânulos grandes (ADAV et al., 2008).

Mosquera-Corral et al. (2005) provaram isso ao fazerem um experimento no qual foram formados grânulos estáveis sob uma saturação de oxigênio de 70% durante 150 dias, diminuindo posteriormente o valor para 40%, quando se observou o desenvolvimento de organismos filamentosos na superfície dos agregados microbianos, os quais sofreram um processo de desintegração e lavagem do reator. Cabe-se ressaltar que não se tem conhecimento de estudos que sugerissem um valor ideal de taxa de aeração ou de concentração de OD para evitar a limitação do suprimento de oxigênio e a instabilidade dos grânulos, pelo fato de a demanda de oxigênio variar de acordo com a concentração de biomassa, o tamanho do grânulo, o tipo de substrato e a comunidade microbiana presente (FRANCA et al., 2018).

O tipo de substrato utilizado na alimentação do sistema é outro parâmetro que pode influenciar na estabilidade dos grânulos. Por exemplo, observou-se que quando o sistema de LGA era alimentado com glicose, havia a formação de uma morfologia menos densa e superfície filamentosa, em decorrência de uma predominância de organismos filamentosos. Já na presença acetato, era formada uma microestrutura compacta dominada por bactérias em forma de bacilo altamente compactadas (MOY et al., 2002; TAY; LIU; LIU,

2001b). Essas evidências indicam que substratos ricos em energia, como glicose e sacarose, induzem à reprodução de microrganismos filamentosos. Já substratos orgânicos relativamente complexos, como aqueles ricos em carboidratos, que são degradados em vários passos e formam diversos compostos intermediários, produzem grânulos com microestruturas complexas e em camadas, além de uma maior diversidade de microrganismos, incluindo filamentosos. Por fim, substratos mais simples, como acetato e formiato, produzem microestruturas mais simples e uniformes, normalmente formando grânulos densos e compactos (MOY et al., 2002).

Além desses, há pesquisas com vários outros substratos. O uso de fenol como fonte de carbono deu origem a grânulos fortes, porém demandando um elevado tempo para a formação dos grânulos (ADAV et al., 2007). Com propionato, também foi observado um atraso na granulação e a formação de grânulos fortes e de estrutura compacta, podendo ser utilizados para aplicações em longos períodos sem desintegração (LEE et al., 2010). Por fim, Pronk et al. (2015) avaliaram a influência dos compostos intermediários produzidos no período anaeróbio dos RBS, e perceberam que, utilizando-se metanol como substrato, eram gerados metano e dióxido de carbono, dando origem a grânulos instáveis e filamentosos.

O regime de alimentação *feast/famine*, aplicado nos RBS para tratamento de esgoto em escala laboratorial, caracterizado pela alternância de períodos de abundância e escassez de substrato, bem como de altas e baixas concentrações de OD, tem se mostrado como um estimulante do crescimento de grânulos aeróbios densos e lisos (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2000), interferindo em suas estabilidades.

Períodos de *famine* mais longos, resultam em fases de respiração endógena mais longas, produzem grânulos aeróbios pequenos, compactos e fortes (GAO et al., 2011). Foi descoberto, também, que essa condição de longos períodos aeróbios com escassez de alimento induz a um aumento da hidrofobicidade das superfícies das células bacterianas (LIU et al., 2005a; LIU; TAY, 2002), fato que auxilia nos processos de agregação celular. De modo inverso, quando se tem uma predominância do período de *feast* sobre o de *famine*, relata-se um aumento do número de grânulos excessivamente filamentosos (MUDA et al., 2011).

Em contraste a isso, Moghaddam e Moghaddam (2015) cultivaram grânulos aeróbios compactos em RBS, os quais tornaram-se gradualmente instáveis, filamentosos e grandes (2 a 5 mm), devido ao longo período de escassez de substrato (*famine*), causado pelo tempo de aeração prolongado.

Já levando em consideração o fator temperatura, sabe-se que este também afeta a estabilidade dos grânulos, por influenciar diretamente nos tipos de microrganismos e na taxa

de crescimento deles, que estão relacionados à morfologia granular. Observou-se que, fazendo a iniciação de um reator em escala laboratorial com lodo de inóculo a uma temperatura de 8 °C, resultou em um supercrescimento de organismos filamentosos e estruturas irregulares, levando a uma lavagem da biomassa (DE KREUK; PRONK; VAN LOOSDRECHT, 2005). Por outro lado, iniciar a operação do reator em uma temperatura de 20 °C, diminuindo posteriormente para 15 °C e 8 °C, não afetou a estabilidade dos agregados a longo prazo. Por isso, em regiões frias, é mais recomendável que se dê a partida (*start-up*) do reator na estação do verão, pelo fato de a temperatura mais alta acelerar a formação de lodo.

Por fim, com relação ao parâmetro do pH, foi observado que a granulação aeróbia realizada em pH em torno de 4,0 era dominada por fungos, com grânulos chegando a até 7 mm de tamanho, portanto mais fáceis de sofrer desintegração. Já os grânulos cultivados em pH = 8,0 apresentavam uma predominância de bactérias, com tamanho máximo de 4,8 mm (YANG; LI; YU, 2008). Manter o reator sob condições alcalinas de pH suprime efetivamente o supercrescimento de filamentosas nos grânulos aeróbios (WAN et al., 2014).

3.2.2.6 Outras estratégias para promover a granulação e possíveis alternativas

Outras técnicas para facilitar o processo de granulação já foram reportadas pela literatura. Liuet al. (2015) avaliaram o impacto do policloreto de alumínio (PAC) comaplicação 50 mL de PAC com a concentração de 20 g·L⁻¹ antes da alimentação em curto (8 dias) e longo (40 dias) prazo. Em ambas estratégias os autores identificaram uma rápida formação inicial (primeiros 15 dias) de grânulos aeróbios com melhores desempenhos nas características físico-químicas, mais SPE foram produzidas em todos os reatores alimentados com PAC, especialmente para polissacarídeos.

Também já foi avaliado o papel da adição de micropó de lodo (preparado a partir de lodo de águas residuais municipais secas) em um RBS com LGA(LIU et al., 2019). Os autores observaram que a adição de micropó de lodo ajudava na diminuição de microrganismos filamentosos, resultando na diminuição do IVL₅ 172 para 44mL·g⁻¹. Segundo os autores, as colisões físicas com grânulos contendo filamentos,além de melhorar a capacidade de sedimentação de lodo, induziu a maior produção deSPE. Como resultado, houve uma melhoria na eficiência de remoção e estabilidade operacional.

Para facilitar a nucleação dos grânulos aeróbios e favorecer a degradação da piridina, Zhang et al. (2017)utilizaram um biocarvão, obtido através da pirólise da casca de arroz. Para isso, o biocarvão foi aplicado (4g·L⁻¹) no começo da operacionalização do RBS.

Os resultados indicaram que o lodo formado possuía excelente propriedade de sedimentação, alta retenção de biomassa e excelente eficiência de remoção. O conteúdo das SPE no lodo granular aumentou visivelmente na presença do biocarvão. A análise dos principais grupos bacterianos indicou que houve um enriquecimento tanto de espécies relacionadas à agregação microbiana, quanto de espécies degradadoras de piridina.

Nesse sentido, surge como alternativa para incrementar o processo de granulação as cinzas de carvão mineral. Os subprodutos sólidos da combustão do carvão mineral são, em sua maioria, resíduos inorgânicos, sendo conceitualmente separados em cinzas volantes (leves, *flyash*) e cinzas de fundo (pesadas, *bottomash*) de fornalhas. Os compostos oxidados de silício (Si), alumínio (Al), ferro (Fe) e cálcio (Ca) são responsáveis por cerca de 90% da composição das cinzas, enquanto outros elementos como magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), titânio (Ti) e enxofre (S), ocorrem em menores quantidades e são responsáveis por uma pequena porcentagem da composição em massa (TIWARI et al., 2014).

Sendo esse material classificado como resíduo do setor siderúrgico é necessário buscar formas de reutilizar e/ou tratar esse resíduo (CÂNDIDO et al., 2016). As cinzas pesadas já foram reportadas como adsorventes para o tratamento de efluentes têxteis e de metais. Os resultados de Zaharia e Suteu (2013) indicaram moderadas/boas eficiências de remoção de cor (55-83%) e remoção de DQO (44-61%). Porém, não foram encontrados trabalhos relacionados ao uso de cinzas de cinzas de termelétrica em sistemas de LGA.

3.3 Mecanismos de remoção envolvidos na granulação

Dependendo das condições operacionais, o LGA é capaz de realizar quase todos os processos de conversão biológica, como degradação de matéria orgânica, nitrificação de amônio, desnitrificação e remoção de fósforo, principalmente devido a coexistência de populações de diversos microrganismos heterotróficos, nitrificantes e desnitrificantes (YANG; TAY; LIU, 2004). A remoção convencional de nitrogênio requer as condições aeróbias e anóxicas/anaeróbias para a nitrificação da amônia e desnitrificação de nitrato ou nitrito, respectivamente. Além disso, a alternância de períodos com baixo e alto OD é necessária para a remoção completa de nitrogênio (NANCHARAIAH; REDDY, 2018).

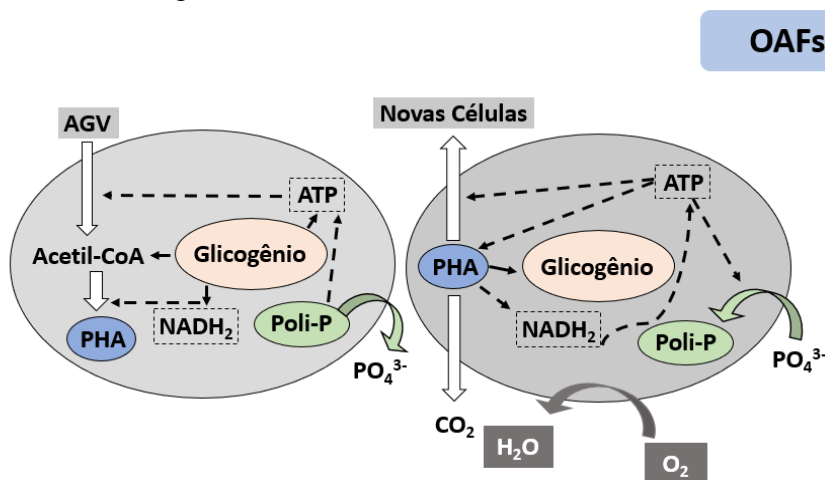
O processo de remoção de nitrogênio em águas residuárias consiste basicamente em duas etapas. A primeira é a nitrificação, onde o nitrogênio amoniacal (NH_4^+) é oxidado a nitrito (NO_2^-), num processo denominado nitrificação, e posteriormente oxidado a nitrato (NO_3^-), num processo chamado nitratação, pelas BOA (bactérias oxidadoras de amônia) e pelas BON

(bactérias oxidadoras de nitrito), respectivamente. A segunda etapa é denominada desnitrificação e consiste na redução do nitrito ou do nitrato a nitrogênio gasoso (N_2) pelas bactérias heterotróficas desnitrificantes (SARMA; TAY; CHU, 2017). Ressalta-se que, além das BOA, pode existir a presença de bactérias anammox, as quais também realizam oxidação de nitrogênio amoniacal, mas de forma anaeróbia e utilizando o nitrito como acceptor de elétrons, em vez do oxigênio (O_2).

Os processos de nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) podem ocorrer em grânulos aeróbios por conta da existência das zonas aeróbias nas camadas externas e zonas anóxicas nas regiões mais internas destes. A nitrificação se dá nas camadas aeróbias exteriores do grânulo, enquanto a amônia é convertida a nitrato, o qual posteriormente é difundido até o interior deste, onde é usado como acceptor de elétrons para a manutenção e crescimento das células em substrato de carbono, via desnitrificação (FRANCA et al., 2018).

As técnicas de remoção de fósforo em reatores contendo LGA se baseiam na capacidade de algumas bactérias heterotróficas realizarem o processo de bioacumulação, que consiste no acúmulo de fosfato em suas células, na forma de polifosfatos (WANG et al., 2008). Sabe-se que os microrganismos denominados OAF (organismos acumuladores de fósforo) têm um potencial de acumular fósforo em suas células, havendo uma simultânea absorção de carbono orgânico solúvel e liberação de fosfato na fase anaeróbia, seguido por uma rápida captura desse íon no estágio aeróbio (Figura 3.2) (ADAV et al., 2008). A remoção do fósforo propriamente dita envolve a sua incorporação na biomassa celular e posterior descarte desta.

Figura 3.2 – Esquema representativo dos processos envolvidos no metabolismo dos organismos acumuladores de fósforo (OAF).



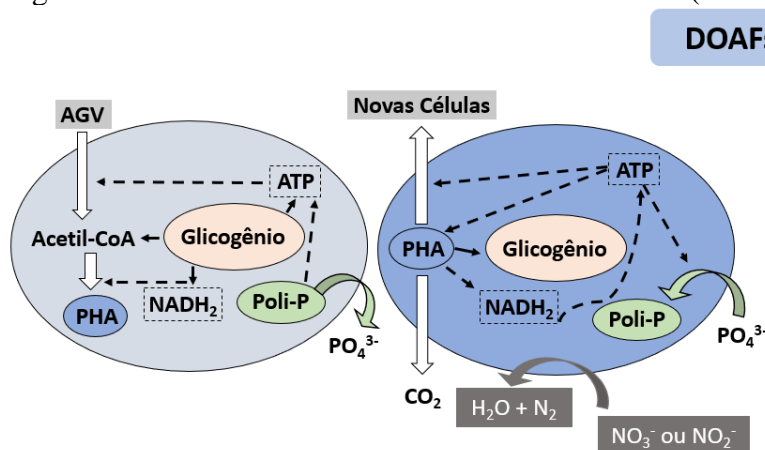
Fonte: Adaptado de Bech (2011).

Além desse grupo de bactérias, há, ainda, os ODAF (organismos desnitrificantes

acumuladores de fósforo), os quais além de estarem envolvidos nos processos de remoção de fósforo também auxiliam nos processos de remoção de nitrogênio, diferenciando-se dos OAF por não utilizarem oxigênio como acceptor de elétrons, e sim, nitrito ou nitrato (Figura 3.3).

Por fim, os processos responsáveis pela remoção de matéria orgânica, na forma de carbono solúvel e quantificada pelo parâmetro DQO envolvem principalmente os organismos heterotróficos (OH) e os organismos acumuladores de glicogênio (OAG) (ROLLEMBERG et al., 2018). Devido à presença das diferentes zonas nos grânulos aeróbios, a remoção de matéria orgânica ocorre simultaneamente à de nitrogênio (FIGUEROA et al., 2009).

Figura 3.3 – Esquema representativo dos processos envolvidos no metabolismo de organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo (ODAF).

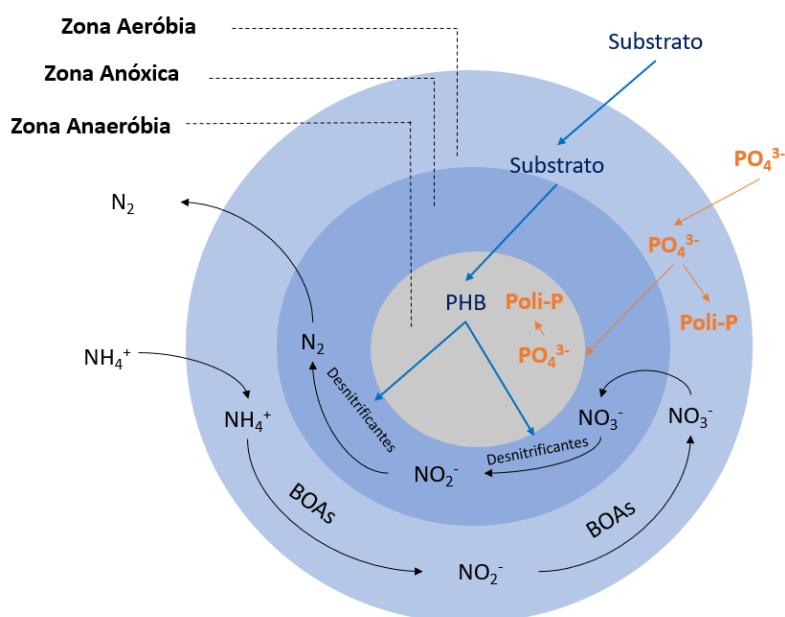


Fonte: Adaptado de Bech (2011).

Após a fase de alimentação do sistema, a concentração de substrato orgânico (fonte de carbono) é elevada, sendo completamente difundido para o interior dos grânulos. Então, este é parcialmente convertido e armazenado na forma de polímero, como os polihidroxibutiratos (PHBs). Nas zonas mais internas, esses PHBs encontram-se disponíveis para serem utilizados como fonte de carbono no processo de desnitrificação, auxiliando na remoção de nitrogênio. Durante a fase anaeróbia do ciclo, a maior parte da DQO é utilizada pelos microrganismos, principalmente por OAG, os quais armazenam o carbono como polímeros intracelulares. Finalmente, durante a fase aeróbia, esses microrganismos oxidam os polímeros armazenados previamente (WAGNER, 2015).

A Figura 3.4 demonstra de maneira clara as zonas presentes nos grânulos, os microrganismos predominantes em cada uma delas e os processos de remoção de nutrientes.

Figura 3.4 – Esquema de transformação dos nutrientes no grânulo.



Fonte: Adaptado de Guimarães (2017) e Nancharaiah e Reddy (2018).

3.3.1 Microrganismos no processo de granulação

3.3.1.1 Organismos Heterotróficos (OH)

Os organismos heterotróficos (OH) são microrganismos que estão relacionados à remoção de DQO (carbono orgânico) dos sistemas de tratamento de esgotos, consumindo a matéria orgânica, representada pelo substrato, e liberando dióxido de carbono e água (ROLLEMBERG et al., 2018). Eles são de crescimento rápido e possuem a capacidade de se manterem estáveis nos sistemas de lodo ativado, porém possuem baixa sensibilidade para variações de oxigênio, pH, temperatura e compostos tóxicos (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999). Os principais grupos de bactérias reportados por serem responsáveis por esses processos são do filo *Chloroflexi*, dos gêneros *Flavobacterium* e *Beggiatoa*, da espécie *Thiothrixnivea*, dentre outras (FIGUEROA et al., 2015; WAN et al., 2015b).

3.3.1.2 Organismos acumuladores de fósforo (OAF)

Os organismos acumuladores de fósforo (OAF) são bactérias de crescimento lento responsáveis pela remoção de fósforo, por meio da bioacumulação desse nutriente no interior

de suas células e posterior lavagem de biomassa para fora do reator. Sob condições anaeróbias, elas armazenam as fontes de carbono na forma de polihidroxialcanoato (PHA), que é posteriormente utilizado como fonte de carbono e energia para o crescimento de biomassa, assim como para a captura de fósforo, sendo esse último processo realizado no período aeróbio do ciclo, utilizando o oxigênio como acceptor de elétrons (FRANCA et al., 2018). *Accumulibacter spp.*, *Rhodocyclus spp.* e *Enterobacter spp.* são os principais OAF observados nos estudos (ROLLEMBERG et al., 2018).

3.3.1.3 Organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo (ODAF)

Os microrganismos que removem fósforo e utilizam nitrito e/ou nitrato como aceptores de elétrons são chamados organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo (ODAF). Diferenciam-se dos OAF pelo fato de utilizarem os PHAs como fonte de elétrons para realizarem desnitrificação (NANCHARAI AH; REDDY, 2018). São classificados como de crescimento lento e levam a uma granulação completa.

3.3.1.4 Organismos acumuladores de glicogênio (OAG)

Os organismos acumuladores de glicogênio (OAG) são microrganismos capazes de, anaerobiamente, armazenar carbono solúvel sob a forma de polímeros lentamente biodegradáveis, resultando em uma taxa de crescimento lento (FRANCA et al., 2018). Os OAG competem com os OAF pelo substrato disponível no meio, sendo a predominância de OAG associada à uma queda na remoção de fósforo (NANCHARAI AH; REDDY, 2018). Diretamente relacionadas à remoção de DQO, os OAG são compostos principalmente pelos grupos *Competibacter*, *Accumulibacter* e *Defluviicoccus* (ROLLEMBERG et al., 2018).

3.3.1.5 Nitrificantes/Desnitrificantes

Em decorrência da nitrificação ocorrer em duas etapas, sabe-se que há dois grupos distintos de bactérias nitrificantes, que são responsáveis pelo processo: as BOA (bactérias oxidadoras de amônia), caracterizadas por realizarem a nitrificação (transformação de amônio em nitrito) e as BON (bactérias oxidadoras de nitrito), responsáveis pelo processo de nitratação (conversão do nitrito em nitrato), ambas utilizando o oxigênio como acceptor de elétrons. As principais BOA são as *Nitrosomonaseuropaea* e as *Paracoccusaminovorans*, e as

BON mais conhecidas são *Nitrospiradefluvii*, *Nitrobacter*, *Nitrospiraceae* e *Bradyrhizobiaceae* (NANCHARAIH; SARVAJITH; LENS, 2018; SZABÓ et al., 2017; WINKLER; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2012).

Já as bactérias desnitrificantes são responsáveis pela redução das formas oxidadas do nitrogênio (nitrito e nitrato), transformando-as em nitrogênio gasoso, o qual é removido do sistema pela sua liberação para o ar. Os grupos de microrganismos responsáveis pelo processo de desnitrificação são os ODH (organismos desnitrificantes heterotróficos), representados principalmente pelos grupos *Pseudomonas*, *Rhizobiales*, *Zoogloea sp.* e *Acinetobacter sp.* (LIN; SHARMA; VAN LOOSDRECHT, 2013; WAN et al., 2015b; WEISSBRODT et al., 2013), os ODAG, responsáveis por realizarem desnitrificação e acumulação de glicogênio, e os ODAF, já citados anteriormente, sendo esses dois últimos geralmente das famílias *Comamonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Rhodobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Rhodocyclaceae*, especialmente dos gêneros *Thauera*, *Zoogloea*, *Meganema*, *Devosia* e *Stenotrophomonas* (WEISSBRODT et al., 2013).

3.4 Remoção de micropoluentes emergentes em LGA

Os fármacos e produtos de higiene pessoal são substâncias, geralmente recalcitrantes, encontradas com frequência nos esgotos, incluindo antibióticos, drogas anti-inflamatórias, perfumes, cosméticos, vitaminas etc. (DAUGHTON; TERNES, 1999). São considerados como micropoluentes emergentes (ME) pelo fato de serem encontrados nas águas residuárias em concentrações muito pequenas (da ordem de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e por ainda não estarem presentes em muitas legislações ambientais (RIVERA-UTRILLA et al., 2013).

No âmbito do tratamento de esgotos, além da baixa concentração de micropoluentes emergentes que requer o uso de técnicas de pré-concentração de amostra e detecção por técnicas cromatográficas, o maior problema reside na ampla gama de compostos considerados ME, o que torna o monitoramento extremamente complicado. Muitos estudos já foram conduzidos tanto em processos anaeróbios quanto aeróbios, que mostram que tanto as eficiências quanto os mecanismos de remoção a partir de processos de adsorção na biomassa, processos metabólicos e cometabólicos, variam bastante conforme a categoria de ME, estrutura química etc.

O conhecimento da capacidade da tecnologia de LGA em biotransformar ME ainda é limitada (MERY-ARAYA et al., 2019), porém já existem estudos utilizando o LGA para remoção de alguns compostos pertencentes a esse grupo. Kent e Tay (2019) operaram um

sistema LGA em RBS volume variável com ciclos de 205 min. e TDH de 8,3 h para remoção de 17 α -etinilestradiol (EE), 4-nonilfenol (NF) e carbamazepina (CBZ), com concentrações de 530, 485 e 510 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. As remoções no sistema foram de aproximadamente 70% para o EE e superiores a 80% para o NF, enquanto, para a CBZ, as remoções foram inferiores a 25%. Os autores observaram que os compostos não interferiram negativamente na formação dos grânulos e na quantidade de biomassa, e apresentaram efeito mínimo nas remoções de DQO e nutrientes.

Moreira et al. (2015) também operaram um LGA em RBS convencional na presença de fluoxetina (FLX), porém o período de operação foi dividido em sete fases com ciclos variando de 3 a 12 h. A remoção da FLX, de concentração inicial entre 3 e 4 μM , ocorreu por adsorção/dessorção nos grânulos aeróbios, e as eficiências de remoção de DQO, nitrogênio e fósforo não foram prejudicados. Os autores afirmam também que a estrutura LGA protegeu a população microbiana dos efeitos tóxicos da FLX, resultando na manutenção dos principais processos biológicos.

De acordo com os dois trabalhos citados, a presença dos micropoluentes não afetou de forma negativa o sistema e suas eficiências de remoção. Em contrapartida, Amorim et al. (2016) operaram um LGA em RBS convencional com ciclos de 6 h, TDH de 9,7 h e taxa de troca volumétrica de 40% para avaliar a influência de oito fármacos quirais (alprenolol, bisoprolol, metoprolol, propranolol, venlafaxina, salbutamol, fluoxetina e norfluoxetina), com concentração de 1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cada, na estrutura do sistema. Os resultados mostraram que esses compostos foram removidos em maior parte por adsorção no lodo, porém afetaram a remoção de DQO, fósforo e nitrogênio, desestabilizaram os grânulos e prejudicaram o metabolismo dos organismos acumuladores de fosfato (OAF).

A partir dessas informações, pode-se perceber que, dependendo do ME presente no sistema, o LGA reage de forma diferente. Ademais, para vários ME como os parabenos, ainda não há relatos de remoção em sistemas de LGA nem do seu impacto sobre a formação e a estabilidade dos grânulos.

3.4.1 Parabenos

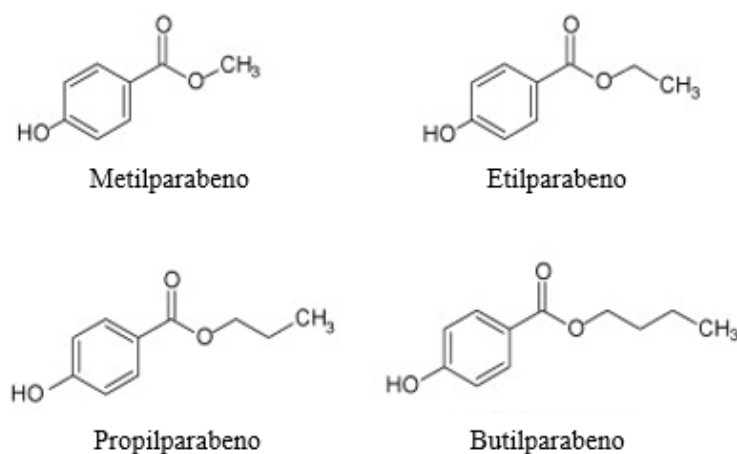
Os parabenos são uma classe de compostos usados como conservantes desde 1920 em produtos farmacêuticos, alimentícios e cosméticos (HAMAN et al., 2015). Quanto à composição química, os parabenos são ésteres do ácido para-hidroxibenzoico, e os mais conhecidos são o metilparabeno (MeP), o etilparabeno (EtP), o propilparabeno (PrP), o

butilparabeno (BuP), o benzilparabeno e o heptilparabeno (MA et al., 2018a). Todos esses compostos possuem estrutura química semelhante, formada por um anel aromático ligado a uma hidroxila e um grupo éster. Ao grupo éster é ligada a cadeia de hidrocarbonetos que diferencia cada um. Dentre eles, os mais comumente encontrados no meio ambiente são o MeP, o EtP, o PrP e o BuP (Figura 3.5), sendo, geralmente, o MeP o de maior concentração ($\leq 200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), seguido pelo PrP ($\leq 50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto os demais se apresentam em concentrações de poucos $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (BŁEDZKA; GROMADZIŃSKA; WASOWICZ, 2014; HAMAN et al., 2015).

Já foi observado que essas substâncias causam diversos problemas à saúde do ser humano e dos demais seres, como alterações das glândulas suprarrenais e da tireoide causadas pela exposição aos parabenos (NOWAK et al., 2018). Esses compostos também estão associados ao surgimento de câncer de mama em mulheres (DARBRE et al., 2004).

A exposição acontece, além das formas diretas (via oral ou cutânea), pelo lançamento de esgotos não tratados e/ou de efluentes de estações de tratamento de esgotos (ETE) nos corpos hídricos, podendo ocorrer bioacumulação nos organismos aquáticos (BŁEDZKA; GROMADZIŃSKA; WASOWICZ, 2014; HAMAN et al., 2015; NOWAK et al., 2018). Outro ponto que cabe ressaltar é que a ocorrência de reações químicas desses compostos com o cloro residual oriundo da água de torneira ou dos processos de cloração das estações de tratamento de água (ETA), formando os parabenos clorados, compostos mais estáveis e com potencial estrogênico desconhecido, além de serem mais tóxicos para os organismos aquáticos (CANOSA et al., 2006). Sendo assim, são fundamentais os estudos para remoção desses compostos em ETA e ETE.

Figura 3.5 – Estrutura química dos parabenos mais comumente encontrados no meio ambiente.



Fonte: Adaptado de Boberget al. (2010).

No entanto, existem poucos trabalhos sobre a remoção de parabenos em sistemas biológicos de tratamento de esgotos, sendo mais utilizadas tecnologias aeróbias, como o LA e variantes (Tabela 3.1). Em ETEs compostas por LA, foram registradas eficiências globais de remoção superiores a 60% para os parabenos MeP, EtP, PrP e BuP (GONZÁLEZ-MARIÑO et al., 2011; KARTHIKRAJ et al., 2017; LI et al., 2015). González-Mariño et al. (2011) afirmam que não observaram alterações em nenhum composto durante todo o estudo, provando que não ocorreu adsorção nem degradação devido a processos abióticos e que as perdas nas soluções foram atribuídas às rotas biológicas (biotransformação).

Ma et al. (2018) analisaram a remoção de parabenos em duas ETEs na China, uma composta por lodo ativado cíclico e a outra por reator anaeróbio/óxico com circulação para o segundo reator. As eficiências globais de remoção nas duas ETE foram superiores a 94%, e, quando compararam todas as unidades de tratamento de cada uma, verificaram que as concentrações de parabenos diminuíram acentuadamente nas unidades de tratamento biológico. No entanto, as concentrações de parabenos no tanque anaeróbio foram menores do que no tanque aeróbio seguinte, levando os autores a supor que isso acontece porque o lodo foi devolvido ao tanque aeróbio.

Em uma ETE composta por valo de oxidação seguido de desinfecção por radiação ultravioleta (UV), foram observadas eficiências globais de remoção de MeP e PrP variando de 81 a 91% e 63 a 98%, respectivamente (SUN et al., 2014). No entanto, não foi especificado que unidade do tratamento foi responsável pela maior contribuição na remoção desses compostos, embora grande parte dos parabenos tenha sido encontrada adsorvida na fração sólida do tratamento primário, chegando a 71% para o MeP e 50% para o PrP.

Por outro lado, em uma ETE com reator anaeróbio/anóxico/aeróbio em que foram monitorados 49 micropoluentes, dentre eles o MeP e o PrP, mais de 70% da remoção dos parabenos foi atribuída à biodegradação, sendo apenas uma pequena quantidade encontrada adsorvida no lodo e nos sólidos suspensos (ASHFAQ et al., 2017).

Com relação à biodegradação dos parabenos, a literatura reporta algumas possibilidades de rotas sob condições aeróbias. Valkova et al., (2001) testaram a degradação de parabenos por cepas isoladas de *Enterobacter cloacae* cultivadas em meio ágar contendo MeP e PrP, separadamente, e verificaram que a rota de degradação desses compostos, sob essas condições específicas, aconteceu através da hidrólise da ligação éster formando o ácido 4-hidroxibenzoico, seguida da descarboxilação em condição aeróbia formando fenol.

Tabela 3.1 – Eficiência de remoção de parabenos em diferentes tipos de tratamento biológicos (continua).

Tipo de tratamento	Composto	Concentração afluente (ng·L ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)	de Referência
Lodo ativado	MeP	567,0	98,8	Li et al. (2015)
	EtP	140,0	99,8	
	PrP	438,0	99,9	
	BuP	27,9	99,7	
Lodo ativado	MeP	4200	99,4	González-Mariño et al. (2011)
	EtP	880	99,5	
	PrP	1400	99,7	
	BuP	140	98,4	
Lodo ativado	MeP	151,0	81,4	Karthikraj et al. (2017)
	EtP	40,5	80,1	
	PrP	68,1	85,7	
	BuP	10,5	79,8	
Lodo ativado	MeP	51,0	91,3	Karthikraj et al. (2017)
	EtP	11,6	83,8	
	PrP	38,2	92,7	
	BuP	8,9	66,9	
Lodo ativado	MeP	267,0	86,6	Karthikraj et al. (2017)
	EtP	58,4	83,3	
	PrP	583,0	96,7	
	BuP	4,4	100,0	
Lodo ativado	MeP	138,0	79,0	Karthikraj et al. (2017)
	EtP	16,2	75,9	
	PrP	50,2	63,4	
	BuP	5,2	100,0	
Lodo ativado	MeP	209,0	80,4	Karthikraj et al. (2017)
	EtP	53,0	86,4	
	PrP	55,4	84,8	
	BuP	4,1	100,0	

Tabela 3.1 – Eficiência de remoção de parabenos em diferentes tipos de tratamento biológicos (conclusão).

Tipo de tratamento	Composto	Concentração afluente (ng·L ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)	de Referência
--------------------	----------	---	---------------------------	---------------

Lodo ativado	MeP	36,8	95,8	Wang e Kannan (2016)
	EtP	4,0	89,8	
	PrP	12,9	88,5	
	BuP	5,8	70,8	
Lodo ativado	MeP	97,9	95,2	Wang e Kannan (2016)
	EtP	2,75	90,1	
	PrP	20,9	95,0	
	BuP	7,2	91,1	
Lodo ativado cíclico	MeP	1310,0	94,9	Ma et al. (2018)
	EtP	362,0	99,5	
	PrP	496,0	97,2	
	BuP	7,0	96,1	
Reator anaeróbio/óxico	MeP	968,0	94,1	Ma et al. (2018)
	EtP	133,0	98,6	
	PrP	364,0	97,8	
	BuP	29,3	99,9	
Valo de oxidação + radiação UV	MeP	150,0-270,0	81,6-91,0	Sun et al. (2014)
	PrP	130,0-400,0	63-98,0	
Reator anaeróbio/anóxico/óxico	MeP	128,0-244,0	70,5-97,6	Ashfaq et al. (2017)
	PrP	96,2-212,0	75,5-98,5	

Wu et al. (2017), ao analisarem a degradação de MeP e PrP, identificaram o ácido benzoico como intermediário. Os autores, então, inferiram que a biodegradação dos parabenos selecionados ocorreu por clivagem das ligações de carbono presentes nas cadeias carbônicas por microrganismos aeróbios, porém não identificaram os grupos taxonômicos específicos. Os autores relatam ainda que o ácido p-hidroxibenzoico, metabólito comum relatado de todos os parabenos, não foi detectado nas amostras coletadas e nem nas soluções padrão de MeP e PrP. Dessa forma, eles concluem que é possível que o ácido p-hidroxibenzoico seja oxidado a ácido benzoico por microrganismos durante o rápido processo de degradação aeróbia.

Outra hipótese existente é a de que ocorra a transesterificação entre os parabenos e álcoois. Wang et al. (2018a) descobriram que, quando o metanol ou o etanol estão presentes no lodo ativado, a transesterificação é muito importante para a degradação dos ésteres do ácido para-hidroxibenzoico (parabenos) e que, nas soluções de lodo ativado com adição de 1% de metanol, a contribuição da transesterificação para a degradação do PrP e do EtP representou 46% e 83%, respectivamente, no estágio inicial da reação. Isso indica que em ambientes aquáticos com presença de álcoois, os parabenos preferem formar homólogos de moléculas pequenas do que a hidrólise em ácido.

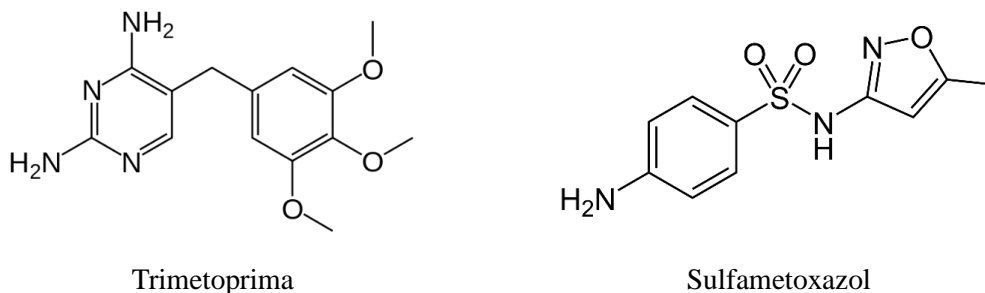
Com relação aos metabólitos de parabenos, a literatura reporta que os parabenos podem se degradar em seus metabólitos sob certas condições, e esses compostos são frequentemente presentes nos sistemas de tratamento de águas residuárias, indicando seu papel como poluentes comuns nas águas e esgotos (MA et al., 2018a). O protocatecuato de metila (OH-MeP) e o protocatecuato de etila (OH-EtP) são metabólitos dos parabenos correspondentes produzidos através de processos de hidroxilação. O ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB) é o principal metabólito comum de todos os parabenos, mas o 4-HB possui propriedades estrogênicas, que podem ter efeitos de toxicidade e autotoxicidade no crescimento e desenvolvimento das plantas. Além disso, a hidroxilação do ácido 4-HB ao 3,4-di-hidroxibenzoico (3,4-DHB) também foi relatada em estudos com animais de laboratório (BOBERG et al., 2010; MA et al., 2018a). Além desses quatro compostos, Karthikraj et al. (2017) mencionam a presença do metabólito ácido benzoico (AB) tanto em amostras afluentes como efluentes nas ETEs.

Além disso, os derivados diclorados são altamente resistentes a sofrer mais reações de oxidação, e sua presença foi encontrada pela primeira vez em amostras de água de esgoto. Se quantidades mínimas de brometo são apresentadas em fontes de água da torneira, as reações de halogenação são deslocadas para a produção de parabenos bromados (CANOSA et al., 2006; LI et al., 2015).

3.4.2 Trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX)

As sulfonamidas, grupo que reúne antibióticos formados por amidas de ácidos sulfônicos no qual o sulfametoxazol (SMX) é um dos principais representantes, foram os primeiros antimicrobianos bacteriostáticos utilizados sistemicamente para a prevenção e a cura de infecções no mundo (KASSOTAKI et al., 2016). Todavia, a introdução da combinação de trimetoprima (TMP) com o SMX (Figura 3.6) aumentou a utilização dessa classe terapêutica no tratamento de infecções específicas, pois esses dois antibióticos têm como alvo duas partes da via de síntese bacteriana do ácido tetraidrofólico, que é um cofator importante, por exemplo, para a síntese de DNA (BROGDEN et al., 1982).

Figura 3.6 – Estrutura química dos antibióticos Trimetoprima (TMP) e Sulfametoxazol (SMX).



No entanto, essa associação requer atenção, visto que vários trabalhos já encontraram evidências de que esses fármacos podem gerar impactos sobre o ambiente. Quanto à TMP, há registros de seu efeito negativo sobre células de mexilhões (BINELLI et al., 2009; MATOZZO et al., 2015), mamíferos e peixes (PAPIS; DAVIES; JHA, 2011). Por sua vez, o SMX é capaz de afetar o crescimento populacional de algas e crustáceos (ISIDORI et al., 2005), além de haver relatos de seu impacto transgeracional sobre nematoides (YU et al., 2017). Com isso, muitos estudos tentam encontrar a melhor tecnologia para remover esses antibióticos no efluente. A Tabela 3.2 apresenta alguns estudos que avaliaram o potencial de remoção associado à remoção de C, N e P de águas residuárias.

Alvarino et al. (2014), utilizando um reator aeróbio inoculado com LAC e um reator anaeróbio do tipo UASB, estudaram a remoção de 16 fármacos e produtos de higiene pessoal diferentes, entre eles, TMP e SMX, e encontraram uma superioridade dos sistemas anaeróbios sobre os aeróbios, com cerca de 95% para TMP e 90% para SMX no reator UASB, e de < 10% para TMP e em torno de 40% para SMX no LAC. Por outro lado, Jewell et al. (2016) obtiveram uma remoção média de 83% para TMP em LAC, e Kang et al., (2018b) alcançaram remoções de SMX próximas a 84% e 73%, em sistemas LGA e LAC,

respectivamente.

Inicialmente uma parte dos compostos TMP e SMX presentes nos esgotos são adsorvidos pela biomassa, com posterior remoção a partir de biodegradação ou pelo lodo excedente (SUÁREZ et al., 2008). Uma outra parte pode ser biodegradada/biotransformada a partir do meio líquido ou sair do sistema sem tratamento. Entretanto, a depender do composto e do tipo de sistema utilizado, pode haver a predominância de um dos mecanismos. No caso dos antibióticos TMP e SMX, por exemplo, Alvarino et al. (2014) encontraram que o mecanismo de biodegradação foi o predominante na remoção tanto com LAC quanto com reator UASB.

Outra possibilidade para facilitar a remoção desses antibióticos é a fonte de carbono. Mery-araya et al. (2019) realizaram testes com o lodo granular proveniente de SBR cultivados com acetato ou glicerol e registraram que a biomassa cultivada com acetato removeu menos TMP (12%) e SMX (8%) do que aquela cultivada com glicerol (16% para o TMP e 36% para o SMX). Segundo os autores, fontes de carbono mais complexas gerariam comunidades mais diversas, as quais teriam maior capacidade de degradar poluentes. Tendo em vista que Jewell et al. (2016) operaram um reator alimentado com esgoto real, contendo fontes mais complexas que o acetato e chegaram a remoções de TMP superiores a 83%, esse fator pode ter contribuído para a diferença de remoção entre os estudos.

Muitos trabalhos têm relatado que as remoções de TMP e SMX estão relacionadas às atividades das BOA (BATT; KIM; AGA, 2006; KASSOTAKI et al., 2016; YI; BARR; HARPER, 2012). Kassotaki et al. (2016) sugeriram que as nitrificantes poderiam cometabolizar o SMX produzindo a enzima mono-oxigenase, capaz de oxidar ME. Para o composto TMP, Yi, Barr e Harper (2012) também encontraram remoções maiores em reatores com bactérias nitrificantes quando comparado ao reator com a presença de heterotróficos. Também bactérias dos gêneros *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukumurella*, *Achromobacter* e *Ralstonia* aclimatadas com sulfametoxazol, carbamazepina e diclofenaco, foram capazes de mineralizar SMX (BOUJU et al., 2012). Por fim, culturas de *Pseudomonas*, *Brevundimonas* e *Variovorax*, isoladas de uma amostra de lodo ativado, mostraram potencial para usar o SMX como a única fonte de carbono e de nitrogênio para o crescimento celular (HERZOG et al., 2013).

Tabela 3.2 – Tecnologias de tratamento de águas residuárias para remover TMP e SMX (Continua).

Composto	Concentração afluente	Tecnologia	Eficiência de remoção	Idade de lodo (dias)	Remoção de C, N P (%)	Retenção de biomassa (gSSV·L ⁻¹)	IVL (mL·g ⁻¹)	Tamanho médio das partículas	Referência
TMP e SMX*	10 ng·L ⁻¹	LA	≈ 0% (TMP) ± 40% (SMX)	-	DQO: 92±5% NH ₄ ⁺ : 98±2%	1,8	-	107 µm	(ALVARINO et al., 2014)
		UASB	> 95% (TMP) ± 90% (SMX)	-	DQO: 95±5%	-	-	2.7 mm	
SMX*	50 µg·L ⁻¹	RBS	60-72%	-	-	2,25 - 3	IVL ₃₀ : 137-62	64% SST 2-4mm	(ZHAO et al., 2015b)
TMP	20-225 ng·L ⁻¹ (esgoto real)	LA nitrificação/desnitrificação RBS em escala piloto	>83% após a partida	10	DQO: 60% NH ₄ ⁺ : 95%	3,1	-	-	(JEWELL et al., 2016b)
SMX	2 µg·L ⁻¹	LA -RBS (Reatores S1 - S3)	S1: Controle S2: 75(11)% S3: 72(11)%	10	DQO S1, S2,S3: 96±1% NT S1: 47±7%; S2: 49±4% S3: 50±6% PT S1, S2:91±9%; S3:93±8%	S1:2,3±0,3 S2:2,3±0,3 S3:2,2±0,3	IVL ₃₀ : 50	-	(KANG et al., 2018a)
		LGA-RBS (Reatores G1 - G3)	G1: Controle G2: 83(7)% G3: 86(9)%	G1: 23±8 G2: 24±13 G3: 28±17	DQO G1, G2, G3: 96±1% NT G1: 43±7%; G2: 45±5%; G3: 44±7% PT G1, G2: 87±13%; G3:89±13%	G1:2,8±0,6 G2:2,6±0,4 G3:2,8±0,6	IVL ₅ : 50	Diâmetro médio de 0,6mm	

Tabela 3.2 – Tecnologias de tratamento de águas residuárias para remover TMP e SMX (Continua).

Composto	Concentração afluente	Tecnologia	Eficiência de remoção	Idade de lodo (dias)	Remoção de C, N P (%)	Retenção de biomassa (gSSV·L ⁻¹)	IVL (mL·g ⁻¹)	Tamanho médio das partículas	Referência
SMX*	50 µg·L ⁻¹	LGA-RBS (Reatores R1-R3)	Dias 1-32 R1: 89±9% R2: 90±7% R3: 91±9% Dias 33-50 R1: 78±11% R2: 85±12% R3: 89±8%	R1: 11 R2: 16 R3: 22	DQO R1: 94%; R2: 92%; R3: 94% PT R1: 33%; R2: 34% R3: 34% NH ₄ ⁺ R1: 41%; R2: 46% R3: 66% NT R1: 27%; R2: 30% R3: 35%	R1: 6,4 ±0,95 R2: 9,1±0,93 R3: 11,8 ±0,88 O SSV foi mentido constante pelo controle da idade de lodo	SVI ₅ R1: 20±1 R2: 20±1 R3: 21±2	R1: 670 µm R2: 687 µm R3: 652 µm	(LIU et al., 2019b)
TMP e SMX*	750 µg/L**	Testes em batelada com adição de TMP e SMX foram realizados com dois LGA-RBS (um cultivado com acetato e outro com glicerol)	Reator Acetato 12% (TMP) 8% (SMX) Reator Glicerol 16% (TMP) 36% (SMX)	-	-	-	-	-	(MERY-ARAYA et al., 2019)
SMX*	49 µg·L ⁻¹	Digestão anaeróbia de lodo Mesofílica (37°C) (Etapa M30, M20, M10)	M30 ≈100% M20 ≈100% M10 ≈100%	M30:30 M20:20 M10:10	DQO M30: 73,0±4,8% M20: 62,2±8,7% M10: 51±7,5%	-	-	-	(CARBALLA et al., 2007)
		Digestão anaeróbia de lodo Termofílica (55°C) (Etapa M30, M20, M10)	T20: 96% T10: 99% T6: 98%	T20: 20 T10: 10 T6: 6	DQO T20: 69±4,8% T10: 64,8±4,1% T6: 55,9±2%				

Tabela 3.2 – Tecnologias de tratamento de águas residuárias para remover TMP e SMX (conclusão).

Composto	Concentração afluente	Tecnologia	Eficiência de remoção	Idade de lodo (dias)	Remoção de C, N P (%)	Retenção de biomassa (gSSV·L ⁻¹)	IVL (mL·g ⁻¹)	Tamanho médio das partículas	Referência
TMP e SMX***	SMX: 1, 2, 5 e 10 µg·L ⁻¹ TMP: 1 µg·L ⁻¹	<i>Extended sludge age biological process</i>	74% (TMP)	> 200	DQO: 95±5%	-	-	-	(YU et al., 2009)
			91% (1 µgSMX·L ⁻¹) 90% (2 µgSMX·L ⁻¹) 85% (5 µgSMX·L ⁻¹) 76%(10 µgSMX·L ⁻¹)						
SMX	10 e 100 µg·L ⁻¹	LA -RBS operado para enriquecer a população de bactérias oxidantes de amônia (BOA)	Etapa I (10 µgSMX·L ⁻¹): 98,3±3,2)% Etapa II (100 µgSMX·L ⁻¹): 97,6±3,2)%	-	NH ₃ >99%	-	-	-	(KASSOTAKI et al., 2016)

LA: Lodo Ativado; UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket; LGA-RBS- Reator em Bateladas Sequenciais -lodo granular; DQO: Demanda Química de Oxigênio; COD: Carbono Orgânico Dissolvido; NT: nitrogênio total; PT: Fósforo total; *Adicionado entre outros produtos farmacêuticos; ** concentração no interior do reator, não afluente; *** Adicionado individualmente.

3.4.3 Antraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS) e micropoluentes

Os mediadores redox são capazes de transferir elétrons em reações de oxidação e redução entre uma grande variedade de compostos inorgânicos e orgânicos envolvidas em meios abióticos e biológicos. Essas substâncias podem acelerar a transferência de elétrons ou se comportarem como aceptores finais de elétrons (MARTINEZ, ZHU, LOGAN, 2017; SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007; VAN DER ZEE; CERVANTES, 2009). Além disso, a redução do mediador pode estar ligada à oxidação de substratos orgânicos por microrganismos. Além do antraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS), também pode-se citar a riboflavina, antraquinona-2-sulfonato (AQS), fenazina, entre outros (DOS SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007).

A literatura já reportou muitos trabalhos que avaliaram o AQDS como auxiliador na degradação de muitos compostos poluidores, como corantes (SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007), cromo (IV) (MENG et al., 2018), pentaclorofenol (CHEN et al., 2016), pesticidas (LIU; XU; FAN, 2015) e solventes e detergentes industriais (AULENTA et al., 2010). Liu, Xu e Fan (2015) avaliaram a função do ácido cítrico e AQDS na aceleração da descloração redutiva do DDT em condições anaeróbias com óxido de ferro em abundância em quatro situações: controle, apenas ácido cítrico, apenas AQDS e a união de ácido cítrico e AQDS. Os resultados indicaram que tanto o ácido cítrico como o AQDS podem acelerar a descloração do DDT. A redução do potencial de oxirredução acelerou a redução microbiana de óxidos de Fe (III) para gerar Fe (II), aumentando a taxa de descloração redutiva do DDT.

SILVA et al. (2012) estudaram o impacto AQDS na descoloração redutiva do corante azo vermelho reativo 2 (RR2, *reactivered* 2) em sistemas anaeróbios de um (metanogênico) e dois estágios (acidogênico seguido de metanogênico). Os autores observaram que a adição de AQDS acelerou a transferência de elétrons do substrato (etanol) para o corante, o que aumentou a eficiência de remoção de cor dos dois sistemas anaeróbios.

Com relação a SMX, Zhou et al. (2018) testaram a possibilidade de melhorar a degradação do SMX pelo AQDS e a riboflavina juntamente com a redução de Fe (III) por *Shewanella oneidensis* MR-1 e observaram que a taxa de degradação do SMX foi gradualmente aumentada com o aprimoramento da redução de ferro. No entanto, a riboflavina teve um melhor desempenho na degradação de SMX e redução de ferro do que o AQDS. Não foram encontrados trabalhos que relacionam o AQDS a TMX, assim como em sistemas aeróbios.

BARROS, A. R. M. et al. Effect of calcium addition on the formation and maintenance of aerobic granular sludge (AGS) in simultaneous fill/draw mode sequencing batch reactors (SBRs). *Journal of Environmental Management*, v. 255, p. 109850, 1 fev. 2020.

4 CAPÍTULO II –EFEITO DA ADIÇÃO DE CÁLCIO NA FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA) EM REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS (RBS) DE ALIMENTAÇÃO/DESCARTE SIMULTÂNEOS

4.1 Introdução

Lodo granular aeróbio (LGA) é uma tecnologia considerada promissora no tratamento biológico de águas residuárias, não só devido a sua excelente robustez e sedimentabilidade, mas por permitir a remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo (LOCHMATTER et al., 2013). Adicionalmente, quando comparada ao sistema lodo ativado convencional, a tecnologia LGA possui menor custo operacional (20-25%) e energético (23-40%), além de requerer menor espaço (50-75%) (ADAV et al., 2008; BENGTTSSON et al., 2018; NEREDA, 2017).

A maioria das investigações no cultivo e manutenção do LGA foi realizada em RBS convencional, em que alimentação, reação, sedimentação e descarte são em função do tempo (JIANG et al., 2003; L. LIU et al., 2010). O modo de alimentação e descarte simultâneos (alimentação e descarte – reação – sedimentação) é outra forma de operar esse tipo de reator, isto é, a volume constante. Nesse sistema, a solução de alimentação é bombeada na parte inferior do reator e, à medida que o afluente entra, o efluente tratado sai pela parte superior (DERLON et al., 2016; Q. WANG et al., 2018).

Embora a maior parte dos reatores biológicos das estações de tratamento de esgoto (ETE) seja projetada para operar a volume constante, cujo principal exemplo é a tecnologia Nereda®, há uma escassez de estudos aprofundados referentes a esse regime (DERLON et al., 2016; Q. WANG et al., 2018; NEREDA, 2017). Nesse contexto, foi reportado que em RBS a volume constante a granulação é alcançada através de alta velocidade ascensional do líquido ($16 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$), que causava a lavagem do lodo floculento (DERLON et al., 2016). No entanto, Q. WANG et al. (2018) obtiveram mais de 50% de lodo granular (diâmetro maior que 0,2 mm) operando um RBS, a volume constante e em escala

laboratorial, com velocidade ascensional do líquido em torno de $0,67 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. Isso indica que é possível atingir a granulação com baixas velocidades, o que implica na redução dos custos ao se utilizar bombas menos potentes.

Também é possível que a adição de cátions bivalentes compense a baixa pressão de seleção causada pela baixa velocidade de alimentação, permitindo não somente que a granulação ocorra, como também em um menor tempo e que o sistema mantenha uma boa estabilidade operacional em longos períodos de operação. Nesse sentido, várias pesquisas já reportaram os benefícios dos íons no processo de granulação, mas usualmente investigadas em BRS convencional.

Por exemplo, Jiang et al. (2003) trabalhando com RBS convencional encontraram que a adição de cálcio promoveu a formação do grânulo mais rapidamente (redução de 32 para 16 dias) e com diâmetro maior (aumento de 2 para 2,8 mm). Além disso, melhorou a retenção de biomassa (aumento de 2,0 para 7,9 $\text{g SS}\cdot\text{L}^{-1}$) e a sedimentabilidade (Índice Volumétrico de Lodo em 30 min., IVL_{30} , passou de 150 para 100 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$). L. Liu et al. (2010) usando magnésio em RBS convencional também observaram uma redução no tempo de granulação de 32 para 18 dias, um aumento do tamanho do grânulo de 1,8 para 2,9 mm, assim como melhoria na retenção de biomassa (de 6,8 para 7,6 $\text{g SS}\cdot\text{L}^{-1}$). Entretanto, a sedimentabilidade dos grânulos permaneceu quase constante (IVL_{30} entre 20 e 25 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$).

De forma geral, sugere-se que os cátions bivalentes ajam de três formas nos sistemas LGA: (I) atuam como uma ponte entre a carga negativa dos polissacarídeos e a superfície microbiana, facilitando a agregação; (II) aumentam a produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE); e (III) precipitam e funcionam como uma superfície onde os microrganismos podem se ligar (JIANG et al., 2003; REN et al., 2008). Adicionalmente, alguns desses íons são importantes cofatores das enzimas envolvidas no metabolismo de remoção de carbono, nitrogênio e fósforo (LIU; TAY, 2002).

Ademais, existem poucas informações relativas ao efeito do cálcio na comunidade bacteriana do LGA. Foi reportado que esse cátion teve efeito negativo na bioatividade do grânulo, reduzindo as taxas de utilização de oxigênio (L. LIU et al., 2010), assim como a sua precipitação no núcleo do grânulo impediu a sobrevivência de microrganismos na região, devido às limitações de transferência de massa (REN et al., 2008).

Portanto, esse estudo investigou o efeito da adição de Ca^{2+} na formação e manutenção do LGA em RBS com alimentação e descarte simultâneos operado com baixa velocidade ascensional do líquido ($0,92 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) a fim de verificar se a presença do cátion compensa a pequena pressão de seleção imposta. Além disso, foram analisadas as remoções

de carbono, nitrogênio e fósforo; estabilidade operacional do sistema, características dos grânulosos vários estágios de formação e maturação, assim como da comunidade microbiana formada, a partir de análise de metagenoma.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Configuração do sistema

Dois RBS idênticos foram utilizados. Os reatores tinham diâmetro de 100 mm e altura total de 1 m, isto é, razão entre altura e diâmetro (H/D) de 10. O volume útil, tempo de detenção hidráulica (TDH) e taxa de troca volumétrica foram 7,2 L, 12 h e 50%, respectivamente. O reator R1 foi usado como controle e o R2 suplementado com cálcio ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ca^{2+} utilizando CaCl_2). A solução de alimentação foi bombeada, na parte inferior do reator, por uma bomba peristáltica (Masterflex, modelo BTG 2344) com uma velocidade ascensional do líquido de $0,92 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. Enquanto ocorria a alimentação, o efluente tratado era automaticamente descartado pelo extravasor (parte superior do reator).

Foi adotado o mesmo ciclo de 6 h para os dois reatores. A fase I foi composta por 30 min. de alimentação/descarte, 90 min. de período anaeróbio, 210 min. de período aeróbio e 30 min. de sedimentação. Nas demais etapas, o tempo de sedimentação foi reduzido de 30 para 15 min. (fase II), 10 min. (fase III) e 5 min. (fase IV). Cada fase foi mantida por cerca de seis semanas.

A fim de manter constante o tempo total do ciclo, o tempo reduzido na fase de sedimentação era adicionado ao período aeróbio. A taxa de aeração utilizada foi de $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, resultando em uma velocidade ascensional de gás de $2,12 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ e concentração de oxigênio dissolvido (OD) entre $6\text{-}8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Durante o período anaeróbio não foi utilizado nenhum agitador.

O efluente sintético era composto por $800 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol como fonte de carbono, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de N-NH_4^+ (NH_4Cl) como fonte de nitrogênio, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de P-PO_4^{3-} (KH_2PO_4) como fonte de fósforo, $1 \text{ g NaHCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ como fonte de alcalinidade, e $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de solução de micronutrientes preparada de acordo com Rollemberg et al. (2019). Conforme mencionado anteriormente, a solução de alimentação do reator R2 foi suplementada com $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ca^{2+} (CaCl_2). A alimentação foi armazenada em um refrigerador a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante aproximadamente dois dias a fim de evitar a degradação.

O lodo de inóculo foi coletado de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do

tipo lodo ativado convencional localizada em Fortaleza, Ceará, Brasil. Foram adicionados aproximadamente 3,6 litros de lodo com concentração inicial de Sólidos Suspensos Voláteis no Licor Misto (SSVLM), tanto no R1 quanto no R2, de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O Índice Volumétrico de inicial em 30 min. Lodo (IVL₃₀) foi de $110 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$. Os sistemas foram operados a uma temperatura de $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.2 Métodos Analíticos

A fim de avaliar o desempenho do sistema em termos de remoção de material orgânica e nutrientes, os seguintes parâmetros foram analisados: DQO, nitrogênio na forma de amônia (N-NH_4^+), nitrito (N-NO_2^-), e nitrato (N-NO_3^-), e fósforo na forma de fosfato (P-PO_4^{3-}). OD, temperatura, pH, alcalinidade, dureza total e concentração de fósforo foram usados como parâmetros operacionais. Todas as análises foram realizadas conforme *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012) duas vezes na semana. A quantidade de nitrogênio assimilado diariamente pela biomassa também foi estimada (WAN et al., 2009). Como não foi realizado descarte de lodo nos reatores, essa fração foi desconsiderada no cálculo do balanço de massa.

O processo de granulação foi avaliado em termo de sedimentabilidade do lodo utilizando o cálculo do IVL dinâmico, uma versão modificada do em que o IVL é avaliado nos de tempos de 5 (IVL₅), 10 (IVL₁₀), e 30 (IVL₃₀) min. (SCHWARZENBECK et al., 2005). Essa análise foi realizada duas vezes por semana.

4.2.3 Caracterização física, química e morfológica da biomassa

A análise de resistência física (teste de cisalhamento) do grânulo foi realizada conforme metodologia descrita por Nor-Anuar et al. (2012). Os grânulos ($> 0.2 \text{ mm}$) foram submetidos a uma força de cisalhamento causada por uma rotação de 200 rpm por 10 min. A fração fragmentada identificada foi expressa em termos de coeficiente de estabilidade (S). O coeficiente é dividido em três categorias: muito resistente ($S < 5\%$), resistente ($5\% \leq S \leq 20\%$) e não resistente ($S > 20\%$). Portanto, quanto menor os valores de S (%), maior a estabilidade do grânulo.

A composição e a forma do grânulo ao longo do experimento foram monitoradas usando microscópio óptico e microscópio eletrônico por varredura combinado com espectro de raios-X por energia dispersiva (MEV - EDX) (Inspect S50 – FEI). As amostras foram

preparadas conforme metodologia descrita por Motteran et al. (2013).

As Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) foram quantificadas conforme a seguinte metodologia. As SPE foram extraídas em condições alcalinas ($\text{pH} > 10$) com a adição de 5 mL de solução de NaOH 1M em 5 mL de licor misto. A mistura foi colocada em banho-maria a 80°C por 30 min. seguida pelo sonicador a 55 kHz por 5 min. (TAY; LIU; LIU, 2001c). Em seguida, as amostras foram filtradas em membrana com 0,45 μm de porosidade e diluídas 02 (duas) vezes. Para determinação das proteínas (PN) foi utilizado método modificado de Lowry e para determinação dos polissacarídeos (PS) foi utilizado o método fenol-sulfúrico (LONG et al., 2014). A concentração total de SPE foi determinada pela soma das frações de PN e PS.

4.2.4 Extração de DNA, sequenciamento do gene 16S rRNA e processamento de dados

O DNA foi extraído de amostras do licor misto coletado no final da fase aeróbia no 205th dia de operação (fase de maturação, final da fase IV) utilizando PowerSoil® (MoBioLaboratories Inc., USA) conforme instruções do fabricante. A biblioteca de amplicons da região V4 do gene 16S rRNA foi preparada como descrito anteriormente (ILLUMINA, 2013), usando os iniciadores específicos da região (515F / 806R). Após a indexação, os produtos de PCR foram limpos com contas de purificação AgencourtAMPure XP — PCR (BeckmanCoulter, Brea, CA, EUA), com base nas instruções do fabricante e quantificadas com o kit de ensaio dsDNA BR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em um fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As bibliotecas foram sequenciadas usando o Kit de Reagentes MiSeq de 300 ciclos v2 (ILLUMINA, 2013) com um MiSeq Desktop Sequencer (Illumina).

Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados com ferramentas de bioinformática da seguinte forma. Todas as leituras foram cortadas usando o vsearch v2.8.1, com os parâmetros `-fastq_maxee 0.8 -fastq_trunclen 250`. Todas as leituras foram agrupadas em OTUs usando o script QIIME `pick_open_reference_otus.py` com identidade de 99%, usando o banco de dados de rRNA Greengenes 16S (versão 13_8). O arquivo BIOM foi utilizado no PICRUSt para inferir categorias funcionais associadas à composição taxonômica através das vias metabólicas KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000). A normalização do número de cópias de 16S para cada OTU foi calculada usando o script PICRUSt `normalize_by_copy_number.py` e contribuições de vários táxons para diferentes KOs foram calculadas com o script `metagenome_contributions.py`. O estimador de cobertura baseado em

abundância (ACE), Chao1, Inverso de Simpson, Shannon e cobertura foram calculados usando o software Mothur.

4.2.5 Métodos Estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas com o software *StatgraphicsCenturion* XV aplicando os testes de *Mann-Whitney*, com nível de confiança de 95%, para comparar o desempenho dos reatores.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Granulação através das características de sedimentação

Os valores de IVL_5 , IVL_{10} , e IVL_{30} ao longo das fases nos dois reatores são mostrados na Figura 4.1. A primeira determinação de IVL no sistema foi realizada dois dias após inocular o sistema. A diferença entre o IVL_{30} do lodo de inóculo e o primeiro IVL_{30} registrado foi devido à lavagem da biomassa (*washout*) que ocorreu nesse intervalo.

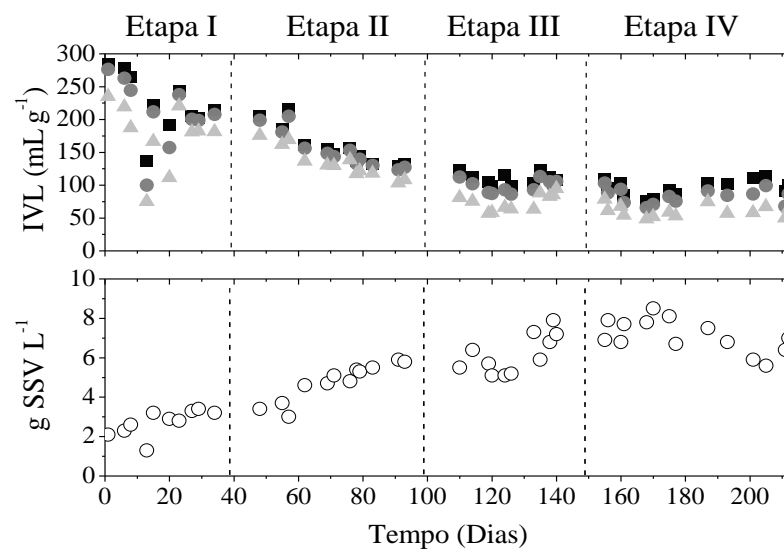
Observa-se que os valores de IVL_5 , IVL_{10} , e IVL_{30} se tornaram menores com a redução do tempo de sedimentação. Isso mostra que a sedimentabilidade da biomassa melhorou ao longo do tempo, o que é um comportamento característico da evolução do lodo floculento para lodo granular. Os valores de IVL_{30} na fase IV são similares aos encontrados em RBS convencional e em RBS com alimentação/descarte simultâneos, entre 30 e 80 $mL \cdot g^{-1}$ (DERLON et al., 2016; LIU et al., 2010c; LONG et al., 2014).

No dia 100, o R2 alcançou valores de IVL_{30} abaixo de 50 $mL \cdot g^{-1}$, enquanto o R1 manteve valores acima de 100 $mL \cdot g^{-1}$. Mesmo após a estabilização (fases III e IV), o reator controle (R1) se manteve com IVL_{30} maior do que o do reator suplementado com cálcio (R2) (R1: $SVI_{30} > 50 mL \cdot g^{-1}$; R2: $SVI_{30} < 50 mL \cdot g^{-1}$). Também foi observado que, no R2, os valores de IVL_5 se aproximaram mais do IVL_{30} quando comparado ao R1. Esse é um indicativo de que o lodo do reator com cálcio possuía uma sedimentabilidade melhor.

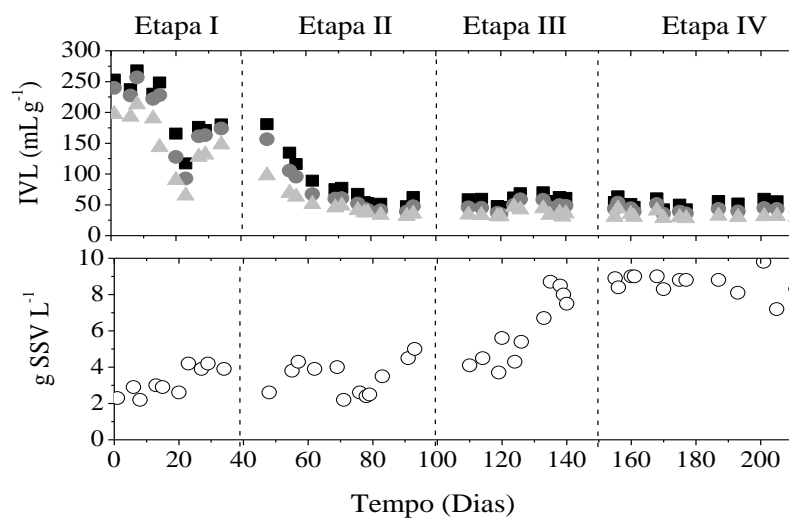
Outros estudos corroboram com a influência positiva do cálcio na sedimentabilidade do lodo. L. Liu et al. (2010), em RBS convencional tratando efluente sintético, usaram uma dosagem contínua de 40 $mg \cdot L^{-1}$ de Ca^{2+} , e obtiveram valores de IVL_{30} próximos a 20 $mL \cdot g^{-1}$. Os autores usaram como inóculo o lodo de ETE de esgoto doméstico e cultivaram por 12 dias, com volume de troca de 75% e tempo de sedimentação de 10 min.,

seguido por descarte. Em outra pesquisa, Jiang et al. (2003) utilizaram dosagem contínua de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ca^{2+} em um RBS convencional tratando esgoto sintético, com tempo de sedimentação de 2 min. Obtiveram um IVL_{30} médio de $73 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, assim como a redução do período de granulação de 32 para 16 dias. Entretanto, a estratégia usada na referida pesquisa aplicou uma forte pressão de seleção ao sistema, o que não ocorre normalmente em escala real.

Figura 4.1—SSV e IVL ao longo das quatro fases do experimento para o (a) R1 (controle) e (b) R2 (suplementado com Ca^{2+}). (■) IVL_5 , (●) IVL_{10} , (▲) IVL_{30} e (○) SSV.



(a)



(b)

A concentração de Sólidos Suspensos Voláteis no Licor Misto (SSVLM) ao longo das fases também é mostrada na Figura 4.1. Houve um aumento da concentração nas

primeiras fases e mesmo com a redução do tempo de sedimentação, alcançando valores de aproximadamente $8 \text{ g SSVLM}\cdot\text{L}^{-1}$ em ambos os reatores, indicando uma baixa pressão de seleção. Os valores observados são compatíveis com os reportados na literatura para LGA operado em RBS convencional (Li et al., 2009; Zhang et al., 2017). Nas fases III e IV, a média da idade de lodo (*Sludge Retention Time – SRT*) foi de 35 dias para o R1 e 32 dias para o R2.

Na Figura 4.1 também é possível observar que não houve decaimento expressivo no SSVLM no R1 nas fases I e II, embora os reatores tenham chegado à fase IV com a mesma concentração de sólidos. Esse comportamento não é comum para RBS convencional, em que a redução do tempo de sedimentação é comumente seguida pela lavagem dos grânulos, chegando a valores entre 0,5 e $1 \text{ g VSS}\cdot\text{L}^{-1}$ (KOŃCZAK; KARCZ; MIKSCH, 2014; PIJUAN; WERNER; YUAN, 2011). Nesse caso, o comportamento pode estar relacionado à operação com volume constante, que reduziu a influência do tempo de sedimentação na eliminação do lodo com baixa sedimentabilidade. Nesses reatores, a velocidade ascensional do líquido, muito provavelmente, exerceu papel mais importante no processo de seletivo.

A relação entre SSVLM/SSLM atingida na fase IV foi de 0,8 e 0,7 para o R1 e para o R2, respectivamente. O valor ligeiramente menor encontrado no R2 sugere que pode ter ocorrido acúmulo de material inerte no lodo, possivelmente compostos inorgânicos de cálcio. Comportamento semelhante foi reportado por Ren et al. (2008), que avaliaram o cultivo de grânulos com adição de $40 \text{ mg Ca}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$ em RBS convencional durante um período de três meses. Eles encontraram relação entre SSVLM/SSLM de 0,7, para grânulos com dimensões entre 4 e 6 mm, e de 0,85, para diâmetros entre 2 e 2,5 mm. Essa diferença foi atribuída ao acúmulo de cálcio na região central do grânulo, principalmente na forma de precipitado de CaCO_3 . L. Liu et al. (2010), operando RBS convencional, também reportaram maior acúmulo de material inerte nos grânulos que foram suplementados com $40 \text{ mg Ca}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$ em comparação aos enriquecidos com $40 \text{ mg Mg}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$ (SSVLM/SSLM de 0,84 e 0,95, respectivamente, após 110 ciclos de operação).

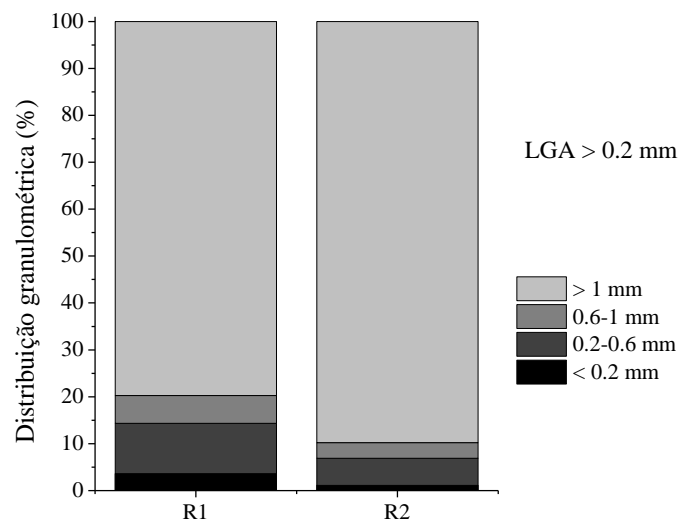
Ao final da granulação (fase IV), para ambos os reatores, mais de 96% do lodo era formado por grânulos ($> 0,2 \text{ mm}$) (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007b). Essa proporção é 50% maior do que a obtida por Q. Wang et al. (2018) operando um RBS com alimentação/descarte simultâneos com velocidade ascensional do líquido de $0,67 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram que é possível granular um RBS com alimentação/descarte simultâneos com baixa velocidade ascensional do líquido. Entretanto, ao contrário da hipótese inicial, a adição de cálcio não foi o fator decisivo na granulação, visto que o reator controle apresentou comportamento similar em termos de tempo de granulação e

distribuição do tamanho do grânulo (Figura 4.2). Todavia, o reator suplementado com cálcio apresentou uma maior proporção de grânulos maiores do que 1 mm (R1: 80%, R2: 90%).

Além disso, a distribuição granulométrica foi diferente da obtida por Derlon et al. (2016). Eles trabalharam com RBS com alimentação/descarte simultâneos com taxa de troca volumétrica de 50% e alimentaram com esgoto real com baixa carga orgânica. Ao final da última fase, em que a velocidade ascensional do líquido era de $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ e a velocidade de sedimentação para $3 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, 60% dos grânulos tinham tamanho entre 0,25 e 0,63 mm, enquanto apenas 15% eram maiores do que 0,63 mm. A diferença observada, muito provavelmente, é devido ao tipo de substrato, visto que o presente trabalho usou etanol e não efluente real. Os resultados de Q. Wang et al. (2018) corroboram com essa hipótese. Os autores compararam um RBS com alimentação/descarte simultâneos com 90% de troca volumétrica alimentado com esgoto real (R1) com outro com afluente sintético contendo acetato (R2). Os grânulos do reator que continha efluente real apresentaram diâmetros maiores (R1: 0,2-0,8 mm; R2: 0,2-0,6 mm). Portanto, isso reforça que a composição do esgoto é fator determinante na formação de partículas maiores e mais densas.

No geral, a presença de Ca^{2+} afetou positivamente a sedimentabilidade, embora os grânulos formados tenham uma parcela maior de sólidos inertes. Possivelmente, a redução do tempo de sedimentação e o uso do etanol como fonte de carbono foram fatores que mais influenciaram no tamanho do grânulo.

Figura 4.2– Distribuição do tamanho do grânulo (% massa) ao final da Fase IV (190o dia) para LGA cultivado em RBS com alimentação/descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}).



4.3.2 Desempenho do sistema LGA durante o processo de granulação

Na Tabela 4.1 é mostrado o desempenho geral dos reatores R1 e R2 em termos de eficiência e estabilidade operacional. A remoção de material orgânica foi estável durante o processo de seleção da biomassa, agregação da biomassa e redução do tempo de sedimentação (fases I e II). Esse padrão se manteve durante a fase de estabilização (transição entre as fases III e IV). Ao longo de todo o experimento as eficiências de remoção foram acima de 90% em ambos os reatores, com baixo desvio padrão e sem diferenças significantes ($p = 0,20$), mostrando uma ótima estabilidade do sistema.

O processo de nitrificação foi observado nos dois reatores durante as quatro fases, com valores acima de 80%. Na fase II, a nitrificação do reator controle reduziu significativamente (fase I: $96,7 \pm 9,6\%$, fase II: $81,9 \pm 10,4\%$). O reator suplementado com cálcio se manteve estável, apresentando redução na capacidade de nitrificação apenas na última etapa (fase III: $92,4 \pm 7,5\%$, fase IV: $84,7 \pm 6,6\%$). Entretanto, quando se compara os reatores durante todo o processo de granulação, não foram encontradas diferenças significativas na nitrificação ($p = 0,06$).

Os resultados apresentados, provavelmente, estão relacionados com a retenção da biomassa. Com o aumento da concentração de SSVLM, a demanda de OD também cresceu, especialmente devido ao crescimento das bactérias heterotróficas, considerando a respiração endógena. Visto que a aeração foi mantida constante ao longo de todo o experimento, é possível que tenha ocorrido uma escassez de OD em algumas regiões do grânulo formado. A falta de oxigênio pode ter afetado a atividade das bactérias nitrificantes (bactérias oxidantes de amônia, BOA, e bactérias oxidantes de nitrito, BON), portanto reduzindo a nitrificação.

Existe uma correspondência entre o crescimento da biomassa (Figura4.1) e a redução da eficiência da nitrificação (Tabela 4.1). No R1, houve uma diminuição nos níveis médios de nitrificação nas fases I e II. Enquanto isso, a concentração de biomassa no reator cresceu na fase II, passando de 3 para 6 g SSVLM·L⁻¹. Nas demais fases o aumento foi menor e a eficiência da nitrificação se manteve estável. Quanto ao R2, uma redução na nitrificação média foi observada entre as fases II e IV. Ao mesmo tempo, ocorreu um rápido crescimento da biomassa na fase III, quando a concentração de SSVLM passou de 4 para 8 g SSV·L⁻¹.

As diferentes frações de nitrogênio no efluente também são mostradas na Tabela 4.1. As concentrações de NO₃⁻ no efluente foram maiores do que NO₂⁻ para ambos os reatores em todas as etapas, mostrando que a nitrificação completa ocorreu. Para os grânulos maduros (fases III e IV), as eficiências de desnitrificação foram aproximadamente 40%. Não houve diferença significativa entre os sistemas para esse processo ($p > 0,05$).

Tabela 4.1– Desempenho operacional do LGA cultivado em RBS com alimentação/descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}).

Reator		R1				R2			
Fase		I	II	III	IV	I	II	III	IV
Duração	Dias	39	60	49	63	39	60	49	63
Tempo de sedimentação	Minutos	30	15	10	5	30	15	10	5
DQO	Afluente ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	985 (123)	776 (107)	694 (86)	694 (149)	985 (123)	776 (107)	694 (86)	694 (149)
	Efluente ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	31 (24)	54 (38)	21 (17)	28 (15)	35 (22)	37 (20)	31 (23)	44 (24)
	Eficiência de remoção (%)	94 (2)	93 (5)	97 (2)	96 (3)	96 (2)	95 (4)	96 (3)	93 (4)
Frações de nitrogênio	Afluente NH_4^+ ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	114,2 (15,5)	96,5 (8,0)	90,7 (6,2)	92,3 (7,6)	114,2 (15,5)	96,5 (8,0)	92,6 (6,2)	92,3 (7,6)
	Efluente NH_4^+ ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	3,7 (2,5)	14,9 (6,6)	10,3 (6,4)	10,2 (6,3)	6,9 (5,4)	1,2 (1,4)	7,1 (2,8)	14,5 (8,9)
	Efluente NO_2^- ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	8,7 (1,4)	8,4 (3,8)	13,1 (5,4)	4,2 (3,6)	6,4 (4,8)	5,3 (2,6)	10,2 (8,3)	2,4 (1,2)
	Efluente NO_3^- ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	45,1 (15,4)	26,4 (12,2)	25,4 (7,4)	23,7 (6,8)	50,3 (9)	46,7 (10,4)	24,4 (9,1)	21,4 (8,4)
	N no lodo ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	15,2	11,9	18,3	12,6	16,2	12,2	16,3	18,8
	Eficiência da nitrificação (%)	96,7 (9,6)	81,9 (10,4)	80,4 (7,6)	83,2 (6,4)	93,9 (19,0)	97,7 (11,8)	92,4 (7,5)	84,7 (6,6)
	Eficiência da desnitrificação (%)	34,8 (8,9)	40,9 (12,3)	26,9 (10,4)	48,5 (10,1)	27,9 (21,2)	35,9 (8,3)	36,4 (9,2)	41,2 (11,0)

pH	Afluente	7,4 (0,5)	7,5 (0,3)	7,0 (0,5)	7,5 (0,2)	7,4 (0,5)	7,5 (0,3)	7,0 (0,5)	7,5 (0,2)
	Efluente	7,8 (0,4)	8,0 (0,2)	7,6 (0,3)	7,5 (1,0)	7,5 (0,4)	7,7 (0,2)	7,8 (0,2)	8,0 (0,2)
Alcalinidade Total	Afluente (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)	694 (204)	783 (130)	631 (130)	723 (68)	694 (204)	783 (130)	631 (130)	723 (68)
	Efluente (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)	275 (172)	457 (157)	312 (116)	367 (165)	177 (137)	283 (91)	353 (61)	354 (84)
Fósforo	Afluente (mg P-PO ₄ ³⁻ ·L ⁻¹)	7,5 (0,7)	7,6 (1,0)	6,8 (1,2)	11,1 (1,7)	7,5 (0,7)	7,6 (1,0)	6,8 (1,2)	11,1 (1,7)
	Efluente (mg P-PO ₄ ³⁻ ·L ⁻¹)	4,6 (0,7)	3,3 (0,9)	4,2 (1,2)	8,6 (1,5)	4,60 (0,6)	4,0 (0,8)	4,3 (1,0)	5,7 (1,2)
	Eficiência de remoção (%)	39,1 (10,2)	56,5 (14,0)	37,9 (14,0)	22,6 (8,5)	32,9 (8,2)	47,5 (11,0)	36,1 (10,0)	48,4 (10,0)

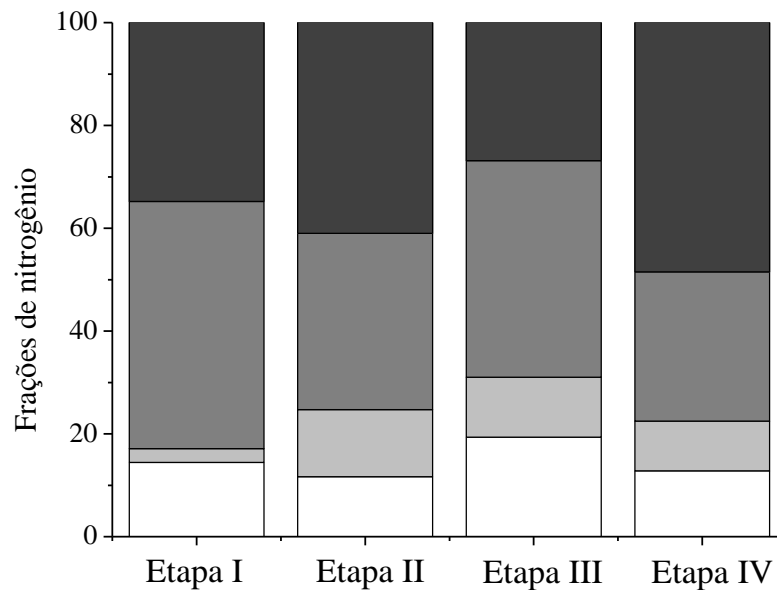
O desvio padrão é mostrado entre parênteses.

O percentual dos principais processos de remoção de nitrogênio, considerando a fração assimilada pelo lodo, é mostrado na Figura 4.3. Na fase III, período em que o crescimento da biomassa foi maior, o percentual de nitrogênio no lodo foi de 19% no R1 e 18% no R2. Na fase IV, o reator suplementado com cálcio manteve valores próximos ao da etapa anterior, enquanto uma redução foi observada no reator controle (14%), muito provavelmente devido a uma pequena redução na concentração da biomassa no dia 180 de operação.

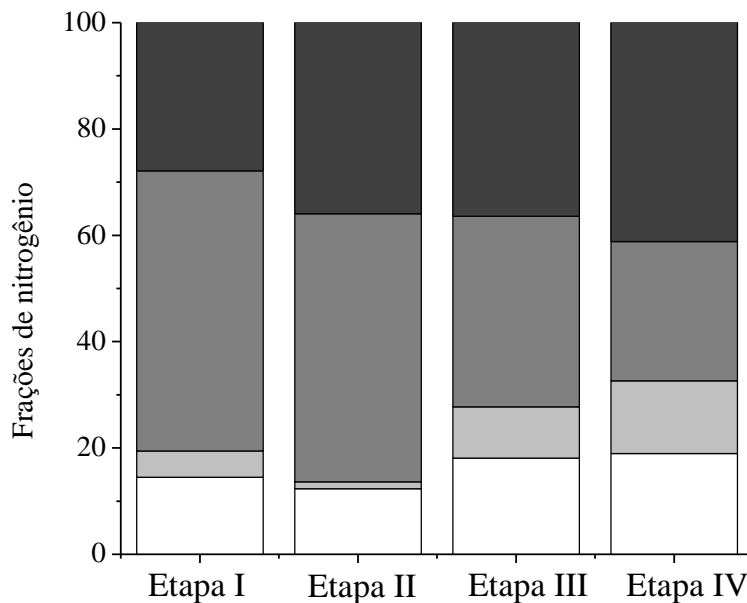
Em relação à remoção de fósforo, com exceção do R1 na fase II, os reatores apresentaram remoções abaixo de 50%, o que difere dos resultados obtidos em outros estudos. Por exemplo, H. Wang et al. (2018) operaram um RBS convencional com uma fase anaeróbia seguida de um período aeróbio com altas taxas de aeração (OD entre 7 e 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e obtiveram remoções de fósforo em torno de 98% durante os 80 (oitenta) dias de operação. Eles utilizaram efluente sintético com acetato (220 $\text{mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de carbono e amônia (11-55 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de nitrogênio. O reator também foi suplementado com magnésio (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e cálcio (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), teve um ciclo de 6 h (alimentação: 2 min.; período anaeróbio: 120 min.; período aeróbio: 90 min.; período anóxico: 144 min.; sedimentação: 2 min.; descarte: 2 min.).

A baixa remoção de P obtida no presente estudo é uma remoção inesperada, pois o uso de ciclos anaeróbios e aeróbios, geralmente, favorece o crescimento de organismos acumuladores de fósforo (OAF), com a liberação de fosfato na fase anaeróbia e captura na fase aeróbia (DE KREUK, 2006). Uma possível explicação para esse resultado é a presença de N-NO_2^- e N-NO_3^- na fase anaeróbia. Foi reportado que esses íons (nitrito e nitrato) causam competição entre OAF e organismos desnitrificantes heterotróficos (ODH). Por questões cinéticas, as ODH levam vantagem em relação às OAF, o que interfere negativamente nas eficiências de remoção de P (CHUANG; OUYANG; WANG, 1996). A fonte de carbono escolhida é outro fator que contribui para a baixa eficiência. Etanol foi reportado como um dos melhores substratos para os ODH (PRONK et al., 2015a). Adicionalmente, alguns trabalhos usando etanol apresentaram elevada prevalência de organismos acumuladores de glicogênio (OAG) em relação aos OAF (ROLLEMBERG et al., 2019). Essas observações podem indicar que o etanol não deve favorecer os OAF, pois estes competem diretamente com os OAG e com os ODH (BASSIN et al., 2012a).

Figura 4.3– Distribuição das frações de nitrogênio em diferentes condições operacionais no (a) R1 (controle) e (b) R2 (suplementado com Ca^{2+}). (■) desnitrificação, (■) nitrificação no efluente, (■) NH_4^+ no efluente e (□) nitrogênio presente no lodo.



(a)



(b)

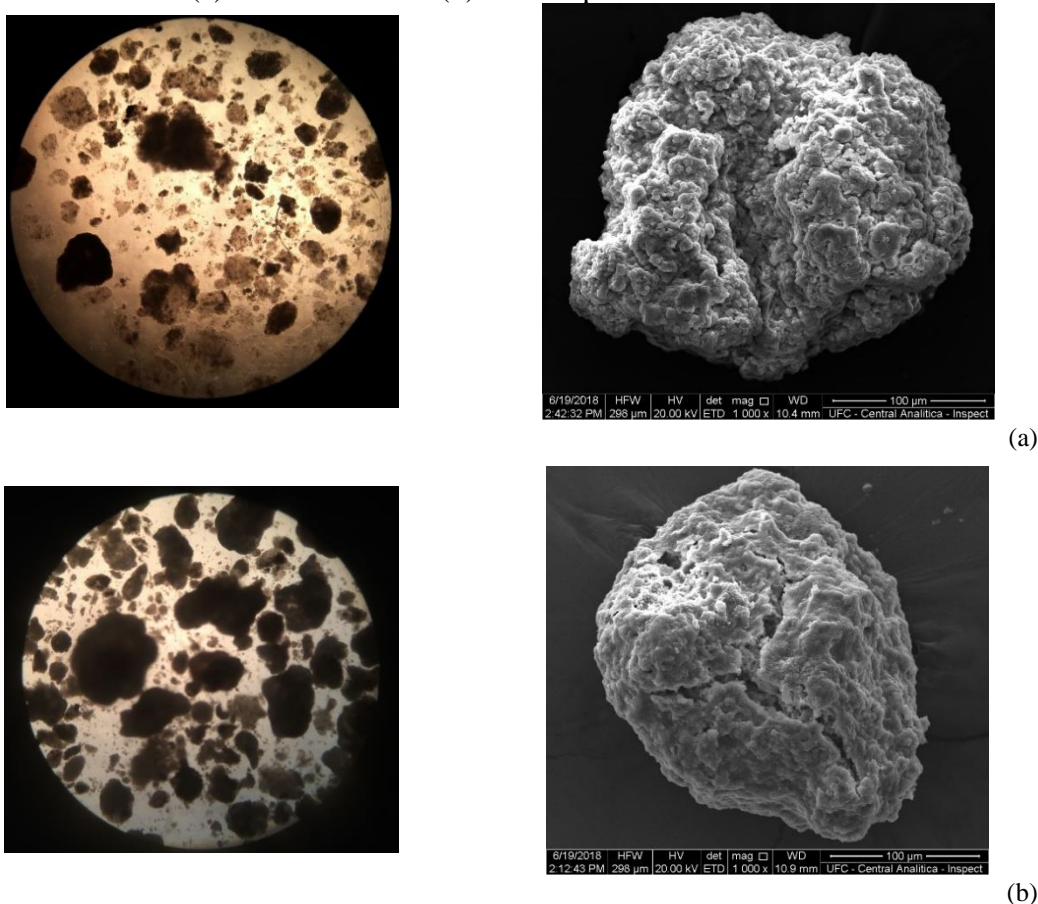
4.3.3 Características dos grânulos

As imagens obtidas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) ao final da fase IV são mostradas na Figura 4.4. Os grânulos produzidos no reator controle (R1) apresentou características irregulares com estruturas esponjosas, enquanto a

biomassa do reator suplementado com cálcio (R2) mostrou uma forma circular uniforme e compacta.

As análises de MEV mostraram que os grânulos tinham estrutura coesa, poucos vazios e bem delineada. Essas observações foram evidenciadas pela ausência de cristais inorgânicos e de material orgânico diferente do material amorfo que envolve toda a superfície do grânulo.

Figura 4.4 – Fotografia em microscopia óptica (esquerda) e microscopia eletrônica de varredura (MEV, direita) dos LGA cultivados em RBS com alimentação/descarte simultâneos (a) R1 - Controle e (b) R2 - Suplementados com Ca^{2+} .



Em relação à resistência, o coeficiente de estabilidade (S) foi de $27 \pm 5\%$ e $28 \pm 2\%$ para os reatores R1 e R2, respectivamente. A resistência física é um parâmetro chave para descrever as características do grânulo, visto que representa a capacidade de resistência do grânulo contra as tensões de cisalhamento impostas. Portanto, a biomassa formada, nesse aspecto, não apresentou diferenças nas características baseado na classificação proposta por Nor-Anuar et al. (2012), conforme os autores, os grânulos foram classificados como não resistentes.

Outro parâmetro essencial na caracterização do grânulo é a estrutura das SPE. As concentrações de PS (polissacarídeos) e PN (proteína) ao final da fase IV são mostradas na Tabela 4.2. Verifica-se que os dois reatores tiveram PS maior do que PN, porém a razão PS/PN do R2 (1,7) foi menor do que no R1 (2,1).

Tabela 4.2– Composição das SPE (Fase IV) do LGA cultivado em RBS com alimentação/descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}).

Parâmetros	R1	R2
PS (mg PS·gSSV ⁻¹)	93 ± 8	87 ± 8
PN (mg PN·g SSV ⁻¹)	44 ± 5	50 ± 5
PS/PN	2.1	1.7

Jiang et al. (2003), usando um RBS convencional suplementado com 100 mg·L⁻¹ de cálcio e volume de troca de 50%, obtiveram razão PS/PN de 0,7 e 1,5 para o reator controle e para o suplementado com cálcio, respectivamente. O aumento foi devido à maior produção de PS, que foi duas vezes maior quando o cálcio esteve presente (R1: 41 mg·g SSV⁻¹, R2: 92 mg·g SSV⁻¹), enquanto PN se manteve em torno de 60 mg·g SSV⁻¹ nos dois reatores. Os valores absolutos de PS, PN e PS/PN apresentados por Jiang et al. (2003) para reator com a presença de cálcio foram semelhantes aos obtidos no R2, entretanto, houve aumento de SPE total. No presente trabalho, os valores foram semelhantes para R1 e R2. Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de PS e PN. Portanto, no tocante à produção e composição de SPE, as condições operacionais do sistema parecem interferir mais do que a adição de cálcio.

A análise com espectro de raios-X por energia dispersiva (EDX) realizada juntamente com MEV mostrou que a matriz de SPE dos grânulos era composta principalmente por C (R1: 33.5%, R2: 40%) e O (R1: 39.8%, R2: 25%), assim como pequenas concentrações de K, P, Na, Cl e S. Em relação ao cálcio presente nas SPE, no R1 a concentração foi menor do que o limite de detecção do equipamento (<0,1%), enquanto no R2, foi de 1,1%. Todavia, esse valor foi muito menor do que o reportado por Ren et al. (2008) (~14%), que operaram um RBS convencional adicionando 40 mg Ca^{2+} ·L⁻¹, uma concentração inferior à utilizada no presente estudo (100 mg Ca^{2+} ·L⁻¹). Conforme os autores, o acúmulo ocorreu principalmente na forma de CaCO_3 e causou limitação na transferência de massa nos grânulos aeróbios. Consequentemente, o núcleo dos grânulos era quase ausente de microrganismos.

Por outro lado, no presente estudo, a precipitação de cálcio não foi observada pela

análise de EDX. Isso pode ser justificado pela fonte de alcalinidade utilizada (NaHCO_3) e pelo pH do sistema (7-8), Tabela 4.1. Nessa faixa de pH, o fosfato está presente na forma de H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} , os quais possuem solubilidade alta e intermediária, respectivamente, e bicarbonato, o qual é altamente solúvel, não é convertido em carbonato em pH abaixo de 8,3 (Girard, 2013). Portanto, a probabilidade de o cálcio precipitar como sais de fosfato ou carbonato é muito baixa.

Em paralelo, a precipitação de fósforo devido à adição de fósforo não foi observada por Mañas et al. (2011), que trabalharam com RBS-*airlift* convencional. O fato é evidenciado pela similaridade na remoção de fósforo. Ademais, a análise de EDX não mostrou adsorção de fósforo na matriz do grânulo. Isso é um indicativo de que as remoções de P são, provavelmente, devido à atividade biológica e não à processos físico-químicos, como a precipitação.

4.3.4 Análise da comunidade microbiana

Na análise metagenômica, foram encontradas 26.505 sequências no lodo de inóculo, 47.276 no reator controle (R1) e 74.700 no reator suplementado com cálcio (R2). Os indicadores de riqueza e diversidade (Tabela 4.3) do R1 e R2 foram significativamente maiores em relação ao lodo de inóculo, mostrando que não houve uma forte pressão de seleção no RBS com alimentação/descarte simultâneos.

Tabela 4.3– Indicadores de riqueza e diversidade das espécies da população microbiana do LGA cultivado em RBS com alimentação e descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}). Amostras foram coletadas no 205º dia de operação (fase IV).

Amostra	Cobertura (%)	Inverso de Simpson	Shannon	Riqueza	Chao1	ACE
Inóculo	99.2	22.3	5.1	1731	1762	1838
R1	98.5	23.4	5.0	2736	3024	3275
R2	99.2	53.9	5.4	3401	3550	3792

He et al. (2016) operaram um RBS convencional com ciclo anaeróbio-aeróbio-anóxico para investigar a formação de grânulos com desnitrificação e remoção de fósforo. Eles utilizaram uma baixa carga orgânica volumétrica ($0.3 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$), efluente sintético composto por acetato ($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), amônia ($15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), fósforo ($6 \text{ mg TP} \cdot \text{L}^{-1}$), magnésio ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e cálcio ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). O ciclo era de 8 h, com tempo de aeração de 180-150 min. e

tempo de sedimentação entre 20-2 min., reduzido gradualmente. O período anóxico variou de 90 a 138 min. e a fase anaeróbia foi mantida constante (180 min.). Embora esses autores tenham utilizado baixo tempo de sedimentação, a riqueza e a diversidade dos grânulos maduros foram maiores em comparação ao lodo de inóculo.

Por outro lado, Liu et al. (2017) investigaram a adição de carvão ativado combinado com redução do tempo de sedimentação, como estratégia para acelerar a granulação no RBS convencional (alimentação: 1min; anaeróbio com agitação: 99 min.; aeração: 150-175 min.; sedimentação: 30-5 min.; descarte: 1 min.). Os autores trabalharam com efluente sintético contendo acetato ($513 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), amônia e peptona como fonte de nitrogênio ($153 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), fosfato ($86.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), magnésio ($138 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e cálcio ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Uma redução na riqueza e diversidade das espécies foi observada.

Esses resultados indicaram que a comunidade microbiana no LGA se mostrou muito sensível não só a pressão de seleção imposta, mas também ao tipo de RBS usado, estratégia de granulação, duração do experimento, objetivo da pesquisa (remoção simultânea de C, N e P ou não), tipo de substrato, e outras condições operacionais.

Em relação à abundância da comunidade microbiana, em nível de filo, Proteobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Chlorobi, Bacteroidetes, e Acidobacterias foram predominantes no lodo de inóculo e nos dois reatores (Figura4.5a). Esses são os filos mais encontrados em sistemas do tipo LGA (FAN et al., 2018; OU et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

Os grupos Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria, as quais pertencem ao filo Proteobacteria (Figura4.5b), possuem uma variedade de famílias relacionadas à produção de SPE (RAMOS; SUÁREZ-OJEDA; CARRERA, 2015). No R1, esses grupos tiveram uma abundância de 22% e 20%, respectivamente, enquanto que no R2 a proporção foi de 52% e 2%. Embora a adição de cálcio tenha favorecido a Alphaproteobacteria em relação à Deltaproteobacteria, a abundância total dos dois grupos juntos foi equivalente nos dois reatores (R1: 42%, R2: 54%). Isso explica o desempenho similar dos reatores em termos de SPE, visto que ambos os grupos possuem papel semelhante na produção desse polímero.

A afiliação taxonômica em nível de família (Figura4.5c) foi utilizada para inferir os grupos funcionais relacionados à remoção de C, N e P. As famílias foram divididas em BOA, ODH, OAG, BON e OAF (Figura4.6).

A abundância das BOA nos reatores foi próxima da observada para BON (Figura4.6). Isso sugere que a oxidação da amônia e do nitrito deve ter ocorrido em níveis semelhantes. Entretanto, comparando as fases I e IV, houve mais acúmulo de amônia e menor

concentração de nitrito no efluente para os dois sistemas, Tabela 4.1. Isso pode ser explicado pelo fato da conversão da amônia a nitrito ser geralmente lenta, enquanto nitrito é convertido quase que imediatamente a nitrato (EKAMA; WENTZEL, 2008). Também é importante salientar que a escassez de OD devido ao crescimento da biomassa (ver tópico 4.3.2) pode ter afetado a oxidação da amônia mais fortemente, visto que é uma reação mais lenta.

Hyphomonadaceae, Comamonadaceae, Dermabacteraceae, Planctomycetaceae, e Sinobacteraceae foram as famílias de ODH encontradas (Figura 4.6). R1 e R2 apresentaram maior presença delas quando comparado ao lodo de inóculo, a exceção do Sinobacteraceae que se mostrou presente somente no lodo de inóculo. O gênero *Thauera* cresceu abundantemente, saindo de 3% no inóculo para 15% no R1 e 11% no R2. Esse gênero de ODH é caracterizado por absorver uma vasta faixa de compostos orgânicos em condições aeróbias, o que inclui glicose, acetato, propionato, piruvato, ácido oleico, misturas de aminoácidos e etanol. Nas condições de desnitrificação, vários substratos são consumidos, com exceção da glicose e do ácido oleico (THOMSEN; KONG; NIELSEN, 2007).

O aumento da abundância de ODH nos reatores R1 e R2 em comparação ao lodo de inóculo se contradiz com os baixos níveis de desnitrificação observados (Tabela 4.1). Uma possível explicação é que no início de cada ciclo, há muito substrato (etanol), não há oxigênio e muito NO_x (acumulado dos ciclos anteriores), resultando no crescimento das ODH. É provável que essas bactérias consumam a maior parte do NO_x disponível antes da fase aeróbia. Quando o oxigênio começa a estar presente, o substrato remanescente é consumido aerobiamente pelas bactérias heterotróficas ordinárias, depois BOA e BOM podem usar o oxigênio restante para nitrificação, aumentando a concentração de NO_x. Todavia, a desnitrificação não pode ocorrer devido à ausência de substrato e presença de oxigênio. Portanto, NO_x se acumula no sistema e a eficiência da desnitrificação é baixa, mesmo com ODH abundante.

Em relação aos OAG e OAF, a abundância e a diversidade do primeiro grupo foram consideravelmente maiores (Figura 4.6), o que corrobora com a hipótese de que no período de reação anaeróbia, a presença da fonte de carbono e de NO_x favorece ODH e OAG em relação aos OAF (ver item 4.3.2). Adicionalmente, visto que a abundância de ODH e OAF é similar, é possível que a competição entre esses microrganismos tenha sido menos relevante quando comparada à competição entre OAG e OAF.

Candidatus Alysiosphaera também é muito presente no LGA (R1: 0.63%; R2: 0.82%). Eles são responsáveis por degradar os aminoácidos e vários açúcares, especialmente etanol, sendo os polihidroxialcanoatos (PHA) consumidos em ambientes anóxicos (ODAF)

(KRAGELUND et al., 2006). A sua baixa abundância indica que ODAF não prevaleceram em relação aos OAG e ODH na competição por substrato, o que contribuiu para a baixa eficiência de desnitrificação e remoção de fósforo nos dois sistemas (Tabela 4.1).

Figura 4.5– Comunidade microbiana em nível de filo (a), classe (b) e família (c) no LGA cultivado em RBS com alimentação/descarte simultâneos, R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}). Amostras foram coletadas no 205º dia de operação (Fase IV).

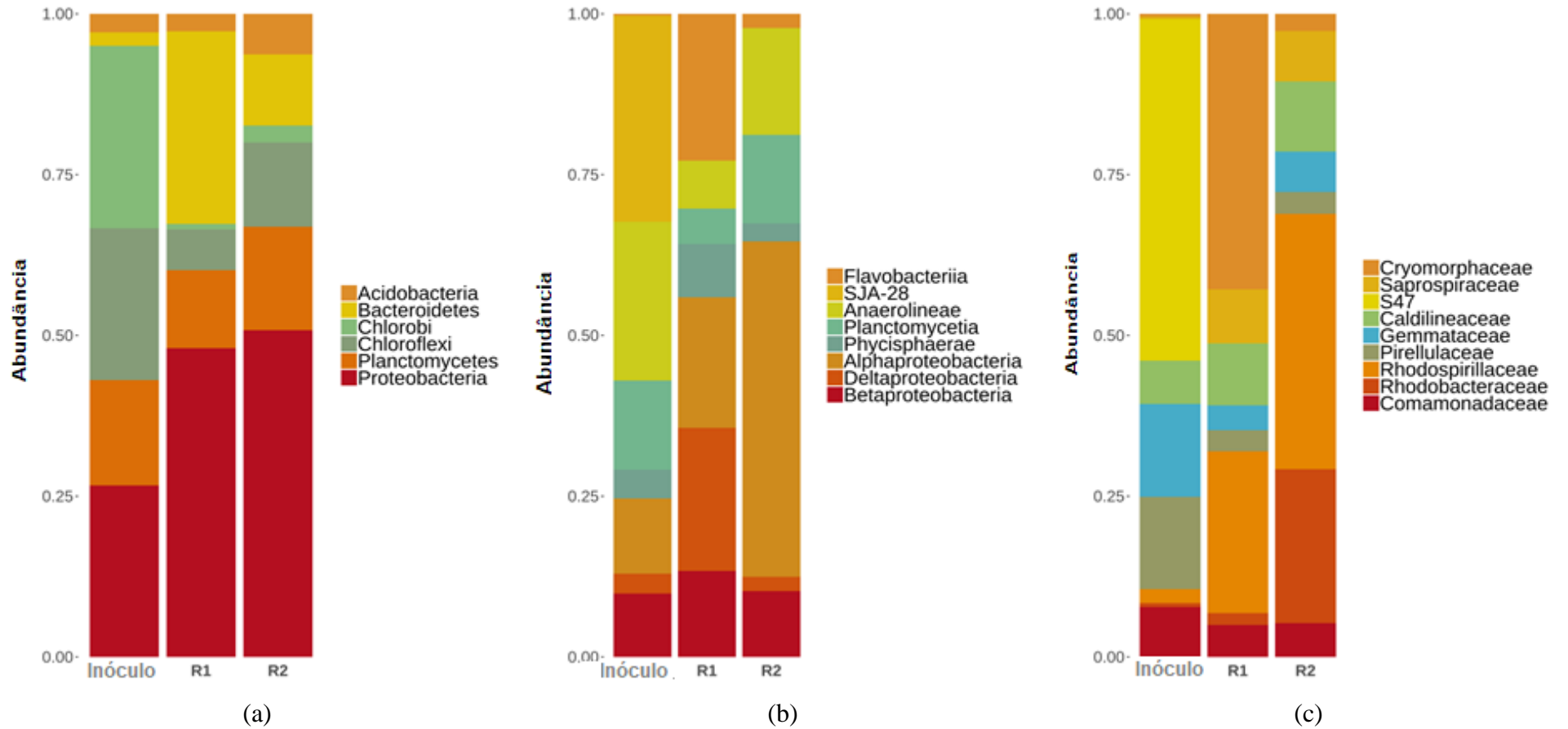
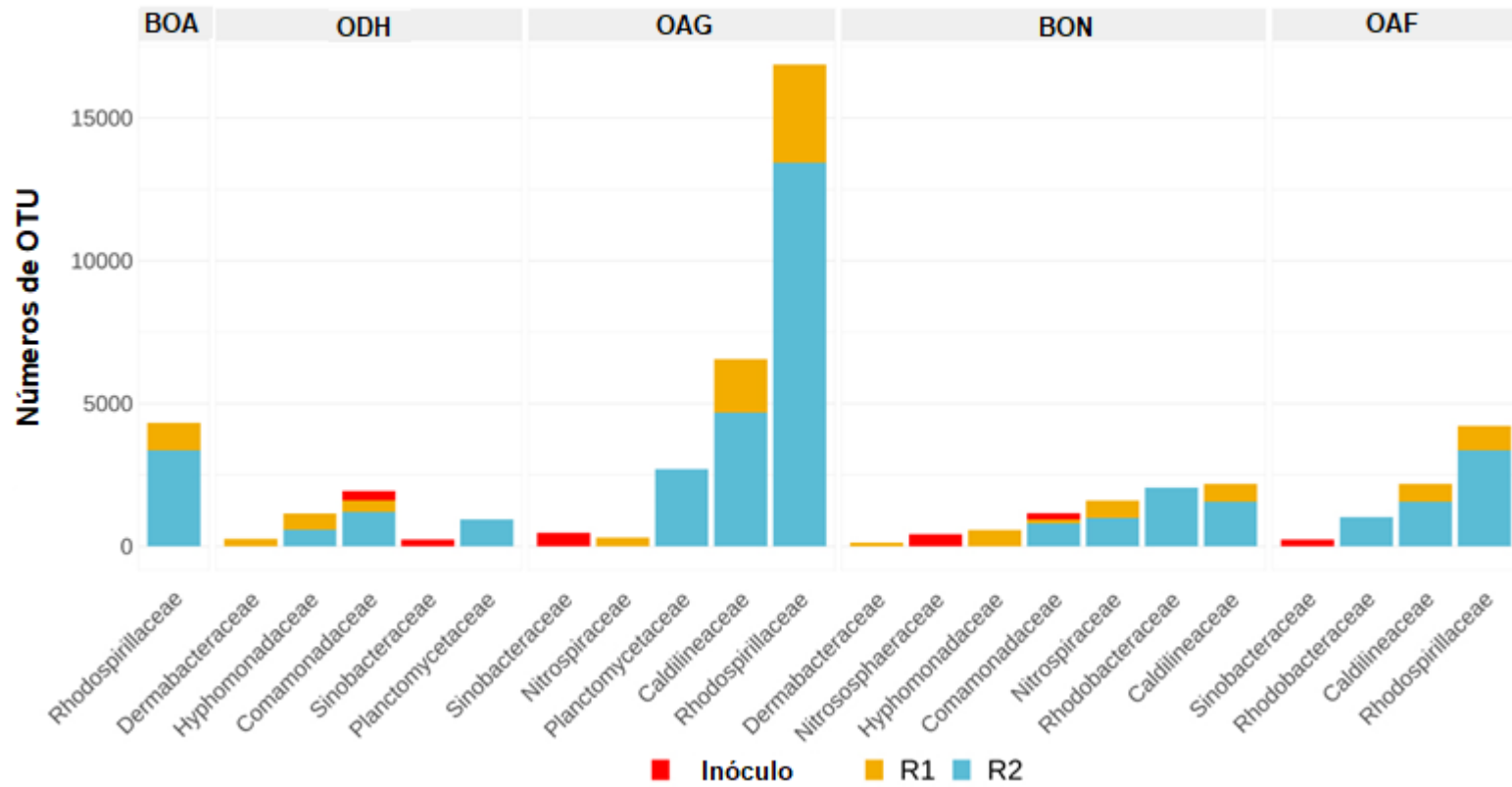


Figura 4.6 – Distribuição funcional da taxonomia a nível familiar do LGA cultivado nos RBScom alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}). Amostras foram coletadas no 205º dia de operação (fase IV).



4.4 Conclusão

No geral, a suplementação com cálcio afetou positivamente a sedimentabilidade do lodo, embora tenha sido encontrada uma alta fração de sólidos inertes no grânulo. O total de SPE foi semelhante para os reatores e não foram observadas diferenças entre as concentrações de PS e PN.

A adição de Ca^{2+} em RBS com alimentação/descarte simultâneos, operado com baixa velocidade ascensional do líquido ($0,92 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$), não acelerou a formação de grânulos ou melhorou o desempenho do reator. A estrutura da comunidade microbiana, especialmente em termos de bioatividade, também não foi afetada. Portanto, o efeito de cátions bivalentes, como Ca^{2+} , deve ser mais evidente em RBS convencional, em que a pressão de seleção é maior.

5 CAPÍTULO III –EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CINZAS DE CARVÃO MINERAL EM LODO GRANULAR AERÓBIO CULTIVADO EM RBS COM ALIMENTAÇÃO/DESCARTE SIMULTÂNEOS

5.1 Introdução

A granulação aeróbia é um processo em que microrganismos, principalmente bactérias, se auto imobilizam por influência de várias pressões de seleção, por exemplo, baixo tempo de sedimentação e elevada intensidade de aeração (ROLLEMBERG et al., 2018). Os grânulos formados possuem uma estrutura densa e compacta, além de uma boa sedimentabilidade, capacidade de suportar elevadas cargas orgânicas e de remover, simultaneamente, carbono, nitrogênio e fósforo (ADAV et al., 2008; ADAV; LEE; LAI, 2009). Além disso, quando comparado ao lodo ativado convencional (LAC), o lodo granular aeróbio (LGA) possibilita redução nos custos operacionais (20-25%), demanda energética (23-40%) e espaço (50-75%). (ADAV et al., 2008; BENGTSSON et al., 2018; NEREDA, 2017).

Esse lodo é cultivado em reator em bateladas sequenciais (RBS) operado em ciclos que possuem as etapas de alimentação, aeração, sedimentação e descarte (BEUN et al., 1999). Pesquisas recentes estão sendo conduzidas em RBS com alimentação e descarte simultâneos, também conhecido como RBS com volume constante (DERLON et al., 2016; Q.WANG et al., 2018). Apesar de a maioria dos sistemas LGA em escala real ser operado como RBS com alimentação e descarte simultâneos, por exemplo, a tecnologia Nereda®, os estudos aprofundados com essa configuração ainda são incipientes (NEREDA, 2017).

Os principais desafios da granulação aeróbia são o longo período para formação dos grânulos e a manutenção da estabilidade do grânulo em longos períodos de operação. A fim de resolver esses problemas, estudos demonstraram que a adição de cálcio (JIANG et al., 2003), magnésio (LI et al., 2009) e policloreto de alumínio(PAC) (LIU et al., 2015) podem proporcionar uma granulação mais rápida e, desse modo, melhorar a sedimentabilidade do lodo. A suplementação com pó de lodo seco (lodo micronizado) também apresentou benefícios para a estabilidade do grânulo, pois elimina filamentos através de mecanismos como colisão e fricção entre os grânulos, o que estimula a secreção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (LIU et al., 2019).

Nesse sentido, surge como alternativa para incrementar o processo de granulação as cinzas de carvão mineral. Os subprodutos sólidos da combustão do carvão mineral são, em

sua maioria, resíduos inorgânicos, sendo conceitualmente separados em cinzas volantes (leves, *flyash*) e cinzas de fundo (pesadas, *bottomash*) de fornalhas. Os compostos oxidados de silício (Si), alumínio (Al), ferro (Fe) e cálcio (Ca) são responsáveis por cerca de 90% da composição das cinzas, enquanto outros elementos como magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), titânio (Ti) e enxofre (S), ocorrem em menores quantidades e são responsáveis por uma pequena porcentagem da composição em massa (TIWARI et al., 2014).

Dessa forma, inicialmente, a cinza deve se comportar como um núcleo para a granulação (ZHANG et al., 2017) e, depois, funcionar como uma fonte de cátions bivalentes. Por fim, o atrito entre a cinza e o grânulo pode aumentar a resistência ao cisalhamento, tornando o grânulo mais estável. Ademais, até onde se sabe, ainda não foram realizados estudos desse tipo em RBS com alimentação e descarte simultâneos. O presente estudo tem o objetivo de investigar se a adição de cinza de carvão mineral pode reduzir o tempo de granulação em RBS volume constante.

5.2 Material e métodos

5.2.1 RBS: configuração e operação

Os experimentos foram realizados em dois RBS cilíndricos de acrílico, com diâmetro de 100 mm, altura total de 1 m e volume útil de 7,2 L. Os reatores foram operados em regime de alimentação e descarte simultâneos (Q. WANG et al., 2018) com ciclos de 6h.

O ciclo foi dividido em 30 min. de alimentação e descarte, 90 min. período anaeróbio/anóxico, 210-235 min. período aeróbio e 30-5 min. de sedimentação. A fim de estimular a granulação, o tempo de sedimentação foi reduzido gradualmente de 30 (Fase I) para 15 (Fase II), 10 (Fase III) e 05 (Fase IV) min. O tempo subtraído foi adicionado ao período aeróbio.

A alimentação e descarte foram realizados utilizando uma bomba peristáltica Masterflex, modelo BTG 2344. O volume de troca do reator foi de 50% com uma velocidade ascensional do líquido $0,92 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. Os aeradores foram posicionados na base dos reatores e produziram uma velocidade ascensional de ar de $2,12 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) entre $6\text{-}8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.2.2 Inóculo e solução de alimentação

Os reatores foram inoculados com lodo aeróbio de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) doméstico localizada em Fortaleza, Ceará, Brasil. A concentração de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) no licor misto era de aproximadamente $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e o Índice Volumétrico de Lodo em 30 min. (IVL_{30}) foi de $110 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$.

A alimentação era composta por etanol ($800 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$), amônia ($100 \text{ mg N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$), fosfato ($10 \text{ mg P-PO}_4^{3-}\cdot\text{L}^{-1}$), bicarbonato de sódio como tampão ($700 \text{ mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) e micronutrientes (SANTOS, 2005). O esgoto sintético foi mantido refrigerado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para evitar a degradação no tanque de alimentação.

Para analisar a influência da adição de cinza na granulação, o reator R1 foi mantido como controle e o R2 foi suplementado com cinza de carvão mineral a uma concentração de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\sim 3.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cálcio e $\sim 0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de magnésio). Ressalta-se que a adição de cinza foi realizada apenas uma vez no início da operação, pois o experimento realizado por Liu et al. (2015) mostrou que não houve diferença significativa na aplicação de PAC por curtos ou longos períodos em RBS. Entretanto, quando comparados ao reator controle, tiveram a granulação mais rápida. Ademais, essa frequência de suplementação foi escolhida a fim de evitar o aumento exagerado de material inerte no reator.

5.2.3 Métodos analíticos

A Demanda Química de Oxigênio (DQO), a concentração de nitrogênio em forma de amônia (N-NH_4^+), nitrito (N-NO_2^-) e nitrato (N-NO_3^-), e a concentração de fósforo como fosfato (P-PO_4^{3-}) foram quantificadas para avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica e nutriente. As análises foram realizadas duas vezes na semana no afluente e efluente conforme o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

A fim de caracterizar a sedimentabilidade do lodo, foi realizada a análise de Índice Volumétrico de Lodo (IVL) dinâmico, em que o IVL é mensurado nos tempos de 5, 10 e 30 min. (SCHWARZENBECK; BORGES; WILDERER, 2005). A periodicidade dessa análise também foi de duas vezes na semana.

Para caracterizar a cinza de carvão mineral adicionada ao reator R2, foi realizado o teste do extrato solubilizado conforme a NBR 10006: 2004 (ABNT, 2004). Nessa análise, 250 g de cinza são adicionadas a 1 L de água destilada. A solução é agitada por 5 min. e deixada em repouso por sete dias. Após esse período, a amostra foi filtrada em membrana com porosidade de $0.45 \text{ }\mu\text{m}$. A amostra filtrada foi analisada por espectro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) (Thermo Fisher iCAP 6000) para se

determinar as concentrações de cálcio e magnésio.

5.2.4 Caracterização do grânulo maduro

Ao final da etapa IV, foi realizada a análise de resistência nos grânulos maduros conforme NOR-ANUAR et al. (2012). Os grânulos (> 0.2 mm) foram submetidos, por 10 min., a uma força de cisalhamento causada por um agitador a 200 rpm. A fração fragmentada foi expressa em termos de coeficiente de estabilidade (S), o qual foi calculado pela relação entre sólidos na amostra de lodo antes e depois da agitação. De acordo com o valor de S, o material pode ser classificado em três categorias: muito estável ($S < 5\%$), estável ($5\% \leq S \leq 20\%$) e não estável ($S > 20\%$). Portanto, quanto menor o valor de S, maior a resistência do grânulo aeróbio ao cisalhamento.

Os grânulos maduros foram observados por microscópio óptico (Opton) e por Microscópio Eletrônico por Varredura (MEV) (Inspect S50 - FEI model) com resolução nominal de 03 nm para obter imagens mais detalhadas do grânulo. Um espectro de raios-X por energia dispersiva (EDX) foi utilizado para análise química semi-quantitativa. As amostras foram preparadas para análise de microscopia conforme metodologia proposta por Motteran et al. (2013). As análises foram realizadas na Central Analítica de Microscopia da universidade Federal do Ceará (UFC). O perfil granulométrico dos grânulos foi obtido utilizando-se peneiras com abertura de 0,2; 0,6 e 1,0 mm e a profundidade de penetração de oxigênio no grânulo foi estimada conforme DERLON et al. (2016) e HENZE et al. (2008).

As Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) foram quantificadas no final do experimento conforme metodologia descrita a seguir. As SPE foram extraídas em condições alcalinas com a adição de 5 mL de solução de NaOH 1M em 5 mL de licor misto. A mistura foi colocada em banho-maria a 80°C por 30 min. seguida pelo sonicador a 55 kHz por 5 min. (TAY; LIU; LIU, 2001c). Em seguida, as amostras foram filtradas em membrana com 0,45 μm de porosidade e diluídas duas vezes. Para determinação das proteínas (PN) foi utilizado método modificado de Lowry e para determinação dos polissacarídeos (PS) foi utilizado o método fenol-sulfúrico (LONG et al., 2014). A concentração total de SPE foi determinada pela soma das frações de PN e PS.

A profundidade de penetração de oxigênio nos grânulos foi estimada de acordo com as Equações 1 e 2 (DERLON et al., 2016; HENZE et al., 2008).

$$z = \sqrt{\frac{2 \times D_F \times C_{LF}}{k_{O,F} \times X_F}} \quad (1)$$

$$k_{O,F} \times X_F = K_{O,O_2,H} \times X_{H,F} + K_{O,O_2,AUT} \times X_{AUT,F} \quad (2)$$

z	Profundidade de penetração de oxigênio (m)
D_F	Coefficiente de difusão para oxigênio ($175 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{d}^{-1}$)
C_{LF}	Concentração de oxigênio na superfície dos grânulos (máximo = $8 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{L}^{-1}$)
X_F	Concentração de biomassa total ($10,000 \text{ g DQO} \cdot \text{m}^{-3}$)
$K_{O,O_2,H}$	Constante de ordem zero das bactérias heterotróficas para oxigênio ($7,2 \text{ g}_{O_2} \cdot \text{g}_{DQO}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
$X_{H,F}$	Consumo de oxigênio pelas bactérias heterotróficas (assumido como 2% do consumo total de biomassa: $0,02 \times 10,000 = 200 \text{ g}_{DQO} \cdot \text{m}^{-3}$)
$K_{O,O_2,AUT}$	Constante de ordem zero da biomassa autotrófica para oxigênio ($18,8 \text{ g}_{O_2} \cdot \text{g}_{DQO}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
$X_{AUT,F}$	Consumo de oxigênio pelas bactérias autotróficas (assumido como 98% do consumo total de biomassa: $0,98 \times 10,000 = 9800 \text{ g}_{DQO} \cdot \text{m}^{-3}$)

Para realizar a análise metagenômica, o DNA foi extraído, em triplicata, de uma amostra de 0,5 g (peso seco total) de lodo coletado no final da fase aeróbia da fase IV utilizando PowerSoil® MOBIO Kit. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram estimadas através do Nanodrop 1000 (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). A biblioteca de amplicons da região V4 do gene 16S rRNA foi preparada como descrito anteriormente (ILLUMINA, 2013), usando os iniciadores específicos da região (515F/806R). Após a indexação, os produtos de PCR foram limpos com contas de purificação AgencourtAMPure XP – PCR (BeckmanCoulter, Brea, CA, EUA), com base nas instruções do fabricante e quantificadas com o kit de ensaio dsDNA BR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em um fluorômetroQubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As bibliotecas foram sequenciadas usando o Kit de Reagentes MiSeq de 300 ciclos v2 (ILLUMINA, 2013) com um MiSeq Desktop Sequencer (Illumina).

Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados com ferramentas de

bioinformática da seguinte forma. Todas as leituras foram cortadas usando o vsearch v2.8.1, com os parâmetros `-fastq_maxee 0.8 -fastq_truncLen 250`. Todas as leituras foram agrupadas em OTUs usando o script QIIME `pick_open_reference_otus.py` com identidade de 99%, usando o banco de dados de rRNAGreengenes 16S (versão 13_8). O arquivo BIOM foi utilizado no PICRUST para inferir categorias funcionais associadas à composição taxonômica através das vias metabólicas KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000). A normalização do número de cópias de 16S para cada OTU foi calculada usando o script PICRUST `normalize_by_copy_number.py` e contribuições de vários táxons para diferentes KOs foram calculadas com o script `metagenome_contributions.py`. O estimador de cobertura baseado em abundância (ACE), Chao1, Inverso de Simpson, Shannon e cobertura foram calculados usando o software Mothur.

5.3 Resultado e discussão

5.3.1 Sedimentabilidade e retenção de lodo

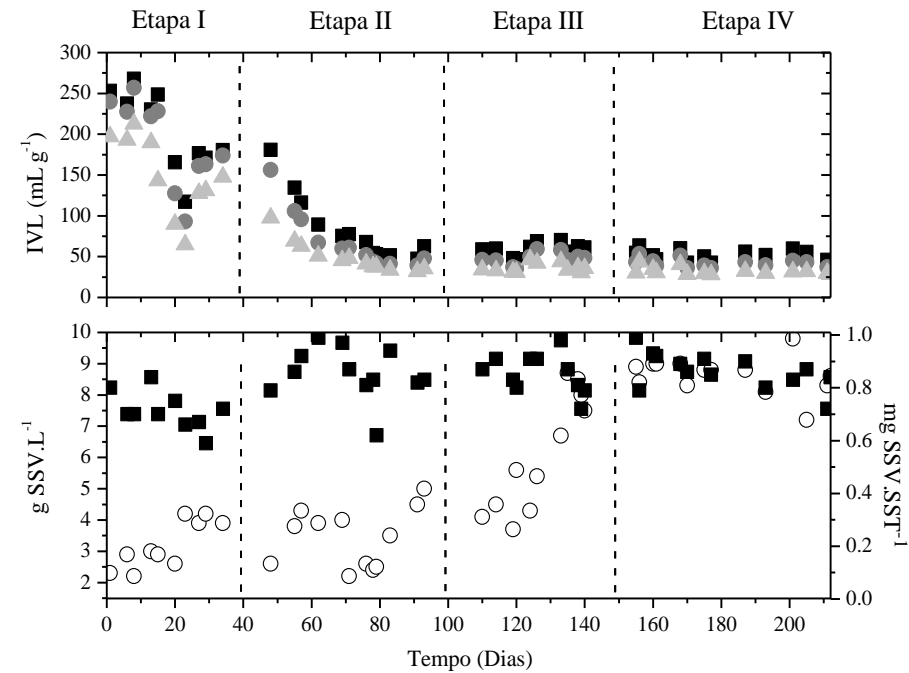
Os valores de IVL_5 , IVL_{10} , IVL_{30} e a concentração de sólidos suspensos voláteis no licor misto (SSVLM) ao longo das quatro fases de operação nos dois reatores são mostrados na Figura 5.1.

A diminuição gradativa no valor do IVL indica uma melhora na sedimentabilidade do lodo. A aproximação gradual dos valores de IVL_5 e IVL_{30} indica a mudança do lodo de floculento para granular (BASSIN et al., 2012a; CORSINO et al., 2016) e, nas fases III e IV, os valores estáveis mostram que os grânulos estão maduros. Esses grânulos apresentaram IVL_{30} entre 30 e 80 $mL \cdot g^{-1}$, o que corresponde à variação reportada na literatura para LGA operado em condições convencionais e a volume constante (DERLON et al., 2016; LIU et al., 2010; LONG et al., 2014). Ao final do experimento (etapa IV) os valores de IVL_{30} do R2 (~70 $mL \cdot g^{-1}$) são relativamente maiores que R1 (~50 $mL \cdot g^{-1}$), porém para essa diferença as razões são desconhecidas.

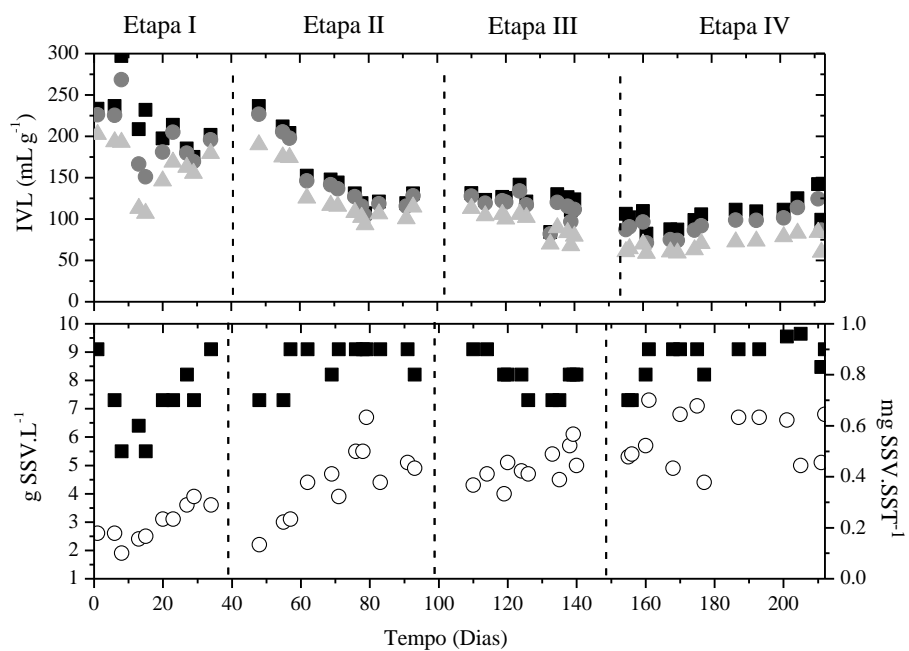
Referente à concentração de SSVLM (Figura 5.1), houve um aumento considerável conforme foi reduzindo o tempo de sedimentação, possivelmente devido ao uso de uma baixa velocidade ascensional do líquido (0,92 $m \cdot h^{-1}$) durante o período de alimentação/descarte, sendo considerada uma baixa pressão de seleção (ROLLEMBERG et al., 2019b). Em RBSs convencionais, o tempo de retenção de lodo (idade de lodo) tende a reduzir consideravelmente devido à redução do tempo de sedimentação ou a força de

cisalhamento gerada durante a alimentação, o que resulta em uma seleção de microrganismos com boa sedimentabilidade (KOŃCZAK; KARCZ; MIKSCH, 2014; PIJUAN; WERNER; YUAN, 2011).

Figura 5.1– Índice Volumétrico de Lodo e concentração de sólidos suspensos voláteis para RBS com alimentação e descarte simultâneos, operado na ausência (R1, controle, a) e na presença (R2, b) de cinza de carvão (■) IVL_{5} , (●) IVL_{10} , (▲) IVL_{30} , (○) SSVLM e (■) SSVLM/SSLM.



(a)



(b)

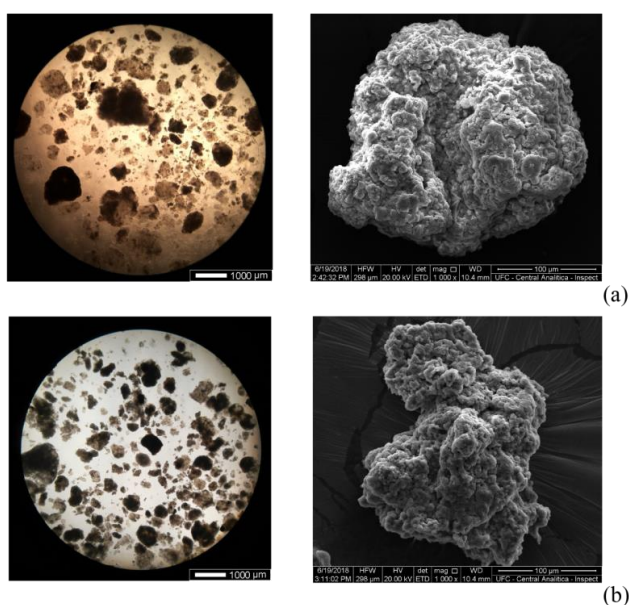
É importante mencionar que a adição de cinza causou uma redução na razão SSVLM/SSLM, alcançando valores de 0,5. Esse decaimento é esperado, pois o material adicionado se comporta como sólidos fixos. No entanto, essa razão começa a aumentar no dia 20,senda alcançada uma razão semelhante entre os reatores no dia 34. O fato de os dois reatores possuírem SSVLM similar é um indicativo de que a cinza foi eliminada do R2. Testes de sedimentação realizados com a cinza mostraram que após 30 min. ela sedimentava parcialmente. Considerando que o tempo de sedimentação inicial foi de 30 min., uma fração considerável da cinza deve ter sido arrastada em cada ciclo. Desse modo, a concentração de cinzas dentro do reator foi reduzindo e levando ao aumento da relação SSVLM/SSLM.

5.3.2 Caracterização do grânulo maduro

Ao final da fase IV, os reatores possuíam perfil granulométrico similar, com 98% da biomassa composta por grânulos com diâmetro maiores que 0,2 mm e 90% maiores que 1,0 mm. O resultado reforça a tendência observada nos valores de IVL e SSVLM.

Quanto à morfologia dos grânulos maduros, as imagens obtidas ao final da fase IV por MEV são apresentadas na Figura 5.2, que mostra ausência de cristais inorgânicos ou material orgânico além do material amorfo que cobre a superfície do grânulo. Os grânulos apresentam superfícies bem delineadas, com pequenas cavidades. Ressalta-se que não foram identificados traços de cinza na morfologia dos grânulos.

Figura 5.2–Micrografias obtidas por microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV), respectivamente, dos grânulos em um RBS com alimentação e descarte simultâneos, operado na ausência (R1, controle, a) e presença (R2, b) de cinza de carvão mineral.



Resultados diferentes foram obtidos por Liu et al. (2019), cujas imagens mostraram claramente a presença de micropó, sendo possível identificar a interação entre a cinza e o grânulo. Zhang et al. (2017) trabalharam com adição de *biochar*(biocarvão) e obtiveram imagens em que foi possível identificar o material como núcleo do grânulo. A ausência de cinza nos resultados obtidos por MEV sugere que o suplemento foi lavado do R2. Essa evidência está de acordo com os valores obtidos na relação SSVLM/SSLM, assim como com resultados do teste de sedimentação (ver secção 5.3.1)

Em relação à resistência do grânulo, os reatores R1 e R2 obtiveram coeficiente de estabilidade de 24,3% e 27,4%, respectivamente. Conforme classificação desenvolvida por Nor-Anuar et al. (2012), eles podem ser classificados como não estáveis. Xavier (2017), trabalhando com RBS convencional em escala piloto tratando esgoto real, obteve coeficientes de estabilidade em torno de 25%. Entretanto, a autora enfatiza que a força aplicada durante o teste de resistência é muito superior à existente dentro do reator e, por isso, analisar somente o valor absoluto desse coeficiente não fornece informações relevantes sobre o sistema. Todavia, são relevantes quando são comparados sistemas diferentes. Desse ponto de vista, não é possível afirmar que os grânulos são frágeis, mas que os sistemas apresentam lodo com resistência similar. Portanto, a adição de cinza não influenciou o grânulo quanto à resistência ao cisalhamento.

Referente à composição do SPE, R1 e R2 obtiveram concentrações semelhantes. As frações de PN foram de 44 e 42 mg·g SSVLM⁻¹ e de PS foram de 93 e 92 mg·g SSVLM⁻¹, respectivamente. Os resultados de EDX reforçam o resultado, pois a composição dos grânulos foi similar: C (R1: 33.5%; R2: 40%) e O (R1:39.8%; R2: 25%), com pequenas frações de K, P, Na, Cl e S.

5.3.3 Mecanismos de formação e manutenção do grânulo na presença de cinza de carvão mineral

Quanto ao papel desempenhado pelas cinzas na formação e manutenção dos grânulos, uma possibilidade é a cinza ter funcionado como núcleo para granulação, analogamente ao biocarvão utilizado por Zhang et al. (2017). Outra probabilidade é dos íons (Si⁴⁺, Fe³⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺) liberados do micropó terem facilitado a agregação dos microrganismos, conforme descrito por Liu et al. (2019), que trabalharam com lodo seco micronizado. Os autores também sugeriram que o atrito entre o micropó e os grânulos durante a aeração pode ter promovido o controle de filamentos, quebrando-os a partir da superfície.

Essa fricção também pode ter estimulado a secreção de SPE, que funcionam como uma forma de proteção da biomassa contra a tensão de cisalhamento. A suplementação também aumentou a DQO e a matéria orgânica particulada, o que, cineticamente, desfavorece as bactérias filamentosas em termos de consumo de substrato.

No presente estudo, o aumento da DQO e da matéria orgânica particulada não pode ser considerado como um possível mecanismo de estabilização dos grânulos porque a cinza não possuía compostos orgânicos. Portanto, outros três mecanismos de atuação da cinza para formação e/ou manutenção dos grânulos foram propostos: (hipótese 01) comportou-se como núcleo no processo de granulação; (hipótese 02) funcionou como fonte de íons (cátions e ânions) e (hipótese 03) gerou atrito com os grânulos. A primeira hipótese pode ser refutada porque as imagens obtidas por microscopia não mostram cinza de carvão mineral no núcleo do grânulo. Ademais, a composição da matriz de exopolissacarídeos obtida por EDX reforça esta conclusão.

Em relação à segunda hipótese, as concentrações estimadas de cálcio e magnésio foram respectivamente $3.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Essas concentrações são insuficientes para produzirem mudanças significativas no lodo, pois são muito menores do que as reportadas em pesquisas que obtiveram alterações expressivas. Por exemplo, Jiang et al. (2003) trabalharam com RBS convencional com adição de $100 \text{ mg Ca}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$ em cada ciclo e obtiveram IVL_{30} menor (reator controle: $150 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, reator com adição de cálcio: $100 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), maior retenção de lodo (reator controle: $2 \text{ g SS}\cdot\text{L}^{-1}$, reator com adição de cálcio: $7.9 \text{ g SS}\cdot\text{L}^{-1}$) e aumento de polissacarídeos nas SPE (reator controle: $41 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, reator com adição de cálcio: $92 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Li et al. (2009) também trabalharam com o mesmo tipo de reator, porém suplementado com $10 \text{ mg Mg}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$ em cada ciclo. Eles obtiveram maior concentração de lodo no licor misto (reator controle: $6.8 \text{ g SSLM}\cdot\text{L}^{-1}$, reator com adição de magnésio: $7.6 \text{ g SSLM}\cdot\text{L}^{-1}$), grânulos maiores (reator controle: 1.8 mm , reator com adição de magnésio: 2.9 mm) e aumento na produção de PS (reator controle: $35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, reator com adição de magnésio: $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Entretanto, o IVL_{30} se manteve semelhante (entre 20 e $25 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$).

Por fim, referente à hipótese 03, como os grânulos do reator controle (R1) não desenvolveram filamentos, é razoável assumir que o mesmo ocorreria com o R2. Nesse meio, os efeitos do atrito não puderam ser observados porque não havia filamentos na superfície do grânulo para serem quebrados. Isso pode explicar o porquê de não haver grande diferença entre as propriedades de sedimentação e retenção de lodo nos reatores. Comportamento similar foi observado por Liu et al. (2019) quando aplicaram material micronizado em grânulos sem filamentos dispersos. Os valores de IVL_{30} tiveram uma pequena redução, de 55

a $45 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ e a concentração de lodo no reator teve um ligeiro aumento de 3,8 para $4 \text{ g SSVLM}\cdot\text{L}^{-1}$.

Além disso, o *washout* das cinzas, evidenciado pela relação SSVLM/SSLM e análise de MEV, pode ter reduzido a possibilidade de contato entre os grânulos e as cinzas, reduzindo a força de contato. Essa redução, combinada com ausência de filamentos na superfície do grânulo, pode ter tornado o atrito um mecanismo de estabilização ineficiente. Na falta dessa força promovida pelas cinzas, a produção de SPE não é estimulada, o que pode explicar a composição similar dos exopolissacarídeos nos reatores.

O carregamento das cinzas se torna um fator ainda mais relevante quando se consideram as hipóteses 02 e 03, pois nesses casos a concentração do agente utilizado influencia fortemente no resultado. Entretanto, como as cinzas estiveram no reator por pelo menos 20 (vinte) dias (ver tópico 5.3.1), poderiam ter atuado como núcleo no processo de granulação. O fato de não terem exercido essa função parece indicar que esse mecanismo não estava dentro da capacidade do sistema.

5.3.4 Remoção de matéria orgânica e nutrientes

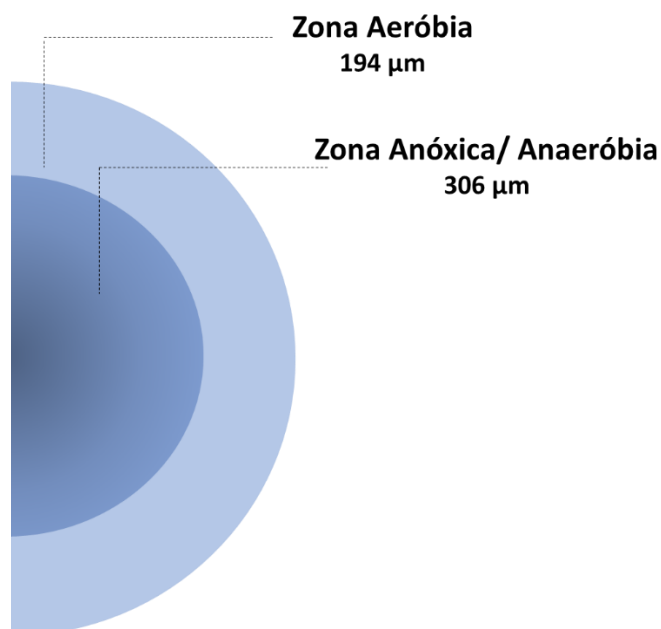
Os resultados referentes à remoção de DQO, nitrogênio e fósforo, Tabela 5.1, mostram que os reatores tiveram um desempenho semelhante ao longo das fases de operação. As remoções de DQO se mantiveram acima de 90% nos dois sistemas. Esses valores correspondem àqueles reportados na literatura para RBS convencional e RBS com alimentação e descarte simultâneos, cujas eficiências são iguais ou superiores a 80% (DERLON et al., 2016; LIU et al., 2010; LONG et al., 2014).

Em relação à remoção de nitrogênio, a baixa concentração de amônia e nitrito no efluente em comparação ao nitrato indica a ocorrência de nitrificação completa. Todavia, o acúmulo de nitrato mostra que o processo de nitrificação e desnitrificação simultâneos não ocorreu em níveis consideráveis, principalmente com altas concentrações de OD dentro do reator ($6\text{-}8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Esse comportamento pode ser explicado por dois motivos: pela ausência de uma zona anóxica no interior dos grânulos ou falta de substrato (matéria orgânica durante o ciclo).

No entanto, de acordo com as estimativas, a profundidade de penetração de oxigênio foi de $194 \mu\text{m}$. Como a maioria dos grânulos tinha pelo menos 1 mm de diâmetro (consulte a seção 3.3) e, considerando que a nitrificação ocorreu em altos níveis, o raio da zona anóxica no interior dos grânulos seria de $306 \mu\text{m}$ (Figura 5.3). Portanto, é provável que a

baixa ocorrência de desnitrificação esteja sendo causada pela escassez de substrato no final da fase de aeração (ZHONG et al., 2013).

Figura 5.3 –Esquema das zonas com presença de oxigênio nos LGAs.



Durante a operação dos sistemas o pH do afluente e efluente se manteve próximo à neutralidade variando entre 6,5 e 8. Em termos de alcalinidade, a quantidade disponibilizada no afluente ($\sim 700 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) tendeu a ser consumida pela predominância do processo de nitrificação.

A remoção de fósforo abaixo de 60% é considerada baixa, principalmente para reatores operados com ciclos contendo fase anaeróbia, pois o objetivo de incluir esse período é melhorar a remoção dessa substância (BASSIN, 2011). H. Wang et al. (2018), por exemplo, trabalharam com RBS convencional, com 2 h de fase anaeróbia em um ciclo de 6 h, e obtiveram remoção de fósforo de 98%.

A baixa remoção de fósforo pode estar associada ao acúmulo de nitrato. Com o acúmulo desse íon dentro do reator, a alimentação ocorreu em um ambiente anóxico, o que favoreceu a competição por substrato entre organismos desnitrificantes heterotróficos (ODH) e organismos acumuladores de polifosfato (OAP). Nesse caso, devido à cinética das reações envolvidas na remoção, OAP são desfavorecidas na competição com ODH (WANG et al., 2018).

Portanto, a completa desnitrificação do nitrato acumulado durante o ciclo anterior ocorre após o período de alimentação, prejudicando a atuação dos OAP. Então, com o início da aeração, a concentração de nitrato tende a aumentar. Esse íon irá acumular novamente

devido à ausência de substrato, nesse período do ciclo, para o processo de transformação em nitrogênio gasoso. Desse modo, tanto o processo de desnitrificação quanto o de remoção têm suas eficiências reduzidas.

Tabela 5.1– Desempenho operacional do RBS com alimentação e descarte simultâneos, operado na ausência (R1, controle) e presença (R2) de cinza de carvão mineral.

Fase	R1				R2				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
DQO	Afluente (mg·L ⁻¹)	985 (123)	776 (107)	694 (86)	694 (149)	985 (123)	776 (107)	694 (86)	694 (149)
	Efluente (mg·L ⁻¹)	31 (24)	54 (38)	21 (17)	28 (15)	54 (10)	34 (25)	21 (13)	23 (12)
	Eficiência (%)	94 (2)	93 (5)	97 (2)	96 (3)	94 (1)	95 (3)	97 (2)	96 (3)
Frações de Nitrogênio	Afluente NH ₄ ⁺ (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹)	114 (16)	96 (8)	93 (6)	92 (8)	114 (16)	96 (8)	93 (6)	92 (8)
	Efluente NH ₄ ⁺ (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹)	3 (3)	13 (7)	10 (6)	10 (6)	0,4 (0,2)	9 (6)	8 (5)	9 (6)
	Efluente NO ₂ ⁻ (mg N-NO ₂ ⁻ ·L ⁻¹)	8 (2)	8 (4)	13 (5)	4 (3)	4 (3)	8 (5)	8 (6)	4 (3)
	Efluente NO ₃ ⁻ (mg N-NO ₃ ⁻ ·L ⁻¹)	45 (15)	26 (12)	26 (8)	23 (6)	57 (9)	28 (11)	27 (8)	23 (8)
	Eficiência da Nitrificação (%)	96 (10)	98 (12)	91 (8)	83 (6)	99 (15)	90 (10)	91 (8)	89 (7)
	Eficiência da remoção total de nitrogênio (%)	51 (9)	51 (11)	47 (10)	59 (10)	46 (14)	53 (12)	53 (10)	60 (10)
pH	Afluente	7,4 (0,5)	7,5 (0,3)	7 (0,5)	7,5 (0,2)	7,4 (0,5)	7,5 (0,3)	7,0 (0,5)	7,5 (0,2)
	Efluente	7,8 (0,4)	8,0 (0,2)	7,6 (0,3)	7,5 (1)	7,5 (0,8)	7,7 (0,6)	7,8 (0,3)	7,9 (0,1)
Alcalinidade	Afluente (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)	694 (204)	783 (130)	631 (130)	723 (68)	694 (204)	783 (130)	631 (130)	723 (68)
Total	Efluente (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)	275 (172)	458 (157)	312 (116)	367 (165)	255 (178)	378 (81)	340 (106)	322 (83)
Fósforo	Afluente (mg P-PO ₄ ³⁻ ·L ⁻¹)	8 (1)	8 (1)	7 (1)	11 (2)	8 (1)	8 (1)	7 (1)	11 (2)
	Efluente (mg P-PO ₄ ³⁻ ·L ⁻¹)	5 (1)	3 (1)	4 (1)	9 (2)	4 (1)	5 (2)	4 (2)	9 (2)
	Eficiência (%)	39 (10)	56 (14)	38 (14)	23 (9)	45 (15)	39 (8)	40 (21)	18 (17)

O desvio padrão é mostrado entre parênteses.

5.3.5 Diversidade da comunidade microbiana

A análise metagenômica encontrou 1731 indivíduos no lodo de inóculo, 2739 no lodo reator controle (R1) e 2790 no lodo exposto às cinzas (R2). A diversidade e a riqueza da comunidade bacteriana (Tabela 5.2) foram analisadas através de cinco índices (Cobertura, Gini-Simpson, Shannon, Chao1 e ACE). Os índices de Gini-Simpson e Shannon mostraram que a diversidade das espécies no reator após a granulação (Fase IV) foi similar à do lodo de inóculo. Entretanto, os índices Chao1 e ACE indicam uma diferença na riqueza da comunidade bacteriana entre o lodo de inóculo e os reatores. Esses valores mostram que o processo de granulação em RBS com alimentação e descarte simultâneos influenciou mais a seleção da comunidade bacteriana do que o uso da cinza de carvão mineral.

Tabela 5.2– Indicadores de riqueza e diversidade das espécies da comunidade bacteriana presente no lodo de inóculo, reator na ausência (R1) e presença (R2) de cinza de carvão mineral.

Amostra	Cobertura (%)	Gini-Simpson	Shannon	Chao1	ACE
Inóculo	99,2	0,95	5,1	7,2	17,9
R1	98,5	0,95	5,0	29,5	27,3
R2	98,5	0,98	5,4	29,5	28,3

Entre os microrganismos com abundância maior que 10%, os filos mais relevantes encontrados foram Proteobacteria, Chlorobi, Bacteroidetes, Planctomycetes, Chloroflexi e Verrucomicrobia (Figura 5.3). Esses filos foram encontrados de forma abundante tanto em sistemas LGA quanto em lodos ativados (HE et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Proteobacteria foi o principal filo na comunidade microbiológica nos dois reatores. Esses resultados indicam que a cinza não promoveu uma forte pressão de seleção no nível de filo. Rhodocyclaceae foi uma das famílias presente nos três lodos analisados (inóculo: 4,5%, R1: 6,9%, R2: 5,7%). Alguns estudos associam essa família à produção de SPE (SZABÓ et al., 2017).

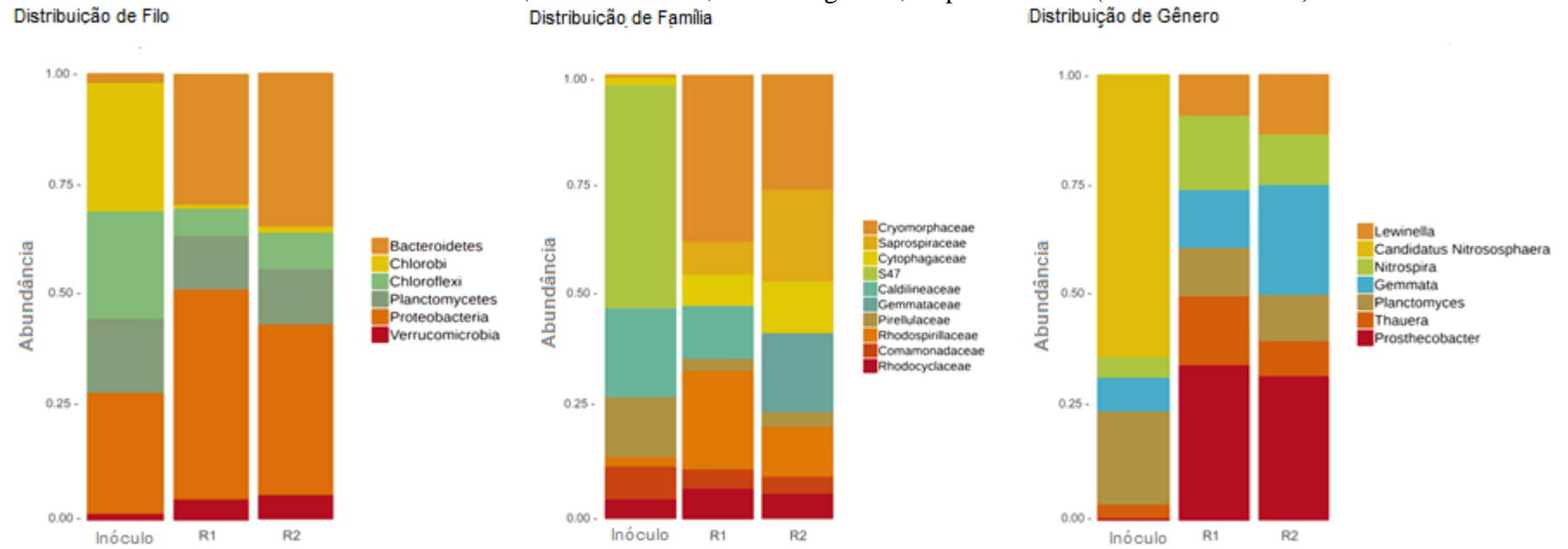
A presença desses tipos de microrganismos é fundamental para o processo de granulação, visto que exopolissacarídeos são formados principalmente por PS, PN e produtos microbianos solúveis (PMS) que permitem que várias populações se agreguem, principalmente quando a pressão de seleção é limitada. Adicionalmente, algumas bactérias além de utilizar os carboidratos e proteínas presentes no meio, também são responsáveis pela degradação dos PMS, como é o caso de algumas espécies da família Saprospiraceae (FU et al., 2017; SACK; VAN DER WIELEN; VAN DER KOOIJ, 2014). No presente estudo, elas foram

favorecidas pela granulação e no reator com a presença de cinzas estavam mais presentes (inóculo:3,8%, R1: 7,3% e no R2: 20,8%).

No nível de gênero, a granulação alterou o perfil da população bacteriana envolvida no processo de remoção de nitrogênio. No lodo de inóculo, *CandidatusNitrososphaera*(63%) era responsável pela oxidação da NH_4^+ a NO_2^- , e *Nitrospira* (4.5%), pela oxidação do NO_2^- a NO_3^- . Entretanto, após a granulação, o primeiro grupo não se adaptou, e a conversão da NH_4^+ a NO_2^- foi realizada pela *Prostheco bacter* (R1: 34% e R2: 32%) (XU et al., 2018), mesmo com abundância menor que 1% lodo de inóculo, enquanto a *Nitrospira* continuou a converter NO_2^- a NO_3^- (R1: 16% e R2: 11%).

O gênero *Thauer* também cresceu em abundância ao final do experimento (inóculo: 3%, R1: 15%, R2: 8%). Esse gênero de microrganismos desnitrificantes é caracterizado por degradar uma ampla variedade de compostos orgânicos em condições anaeróbias, incluindo glicose, acetato, propionato, piruvato, ácido oleico, aminoácidos e etanol. Em condições anóxicas, vários substratos são consumidos, com exceção da glicose e ácido oleico (THOMSEN; KONG; NIELSEN, 2007).

Figura 5.4– Distribuição da população microbiana do inóculo e amostras coletadas do sistema operado na ausência (R1, controle) e presença (R2) de cinza de carvão mineral, no nível de filo, família e gênero, respectivamente (abundância >10%).



5.4 Conclusão

A granulação foi alcançada em RBS com alimentação e descarte simultâneos. Com a adição de cinza de carvão mineral, resíduo de uma termelétrica, não foram observadas diferenças significativas em termos de sedimentabilidade, retenção da biomassa, morfologia, resistência ao cisalhamento e composição da matriz de SPE. A remoção de DQO foi elevada ($\geq 90\%$), enquanto as eficiências de nitrogênio ($\sim 50\%$) e fósforo ($\sim 40\%$) foram baixas, possivelmente devido à presença de nitrato durante a fase anaeróbia.

Com a granulação, o perfil da população da comunidade microbológica foi modificado, principalmente no nível de gênero. De modo geral, as condições operacionais tiveram mais influência na granulação do que a adição de cinza, possivelmente porque a suplementação foi realizada apenas uma única vez. Adicionalmente, a baixa taxa de sedimentação do material adicionado e a fraca interação entre a cinza e as SPE no lodo granular também contribuíram para reduzir a influência da suplementação.

Os fatores mencionados acima reduziram ou impediram que a cinza atuasse como núcleo no processo de granulação, como fonte de cátions e como elemento abrasivo.

6 CAPÍTULO IV–EFEITO DA ADIÇÃO DE CÁLCIO EM SISTEMAS DE LGA SUBMETIDOS À ELEVADA (RBS CONVENCIONAL) E BAIXA (RBS COM ALIMENTAÇÃO/DESCARTE SIMULTÂNEOS) PRESSÃO DE SELEÇÃO

6.1 Introdução

O lodo granular aeróbio (LGA) é uma evolução do lodo ativado, sendo desenvolvidos principalmente em reatores em bateladas sequenciais (RBS). Esses reatores podem funcionar em duas configurações: a convencional ou volume variável, na qual as fases de alimentação, reação, sedimentação e descarte ocorrem de forma subsequente, e a com alimentação/descarte simultâneos ou volume constante (ROLLEMBERG et al., 2019b). Enquanto a primeira é amplamente utilizada em pesquisas laboratoriais, a segunda é adotada em reatores de escala real, notadamente nos sistemas Nereda®(DERLON et al., 2016). No entanto, ainda são poucos os trabalhos científicos que tratam da segunda configuração (BARROS et al., 2020; DERLON et al., 2016; ROLLEMBERG et al., 2019; WANG et al., 2018).

Na configuração convencional, o tempo de sedimentação e o volume de troca do reator, os quais podem ser simultaneamente expressos pela velocidade mínima de sedimentação (V_{ms}), são as principais pressões de seleção hidráulica que podem induzir a granulação, sendo que, para V_{ms} menores que $3,8 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, flocos de lodo ativado predominam no sistema (LIU et al., 2005a). Já na configuração com alimentação/descarte simultâneos, a granulação é motivada pela velocidade ascensional do líquido (V_{al}) durante a alimentação, tendo em vista que somente os agregados microbianos com velocidade de sedimentação menores do que essa são eliminados dos reatores (DERLON et al., 2016). V_{al} em torno de $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ mostraram-se capazes de promover eficazmente a seleção de biomassa granular (BARROS et al., 2020a; DERLON et al., 2016).

Além disso, a configuração escolhida exerce influência sobre as características da biomassa obtida. O LGA cultivado em RBS convencional apresenta grânulos maiores e com melhor sedimentabilidade, apesar de a retenção de biomassa no reator ser menor quando comparada àquela desenvolvida em RBS com alimentação/descarte simultâneos (ROLLEMBERG et al., 2019b). Curiosamente, a configuração dos reatores também parece ter efeito sobre a extensão com que a presença de íons divalentes é capaz de influenciar as características dos grânulos (BARROS et al., 2020).

Trabalhando com a configuração convencional e adição de $100 \text{ mg Ca}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$, Jiang

et al. (2003) obtiveram, comparativamente ao reator controle, grânulos com tamanhos médios consideravelmente maiores (Controle: 2 mm; Cálcio: 2,8 mm), maior retenção de biomassa (Controle: 2 g SSVLM·L⁻¹; Cálcio: 7,9 g SSVLM·L⁻¹) e maior produção de polissacarídeos (PS) extracelulares (Controle: 41 mg·g SSVLM⁻¹; Cálcio: 92 mg·g SSVLM⁻¹). Os grânulos enriquecidos com cálcio, também apresentaram resistência ao cisalhamento significativamente maior (aferida pelo método da turbidez).

Por sua vez, utilizando RBS com alimentação/descarte simultâneos com a mesma adição de cálcio, Barros et al. (2020) reportaram que o cálcio não alterou significativamente a distribuição granulométrica do lodo, a retenção de biomassa (em torno de 8 g SSVLM·L⁻¹), a produção de polissacarídeos (PS) e proteínas (PN) extracelulares (Controle: 93 ± 8 mg PS·g SSVLM⁻¹, 44 ± 5 mg PN·g SSVLM⁻¹; Cálcio: 87 ± 8 mg PS·g SSVLM⁻¹, 50 ± 5 mg PN·g SSVLM⁻¹) nem resistência ao cisalhamento dos grânulos (método do coeficiente S). Além disso, o conteúdo de cálcio dos grânulos encontrado por *Energy Dispersive X-ray (EDX) analysis* foi baixo (1,1%) quando comparado àquele observado por Ren et al. (2008) (≈14%) em RBS convencional enriquecido com apenas 40 mg Ca²⁺·L⁻¹.

No entanto, no estudo previamente conduzido (BARROS et al., 2020a), trabalhou-se apenas com RBS com alimentação/descarte simultâneos, não havendo RBS convencionais para comparação direta. Tendo em vista que, em outros trabalhos reportados na literatura, as condições operacionais, tipo de substrato, concentração de cálcio, inóculo etc., eram diferentes, e uma comparação muitas vezes não era possível ou poderia incorrer em falsas interpretações, fazia-se necessária uma condução experimental nas mesmas condições para melhor elucidar o efeito de cátions divalentes. Assim, o presente capítulo estudou o efeito da adição de cálcio em sistemas de LGA submetidos à elevada (RBS convencional) e baixa (RBS com alimentação/descarte simultâneos) pressão de seleção.

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Configuração dos sistemas

Quatro reatores em bateladas sequenciais (RBS) com volume útil de 7,2 L, 1 m de altura e 100 mm de diâmetro foram operados para cultivo de lodo granular aeróbio a partir de inóculo de lodo ativado (3,6 L; 2,1 g SSV·L⁻¹). Inicialmente, os reatores R1 (controle) e R2 (com 100 mg Ca²⁺·L⁻¹) foram operados como RBS com alimentação/descarte simultâneos com alimentação mantida em 1 m·h⁻¹ durante 30 min., seguido de fase anaeróbia/anóxica sem

agitação (60 min.), aeração (250 min.) e sedimentação (20 min.). O mesmo tempo de alimentação, fase anaeróbia/anóxica e aeração foram imprimidos aos reatores R3 (controle) e R4 (com $100 \text{ mg Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$), operados como RBS convencional, retirado da fase de sedimentação 1 min para o descarte de efluente.

Para induzir a granulação nos reatores, os tempos de sedimentação foram gradualmente diminuídos, constituindo três etapas de operação: Etapa I, com tempo de sedimentação (T_{sed}) de 20 min. durante 14 dias, Etapa II com T_{sed} de 10 min. durante 25 dias e Etapa III T_{sed} de 5 min. durante 24 dias. Os tempos subtraídos da fase de sedimentação foram adicionados à fase de aeração. É importante ressaltar que, apesar de o tempo de sedimentação não ser uma importante pressão de seleção em RBS com alimentação/descarte simultâneos, os reatores R1 e R2 também foram expostos às etapas de operação citadas com o intuito de manter as condições dos quatro reatores as mais idênticas possíveis.

Os reatores foram alimentados com solução sintética de alimentação contendo carbono solúvel na forma de acetato ($\sim 500 \text{ mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$), amônio como fonte de nitrogênio ($\sim 50 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$), fosfato ($\sim 7 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$), bicarbonato de sódio como alcalinizante ($\sim 1 \text{ g NaHCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) para manter o pH do sistema entre 7-8 e solução de micronutrientes ($\sim 1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$), cuja composição foi adaptada a partir de Santos (2005). Além disso, os reatores R2 e R4 tiveram alimentação adicionada de $100 \text{ mg Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$. As soluções de alimentação foram mantidas armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para evitar sua degradação, enquanto os reatores foram operados à temperatura ambiente ($27\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$).

6.2.2 Análises de acompanhamento

De acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), as seguintes análises foram realizadas três vezes por semana: demanda química de oxigênio (DQO) (afluente e efluente); concentração de amônia ($\text{NH}_3\text{-N}$), nitrito ($\text{NO}_2^-\text{-N}$), nitrato ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) e fosfato ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) (afluente e efluente) e sólidos suspensos voláteis (efluente e do licor misto). Com a mesma frequência foi aferido o IVL para 30 e 5 min. (SCHWARZENBECK; BORGES; WILDERER, 2005).

As substâncias poliméricas extracelulares (SPE) e suas frações de proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) foram monitoradas uma vez por semana através dos métodos de extração e detecção previamente descritos (BARROS et al., 2020a). Com a mesma frequência, as distribuições granulométricas das biomassas também foram determinadas por imagens de microscopia óptica das biomassas cultivadas.

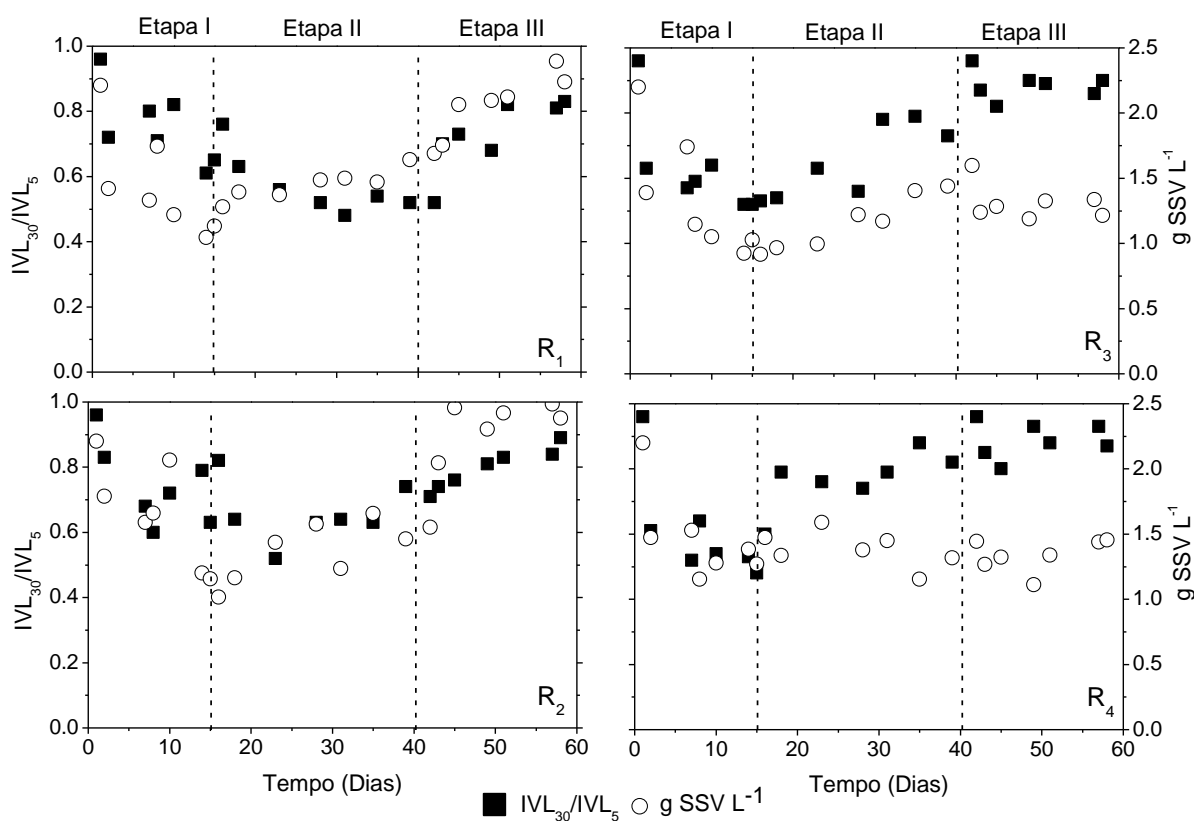
Ao final da última etapa de operação, a forma e composição dos grânulos formados foram analisados em um *Scanning Electron Microscope combined with an energy dispersive X-ray detector* (SEM-EDX) (Inspect S50 - FEI). A preparação das amostras foi feita segundo Motteran et al. (2013).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Sedimentabilidade e tamanho dos grânulos

O IVL_{30} do lodo de inóculo inserido nos sistemas era de $166 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ com uma concentração de $2,1 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$. No início da operação (Etapa I), os quatro sistemas apresentaram uma queda da concentração de sólidos no reator, que deve estar relacionada a uma adaptação do lodo às condições operacionais (Figura 6.1).

Figura 6.1 – Relação IVL_{30}/IVL_5 e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) para os RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).



Para Wang et al. (2018), utilizando RBS com alimentação/descarte simultâneos com velocidade ascensional do líquido na alimentação de $0,67 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, a perda de lodo no momento inicial da operação estava relacionada ao varrimento (*washout*) do lodo causado pela desnitrificação durante o período de alimentação. Contudo, na presente pesquisa esse fator não foi evidente. Para as Etapas II e III, os sólidos no R3 e R4 tenderam a se estabilizar, enquanto no R1 e R2 foi observado um acúmulo, chegando ao final do experimento uma concentração próxima a $2,5 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$. De fato, a aplicação de baixas pressões de seleção tendem a manter maior quantidade de lodo no reator (LIU et al., 2005a; NANCHARAI AH; REDDY, 2018).

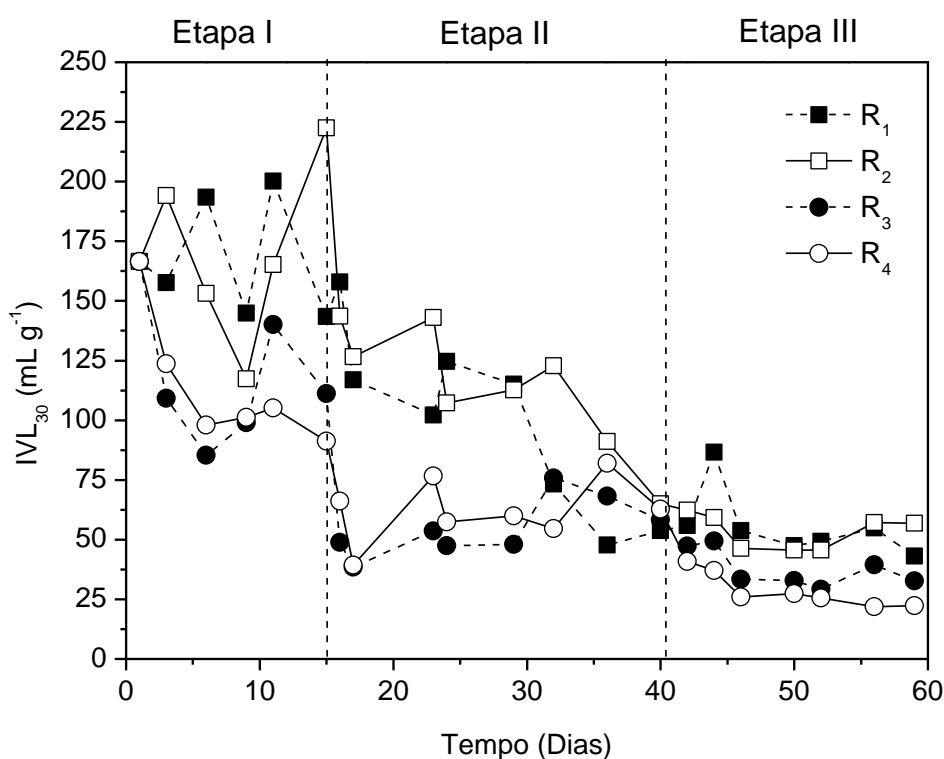
O comportamento da relação $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_5$ do RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) segue a mesma tendência do R2 suplementado com Ca^{2+} , apresentando ao final da Etapa III valores próximos a 0,8 (Figura 6.1). Por outro lado, o RBS convencional R4 também suplementado com Ca^{2+} apresentou um aumento na relação de IVL mais cedo que no R3 (controle). Assim, por volta do 20º dia de operação, o $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_5$ dos reatores R1 e R2 eram de 0,76 e 0,65, respectivamente, alcançando valores superiores a 0,9 na Etapa III, assim indicando melhor sedimentabilidade (BASSIN et al., 2012b; DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007a; LIU et al., 2005b) em relação aos reatores R1 e R2.

Quando se analisa apenas o perfil do IVL_{30} , mostrado na Figura 6.2, observa-se que o regime operacional dos reatores R3 e R4 favoreceu a uma queda mais acentuada do IVL_{30} que nos outros dois sistemas, porém os perfis dos dois tipos de sistemas foram semelhantes. Tais observações já foram reportadas por Rollemberg et al. (2019), analisando apenas a diminuição dos tempos de sedimentação de 20 para 10 min. em configurações de ciclo similares aos aplicados nesta pesquisa. De acordo com os autores, o mecanismo físico de seleção dos grânulos na configuração de volume variável estava ligado diretamente à velocidade mínima de sedimentação da biomassa durante o tempo de sedimentação do ciclo. Por outro lado, no reator com alimentação/descarte simultâneos, o mecanismo físico de seleção da biomassa era a velocidade de sedimentação do lodo ser superior à velocidade de fluxo ascendente durante o enchimento, e não ao tempo de sedimentação propriamente dito. No entanto, pelo perfil de IVL_{30} entre as Etapas II e III, é observado um efeito positivo nos valores de sedimentabilidade, mostrando que a diminuição no tempo de sedimentação do ciclo pode intensificar a pressão de seleção para este tipo de configuração de RBS.

Aparentemente, os dois perfis de reatores são semelhantes, porém existem algumas peculiaridades que indicam efeitos do cálcio nas biomassas formadas. Para o R2, foi observado uma queda mais recente do IVL_{30} a partir do 30º dia de operação quando

comparado ao R1. Porém, para esse mesmo período, a relação IVL_{30}/IVL_5 era de 0,6 e, no controle, de 0,5. Entre os reatores de volume variável, o IVL_{30} do reator suplementado com Ca^{2+} caiu mais rapidamente que o do reator controle (a partir do 10º dia), e é observado um aumento mais acentuado de IVL_{30}/IVL_5 no dia 15º quando comparado ao reator controle (R3: 0,5 e R4: 0,7). Com isso, aparentemente observa-se que o cálcio apresentou maior impacto na sedimentação do lodo no RBS convencional ou de volume variável.

Figura 6.2 – Valores de IVL_{30} para os RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).

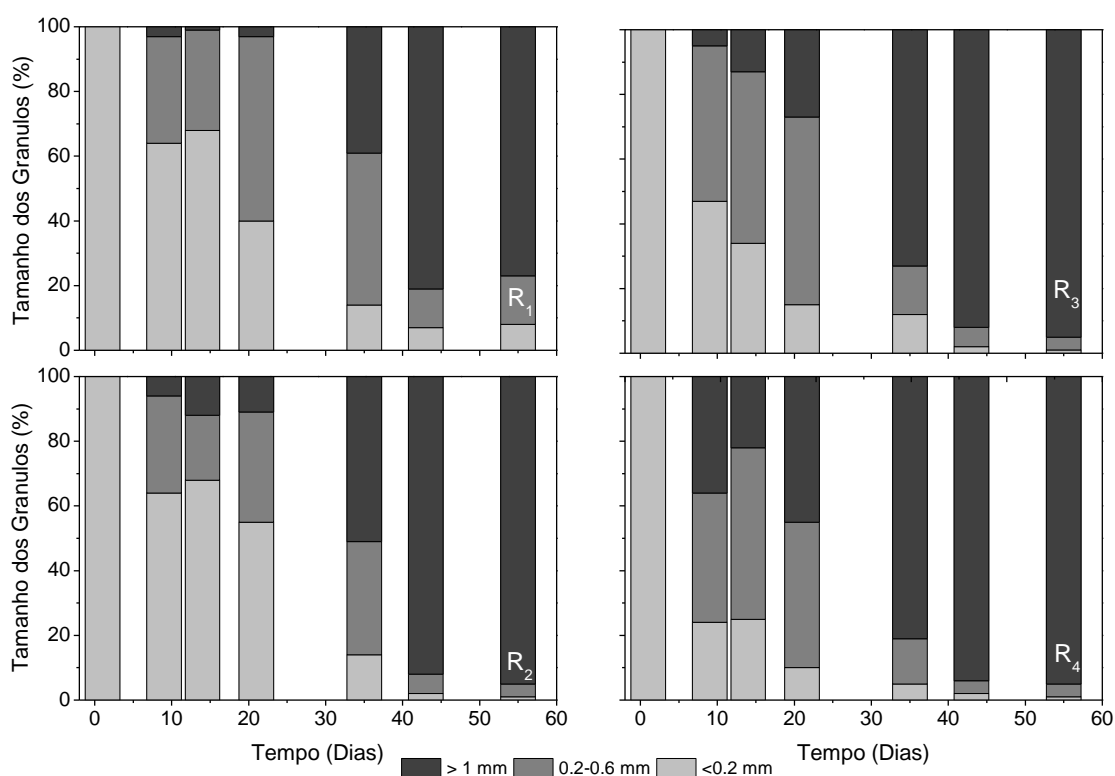


Outros estudos também observaram melhoras na sedimentabilidade de LGA com a adição de cálcio. Jiang et al. (2003) registraram diferenças no volume de lodo de $172 \pm 10 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ para o lodo controle e de $73 \pm 7 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ para o lodo com a presença de cálcio em termos de IVL_{30} (reator de volume variável com alimentação de $100 \text{ mg Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ e operado com tempo de sedimentação de 2 min.). Diferenças mais sutis foram observadas por Barros et al. (2020), utilizando RBS com alimentação/descarte simultâneos com tempo de sedimentação de 5 min., em que foram formados grânulos com IVL_{30} abaixo de $50 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ e entre 60 e $80 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ nos reatores suplementado cálcio ($100 \text{ mg Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$) e controle, respectivamente.

Em relação aos tamanhos dos grânulos (Figura 6.3), é possível perceber que os reatores adicionados com cálcio (R2 e R4) formaram, ao longo de todo o experimento,

grânulos maiores em relação aos respectivos controles (R1 e R3). Além disso, os RBS convencionais R3 e R4 também apresentaram grânulos maiores quando comparados aos RBS com alimentação/descarte simultâneos. Com 10 dias de operação, o R4 já possuía mais de 30% de lodo maior que 1 mm, enquanto o R2 possuía apenas 5%. Desse modo, tanto a adição de cálcio, quanto a operação na forma convencional, impactaram positivamente no tamanho dos grânulos formados.

Figura 6.3 – Tamanho dos grânulos para os RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).



No entanto, ao final do experimento, os grânulos eram majoritariamente maiores que 1 mm nos quatro reatores. Com isso, as distribuições granulométricas relatadas em reatores com alimentação/descarte simultâneos com objetivo de granulação se diferem das encontradas neste estudo. Derlon et al. (2016), operando um RBS com velocidade ascensional do líquido de $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, troca volumétrica de 50%, tempo de sedimentação de 3 min. e alimentado com esgoto real com baixa carga orgânica, observaram que 60% dos grânulos tinham tamanho entre 0,25 e 0,63 mm, enquanto apenas 15% eram maiores do que 0,63 mm. Q. Wang et al. (2018) operaram dois RBS com alimentação/descarte simultâneos com 90% de

troca volumétrica e alimentados com esgoto real (R1) e afluyente sintético contendo acetato (R2). Os referidos autores observaram que os grânulos do reator que continha efluente real apresentaram diâmetros maiores (R1: 0,2-0,8 mm; R2: 0,2-0,6 mm), possivelmente relacionado à composição do substrato como reportado no trabalho de Barros et al. (2020).

A maioria dos trabalhos com suplementação de cálcio reportam grânulos com tamanhos semelhantes aos encontrados nesta pesquisa (BARROS et al., 2020; JIANG et al., 2003; REN et al., 2008; WAN et al., 2015). Inclusive, Liu et al. (2010), comparando o efeito do Ca^{2+} e Mg^{2+} (alimentação suplementada com $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cada), observaram que aproximadamente 60% dos grânulos com cálcio estavam na faixa de 1,3-2,0 mm, e menos de 16% na faixa de 0,2-1,0 mm, possuindo morfologia compacta e regular. Por outro lado, os grânulos formados na presença de magnésio eram menores (61% estava entre 0,3-1,3 mm) e mais soltos.

6.3.2 Desempenho dos sistemas durante o processo de granulação

O desempenho operacional dos RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}) é mostrado na Tabela 6.1. Em termos de DQO, os reatores apresentaram remoções altas e semelhantes, desenvolvendo eficiências médias de remoção entre 88-94%, não apresentando flutuações significativas de desempenho entre as etapas de operação.

É possível identificar que havia bactérias nitrificantes no começo da operação dos sistemas, pois nos primeiros 14 dias a remoção de NH_4^+ foi superior a 78%, estabelecendo-se nas Etapas II e III. As eficiências de remoção de nitrogênio cresceram com o tempo, sendo atingidos valores médios entre 78-84% na última etapa de operação. Nos RBS com alimentação/descarte simultâneos, a adição de cálcio não alterou consideravelmente a remoção de nitrogênio, apesar de, durante a Etapa II, ter sido observada uma queda de desempenho do R2, impulsionada pela diminuição da eficiência de nitrificação. Já nos RBS convencionais, a adição de cálcio (R4) esteve associada ao aumento da remoção de nitrogênio. A comparação entre os reatores sem adição de cálcio (R1 e R3) mostra que, por si só, o regime de operação não influenciou significativamente na remoção de nitrogênio.

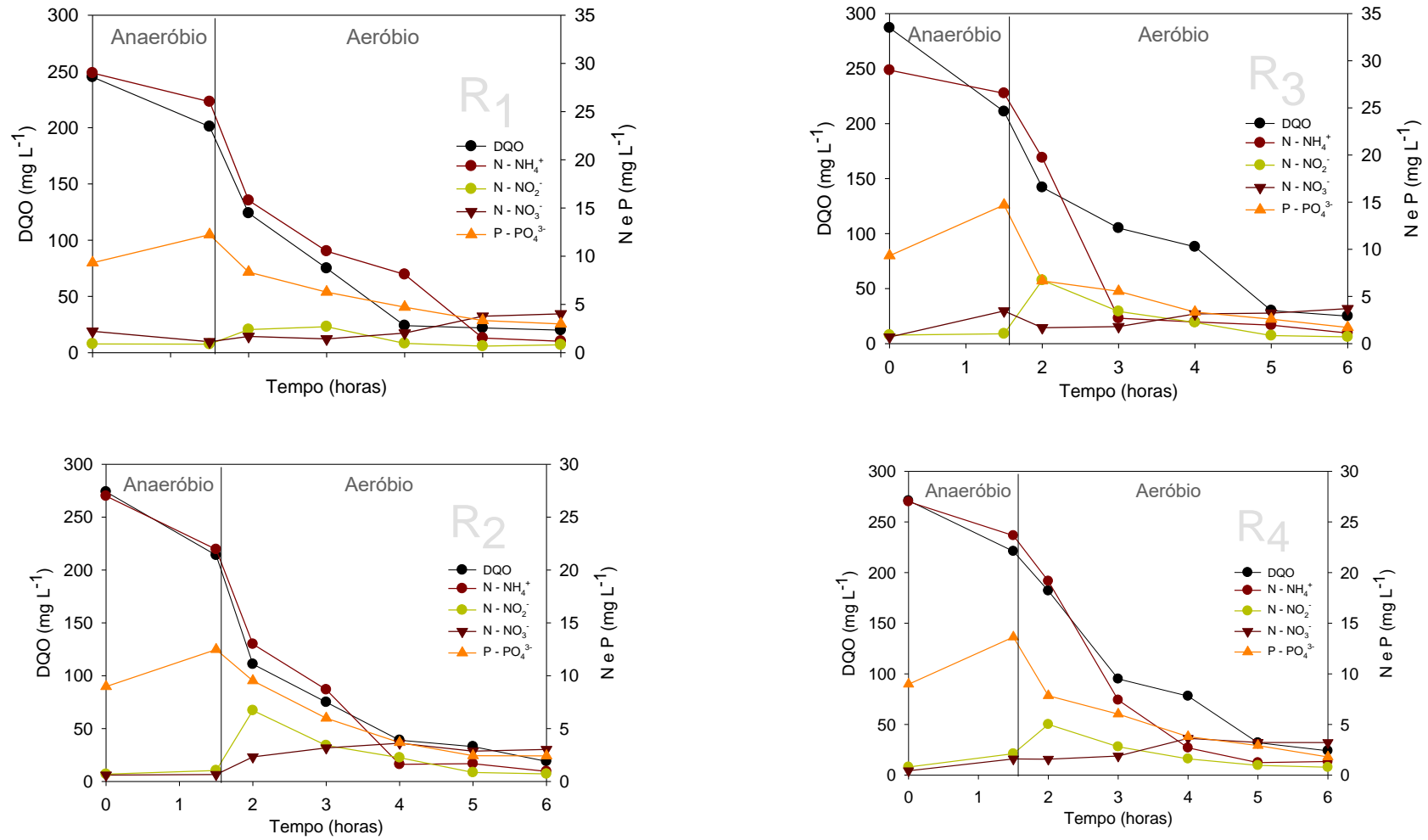
Em relação ao fósforo, a eficiência de remoção cresceu bastante com o tempo, ficando em média entre 72-82% na última etapa de operação. A adição de cálcio não promoveu diferenças significativas na remoção de fósforo, sugerindo que os principais

mecanismos de desfosfatação do efluente encontrados nos reatores suplementados com cálcio são predominantemente decorrentes de processos biológicos e não físico-químicos de precipitação dos íons fosfato. Por sua vez, o regime de operação convencional aumentou, de forma geral, essas eficiências de remoção de fósforo, sendo observado um crescimento maior, ficando os reatores R3 e R4 com eficiências superiores a 80%, ao passo que os valores de remoção nos reatores R1 e R2 se situaram próximas a 73%. Ao final da Etapa III, foi realizado um perfil de remoção dos poluentes durante um ciclo operacional apresentado na Figura 6.4.

Como verificado nos valores de desempenho na Tabela 6.1, a nitrificação acontecia eficientemente nos quatro sistemas, que pode ser observado com a queda acentuada e baixas concentrações de amônio com cinco horas de ciclo. Durante o início das fases aeróbias, são identificados acúmulos de nitrito que tende a cair no final dos ciclos, diferentemente do nitrato, que apresentam concentrações maiores no final do ciclo. De acordo com as concentrações de NO_2^- -N e NO_3^- -N, é possível identificar que parte das frações oxidadas tendem a ser reduzidas mesmo na presença de oxigênio, e isso está relacionado ao tamanho dos grânulos e a consolidação da zona anóxica no seu interior.

Quando comparado aos reatores R1 e R2, verificou-se, para os reatores R3 e R4, os quais operavam na modalidade convencional, que havia uma maior liberação de fósforo durante o período anaeróbio, proporcionando maiores acúmulos deste no ambiente aeróbio e menor concentração de fosfato no final do ciclo. Tal fato pode estar relacionado à elevada pressão de seleção imposta em RBS convencionais, pois, levando em consideração que a bidesfosfatação objetiva reter o fósforo na biomassa (BASSIN et al., 2012) e sua operacionalidade tende a descartar mais lodo, esses sistemas tenderam a remover mais fósforo.

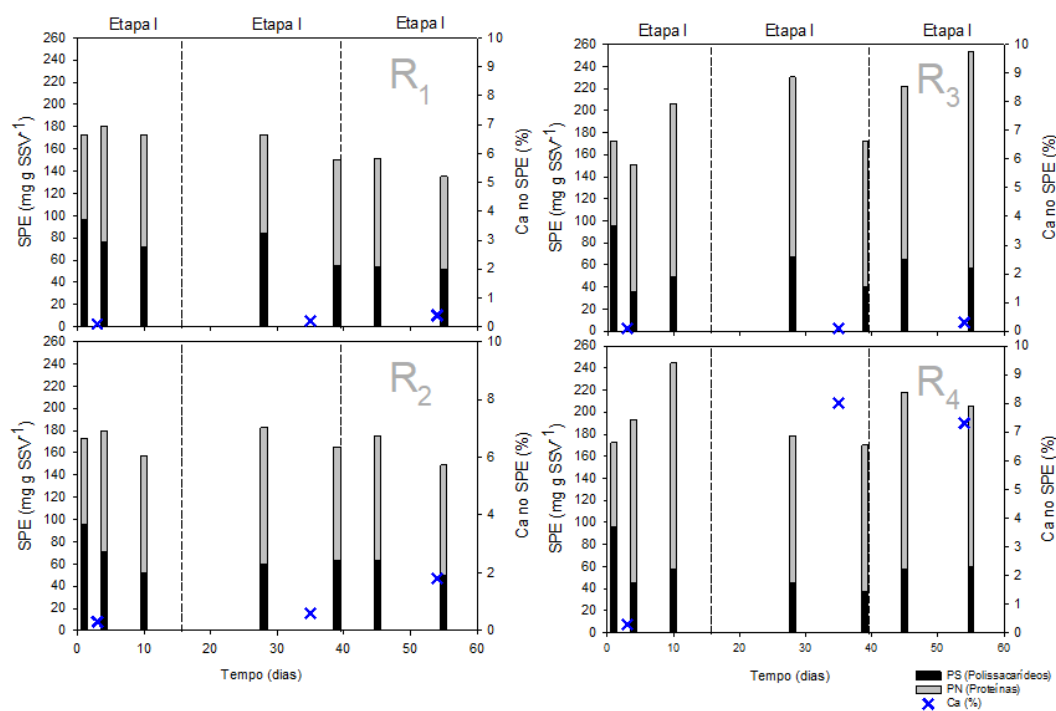
Figura 6.4 – Perfil operacional dos RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (controle) e R2 (suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (controle) e R4 (suplementado com Ca^{2+}).



6.3.3 Composição dos grânulos

Um dos fatores primordiais para a produção de grânulos é o estímulo à produção de SPE (LIU; SUN, 2011; NANCHARAI AH; KIRAN KUMAR REDDY, 2018; ZHU et al., 2012). No entanto, o comportamento da produção de SPE variou consideravelmente entre os reatores (Figura 6.5). Nos RBS convencionais, é percebida uma produção mais acentuada durante os dez primeiros dias de operação, enquanto, nos RBS com alimentação/descarte simultâneos, há um pequeno aumento no quarto dia de operação, e depois a produção de SPE cai e se mantém praticamente estável durante todo o experimento. Esses fatores podem estar diretamente relacionados às pressões de seleções impostas, que refletem no tempo de granulação e no tamanho dos grânulos.

Figura 6.5 – Composição de SPE durante as etapas de operação para os RBS com alimentação/descarte simultâneos (R1 e R2) e RBS convencionais (R3 e R4) e o percentual de cálcio na matriz de SPE.

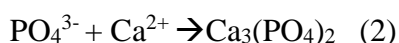
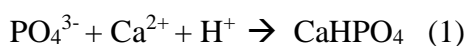


A partir da análise de EDX, ainda na Figura 6.4, é observado um comportamento diferente entre os reatores suplementados com cálcio quanto a sua proporção no SPE. No começo do experimento, as quantidades de cálcio no lodo eram similares (0,3% nos dois sistemas), porém, com 30 dias de operação e grânulos já bem formados, o reator R4 apresentou 8% da composição de SPE, e o R2 apenas 0,6%. Ao final do experimento (55° dia

de operação), o R4 permaneceu com percentual alto (7,3%), e o R2 apresentou 1,8% (EDX apresentado na Figura 6.6). Esses dados mostram que a maior pressão de seleção e produção de SPE tendem a favorecer a presença de cálcio na matriz de SPE. De fato, a literatura reporta maiores proporções de cálcio em reatores com maior pressão de seleção. Por exemplo, Barros et al. (2020) e Ren et al. (2008) encontraram, respectivamente, um percentual de cálcio de 1,1% ($100 \text{ mg Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$) e 14% ($40 \text{ mg Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$) na biomassa formada em RBS com alimentação/descarte simultâneos e convencional, respectivamente, ambos suplementados com cálcio.

Quanto a interação do cálcio com as SPE, a literatura relata que o íon tende a se ligar preferencialmente a fração de polissacarídeos da SPE (JIANG et al., 2003; LIU et al., 2010a; REN et al., 2008). Sajjad e Kim (2015) analisaram a interação de Ca^{2+} e Mg^{2+} em reatores suplementados com os cátions ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) com os grupos NH, CN e CO das proteínas e o grupo OH dos polissacarídeos, e observaram que a adição de Ca^{2+} teve forte interação com os grupos OH e pequena interação com os grupos NH e CN. No entanto, para o reator suplementados com Mg^{2+} , havia maior interação com o grupo CN da ligação peptídica das proteínas. O trabalho também revelou que os grupos CN e NH das proteínas estavam mais envolvidos do que o grupo CO, sugerindo que o nitrogênio tinha maior relação com os cátions divalentes. Entretanto, cabe ressaltar que a ligação do cálcio às proteínas também pode estar frequentemente envolvida na adesão bacteriana à superfície, e subsequente agregação célula-célula e formação de colônias (ROSE, 2000).

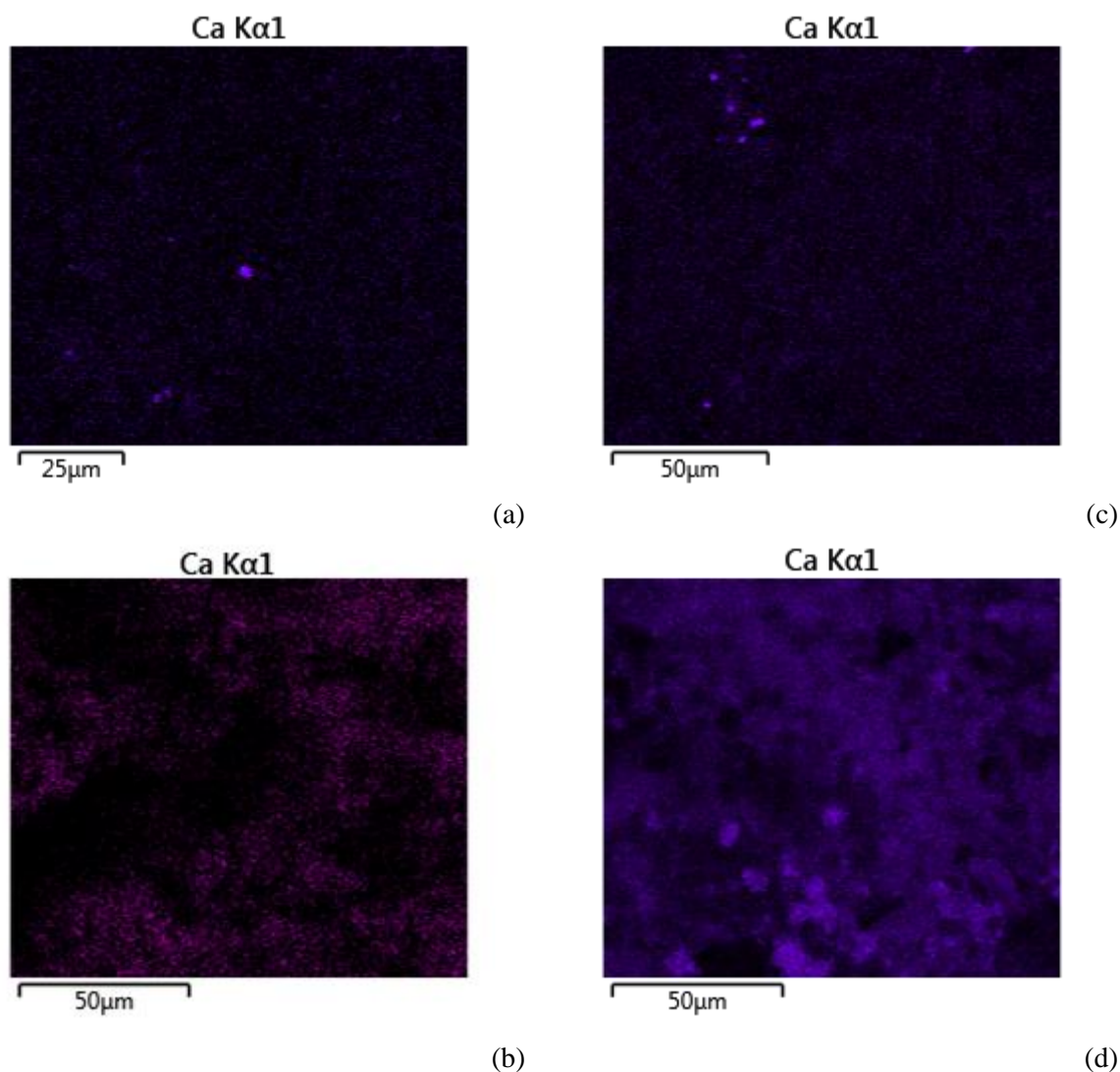
Um dos fatores que mais estão relacionados com a presença de cálcio nos grânulos aeróbio são os cristais precipitados que podem favorecer a nucleação, principalmente na forma de carbonato de cálcio (CaCO_3) e fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (LIU et al., 2010a; REN et al., 2008; ZHOU; LIU; GAO, 2013). Assim, o íon cálcio pode estar ligado ao íon fosfato solúvel para formar precipitados químicos na forma de polifosfato, conforme apresentado nas reações químicas que se seguem:



Porém, na faixa de pH (7-8) aplicada durante a operação dos sistemas, o fosfato esteve presente na forma de H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} , os quais possuem solubilidade alta e intermediária, respectivamente. Já a alcalinidade esteve presente na forma de bicarbonato, o qual é altamente solúvel, não havendo a formação de íons carbonato em pH abaixo de 8,3

(Girard, 2013).

Figura 6.6 – Composição dos grânulos por EDX na quantidade de cálcio na matriz de SPE dos RBS com alimentação/descarte simultâneos R1 (a, controle) e R2 (b, suplementado com Ca^{2+}) e RBS convencionais R3 (c, controle) e R4 (d, suplementado com Ca^{2+}).



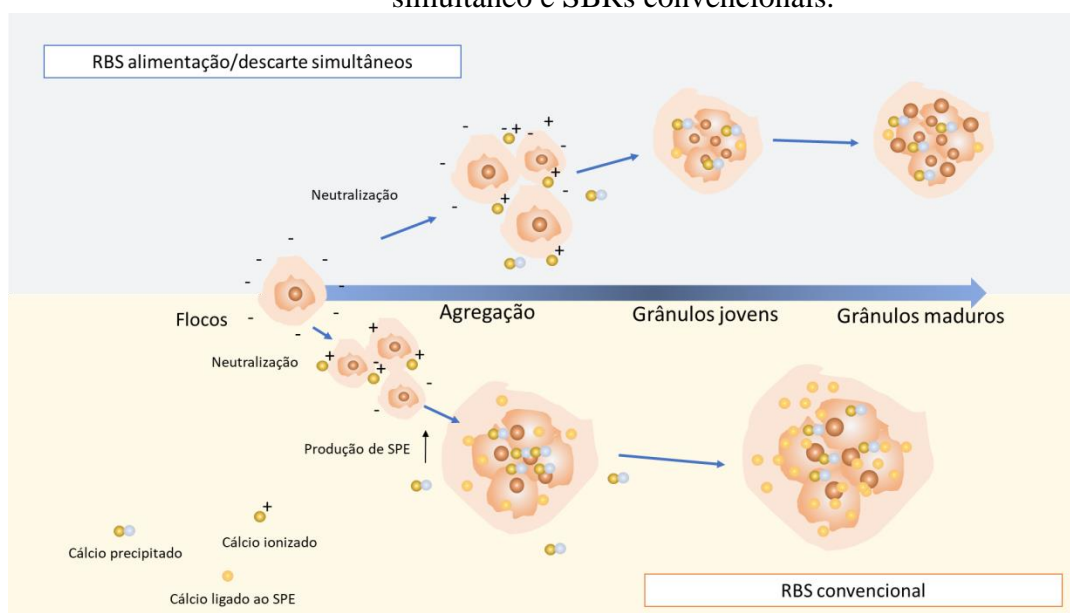
6.3.4 Mecanismo de ação e imobilização do cálcio na matriz de SPE da biomassa granular aeróbica

Como mencionado anteriormente, o principal mecanismo que facilita a agregação microbiana é baseado no efeito do cálcio na neutralização das cargas superficiais negativas dos microrganismos. O cálcio ainda é capaz de se ligar à estrutura de SPE, estabelecendo um complexo estruturalmente mais estável, além de formar precipitados que servem como meio de suporte para o crescimento associado (KOŃCZAK; KARCZ; MIKSCH, 2014; LI et al.,

2017; LIN et al., 2010; LIU et al., 2010a; REN et al., 2008; SAJJAD; KIM, 2015; XU; LIU; TAY, 2006; YE et al., 2016). Além disso, o tipo de configuração de SBR influencia o tempo de granulação e as características da biomassa cultivada. Como resultado, foram obtidos diferentes tempos de granulação, 35 e 20 dias para os reatores R1 e R3, respectivamente. Entretanto, com a adição de Ca^{2+} , a sedimentação da biomassa formada no R4 aumentou significativamente quando comparada ao R3. Esse resultado demonstrou o papel predominante do cátion na melhoria das características físicas do LGA ao utilizar uma pressão de seleção mais alta que a do RBS convencional.

A ação dos íons de cálcio teve efeitos diferentes nas duas estratégias de SBR, como mostrado na Figura 6.7. Inicialmente, o cálcio ionizado tendia a neutralizar as cargas dos flocos e células bacterianas, nas quais uma porção permanecia em suspensão, impulsionada pela alta injeção de ar no reator. Entretanto, a precipitação e a interação do cálcio com as proteínas e polissacarídeos das SPE formados nos SBR convencionais foram maiores, o que levou a uma maior capacidade de imobilização do cálcio nesse tipo de sistema, verificada em grânulos maduros.

Figura 6.7 – Esquema da ação do cálcio na formação de grânulos em enchimento/extração simultâneo e SBRs convencionais.



6.4 Conclusão

Os RBS convencionais R3 e R4 apresentaram desenvolvimento de grânulos mais precoce (20 dias), com relação de $\text{IVL}_{30}/\text{IVL}_5$ próxima de 1 e grânulos com maior teor de

proteínas.

Também foi percebido que efeito do cálcio na granulação foi mais acentuado no RBS convencional, formando grânulos maiores em um menor intervalo de tempo. Verificou-se também que a quantidade de cálcio nos grânulos era maior ao final do experimento.

Assim, o regime de operação, RBS com alimentação/descarte simultâneos com baixa velocidade de alimentação e RBS convencional, influenciou tanto o tempo de granulação como as características de sedimentabilidade, tamanho ($R4 > R2 > R3 > R1$) e composição de grânulos.

7 CAPÍTULO V – PARABENOS EM SISTEMA DE LODO GRANULAR AERÓBIO: IMPACTOS NA GRANULAÇÃO E EFICIÊNCIAS DE REMOÇÃO

7.1 Introdução

A crescente presença de micropoluentes no meio ambiente é resultante do intenso uso de produtos farmacêuticos e de higiene pessoal. Entre esses compostos, citam-se os parabenos, ésteres do ácido para-hidroxibenzoico utilizados como conservantes em cosméticos, fármacos e alguns produtos alimentícios e industriais. O metilparabeno (MeP), o etilparabeno (EtP), o propilparabeno (PrP) e o butilparabeno (BuP) são os parabenos mais utilizados e, logo, os mais comumente encontrados nos corpos hídricos, sendo, geralmente, o MeP o de maior concentração ($\leq 200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), seguido pelo PrP ($\leq 50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto os demais se apresentam em concentrações de poucos $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (BŁEDZKA; GROMADZIŃSKA; WASOWICZ, 2014; HAMAN et al., 2015; MA et al., 2018b).

Esses compostos, no entanto, vêm sendo associados a problemas de saúde humana, como câncer de mama e alterações hormonais, por atuarem como disruptores endócrinos (BOBERG et al., 2010; DARBRE et al., 2004; NOWAK et al., 2018). Portanto, é necessário que os parabenos sejam removidos das águas residuárias antes do seu lançamento nos corpos hídricos.

O sistema de lodo ativado (LA), geralmente, apresenta boas eficiências de remoção desses micropoluentes ($> 80\%$), atribuídas principalmente à biodegradação aeróbia, enquanto a adsorção tem um papel secundário (ASHFAQ et al., 2017; LI et al., 2015; LU et al., 2018; WANG; WANG; SUN, 2017). Porém, é relevante investigar o potencial de remoção de parabenos de sistemas de tratamento de águas residuárias mais compactos com alta capacidade de remoção de matéria orgânica e nutrientes, e que apresentem demandas menos área e energia, como os sistemas de lodo granular aeróbio (LGA).

O LGA é uma variante do processo de LA que surgiu no final da década de 1990, sendo cultivado principalmente em reatores em batelada sequencial (RBS) (MORGENROTH et al., 1997). Quando comparado ao LA, o LGA apresenta várias vantagens, como maior velocidade de sedimentação e retenção de biomassa na forma de grânulos compactos e densos ($> 0,2 \text{ mm}$), e remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo devido à presença das zonas aeróbia, anóxica e anaeróbia nos grânulos, o que proporciona maior cooperação metabólica entre os microrganismos (AB HALIM et al., 2015; NANCHARAI AH; KIRAN KUMAR REDDY, 2018; ROLLEMBERG et al., 2018; WINKLER et al., 2018).

Embora as grânulos aeróbios já tenham sido avaliados quanto à remoção de compostos aromáticos, como fenol, o-cresol e p-nitrofenol (RAMOS; SUÁREZ-OJEDA; CARRERA, 2015), e, até mesmo, de alguns fármacos (ibuprofeno, prednisona, sulfametoxazol, entre outros) (AMORIM et al., 2016, 2018; ZHAO et al., 2015b), ainda não há estudos de remoção de parabenos em sistemas de LGA. Segundo a literatura, os fármacos e produtos de higiene pessoal afetam negativamente a qualidade dos grânulos, podendo comprometer sua estabilidade e atividade (ZHAO et al., 2015b). Assim, é importante avaliar o desempenho geral de sistemas de LGA durante o tratamento de águas residuárias contendo parabenos.

Com base no exposto, os objetivos do presente trabalho foram (1) avaliar o impacto dos parabenos MeP, EtP, PrP e BuP no processo de granulação, na estabilidade dos grânulos e na remoção de matéria orgânica, N e P de um sistema de LGA tratando água residuária sintética, e (2) identificar os principais mecanismos de remoção desses micropoluentes nesse sistema.

7.2 Metodologia

7.2.1 Configuração experimental

O experimento foi realizado em dois RBS convencionais (diâmetro: 100 mm, altura: 1 m e volume útil: 7,2 L), inoculados com lodo aeróbio ($2,8 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) de um sistema de lodo ativado do tipo carrossel da estação de tratamento de residuária doméstica de uma fábrica têxtil localizada no município de Fortaleza, Ceará, Brasil.

Ambos os reatores (R1 e R2) foram alimentados com a mesma água residuária sintética, contendo ácido acético ($500 \text{ mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$), cloreto de amônio ($75 \text{ mg NH}_4^+ \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$), fosfato de potássio ($10 \text{ mg PO}_4^{3-} \cdot \text{P} \cdot \text{L}^{-1}$), cloreto de cálcio dihidratado ($10 \text{ mg Ca}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($5 \text{ mg Mg}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$), micronutrientes ($1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$), cuja solução foi preparada de acordo com Rollemberg et al. (2019), e bicarbonato de sódio ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), usado como tampão para manter o pH próximo a 7,0. Porém, enquanto o R1 foi mantido como controle, o R2 foi suplementado com os parabenos MeP, EtP, PrP e BuP ($200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ cada) (Sigma Aldrich, EUA) desde o início do experimento. O afluente de cada reator era preparado a cada dois dias e durante esse período era armazenado em um refrigerador, a temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, com o objetivo de impedir a proliferação de microrganismos no tanque de alimentação e, conseqüentemente, a sua degradação prematura.

Os reatores foram operados, a temperatura ambiente (27 °C), com ciclos de 6 h, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 h e troca volumétrica de 50% ao longo de três etapas (Tabela 7.1). O tempo de sedimentação foi diminuído gradualmente de 20 (etapa I) para 10 (etapa II) e, em seguida, para 5 min. (etapa III) para atuar como pressão de seleção sobre os microrganismos filamentosos e promover a granulação do lodo. Para manter o tempo de ciclo constante (6 h) ao longo do experimento, o tempo subtraído da fase de sedimentação foi adicionado à fase de reação aeróbia. Durante essa fase, a aeração foi realizada por meio de compressores (Aco-002, Sunsun, China), produzindo uma velocidade ascensional de bolhas de aproximadamente $1,5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tabela 7.1 – Detalhamento dos ciclos de operação (6 h) dos reatores R1 e R2 durante as etapas I, II e III.

Etapa	I	II	III
Duração da etapa (dias)	46	57	105
Fases do ciclo (min.)			
Alimentação	30	30	30
Reação anaeróbia	60	60	60
Reação aeróbia	248	258	263
Sedimentação	20	10	5
Descarte	1	1	1
Descanso	1	1	1

7.2.2 Perfil de remoção de parabenos, matéria orgânica, N e P ao longo do ciclo

Ao final da etapa III (após maturação dos grânulos), o perfil de remoção de parabenos, matéria orgânica (DQO), N (amônio, nitrito, nitrato) e P (fosfato) ao longo do ciclo do R2 foi avaliado em duplicata (dois ciclos). Durante cada ciclo, o oxigênio dissolvido (OD) foi medido continuamente (YSI 5000, YSI Incorporated, EUA).

Posteriormente, avaliou-se o MeP como possível intermediário da biotransformação dos demais parabenos. Para isso, o R2 foi, inicialmente, alimentado com água residuária sintética livre de parabenos, por 15 dias (aproximadamente 60 ciclos), para a completa eliminação desses compostos do licor misto (verificado pela sua ausência no efluente). Em seguida, o reator foi suplementado apenas com EtP, PrP e BuP por 7 dias (28 ciclos), sendo, finalmente, realizada mais uma análise de ciclo em relação apenas aos parabenos.

7.2.3 Monitoramento do sistema

7.2.3.1 Análises físico-químicas

DQO, amônio, sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis foram determinados de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

Nitrito, nitrato e fosfato foram determinados por um cromatógrafo de íons Dionex™ ICS-1100 equipado com uma pré-coluna Dionex™ IonPac™ AG23 (2×50 mm), uma coluna Dionex™ IonPac™ AS23 (2×250 mm) e uma supressora Dionex™ AERS™ 500 (2 mm) (ThermoScientific, EUA). Eram injetados 5 µL da amostra filtrada (0,45 µm), os quais eram eluídos por uma solução aquosa contendo 4,5 mM de carbonato de sódio e 0,8 mM de bicarbonato de sódio em um fluxo constante de 0,25 mL·min⁻¹. A temperatura do forno era 30 °C, a corrente aplicada, 7 mA, e o tempo de corrida, 30 min.

Os parabenos foram determinados tanto no líquido quanto no lodo por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, *high-performance liquid chromatograph*) LC-20A Prominence equipado com uma coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 (4,6×150 mm, 5 µm) e um detector UV-Vis SPD-20A (Shimadzu Corporation, Japão).

Para a determinação de parabenos no líquido, 500 mL de amostra previamente filtradas (0,45 µm) eram percoladas através de cartuchos Oasis HLB (3 cc, 60 mg, 30 µm) (Waters Corporation, EUA) para a extração em fase sólida dos parabenos, os quais eram posteriormente eluídos por 4 mL de metanol grau HPLC/UV (99,8%, Neon, Brasil). Em seguida, 10 µL dessa solução metanólica eram injetados e eluídos por uma fase móvel composta por água ultrapura e acetonitrila grau HPLC/UV (99,9%, Sigma-Aldrich, Alemanha) em um fluxo constante de 1,2 mL·min⁻¹, utilizando o seguinte gradiente: aumento de 10 a 60% de acetonitrila em 8 min, seguido de redução a 10% em 4 min. A temperatura do forno foi mantida a 35 °C durante toda a corrida.

Para a determinação de parabenos no lodo, foi utilizada metodologia adaptada de López-Serna et al. (2018) conforme descrito a seguir. 100 mL de amostra de lodo fresco eram liofilizados (Liofilizador L101, Liobras, Brasil), e, em seguida, o lodo seco era pesado em um frasco de vidro de 20 mL, ao qual foram adicionados 5 mL de acetona (99%, Sigma-Aldrich, Alemanha). Após completa agitação em vórtex, a mistura permanecia em repouso durante 12 h para permitir a evaporação do solvente. Em seguida, 12 mL de água MilliQ® a pH 9 eram adicionados ao frasco, o qual era novamente agitado em vórtex para obter uma suspensão homogênea. O frasco, então, era submetido a extração assistida por ultrassom (EAU) por 30 min a 60 Hz e temperatura ambiente (Cristófoli Biossegurança, Brasil). Posteriormente, a

suspensão era centrifugada por 5 min a 3600 rpm (Excelsa II 206 BL, Fanem, Brasil), e o sobrenadante era transferido para um balão volumétrico de 25 mL. O processo de extração por água MilliQ® era repetido mais uma vez com o pellet, sendo o sobrenadante adicionado àquele já presente no balão volumétrico, cujo volume era completado com água MilliQ®. Finalmente, os parabenos eram extraídos da solução resultante e determinados conforme descrito anteriormente para amostras líquidas.

7.2.3.2 Análises morfológicas e microbiológicas do lodo

A formação e o desenvolvimento dos grânulos foram avaliados por peneiramento e gravimetria a cada 15 dias de operação, aproximadamente, e a estrutura dos grânulos maduros foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Inspect S50, FEI Company, EUA).

A sedimentabilidade do lodo foi avaliada pelo índice volumétrico de lodo (IVL) dinâmico – uma versão modificada do IVL proposto por Schwarzenbeck, Erley e Wilderer (2004) que permite determinar o IVL em vários tempos. Neste trabalho, o IVL foi determinado para os tempos de sedimentação de 5 e 30 min. (IVL₅ e IVL₃₀, respectivamente). A velocidade de sedimentação do lodo foi determinada, em triplicata, de acordo com Wang et al. (2018), utilizando uma coluna de acrílico com altura de trabalho de 0,4 m e diâmetro de 75 mm, preenchida com efluente sintético.

As Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) da biomassa granular foram expressadas em termos de proteínas (PN) e polissacarídeos (PS), cujos teores foram medidos pelo método de Lowry modificado e fenol-ácido sulfúrico (LONG et al., 2014), respectivamente.

Os microrganismos presentes nos grânulos maduros foram identificados conforme descrito por Rollemberg et al. (2019). A extração de DNA foi feita em triplicata para cada amostra de lodo.

7.2.4 Metabolismo dos principais grupos funcionais

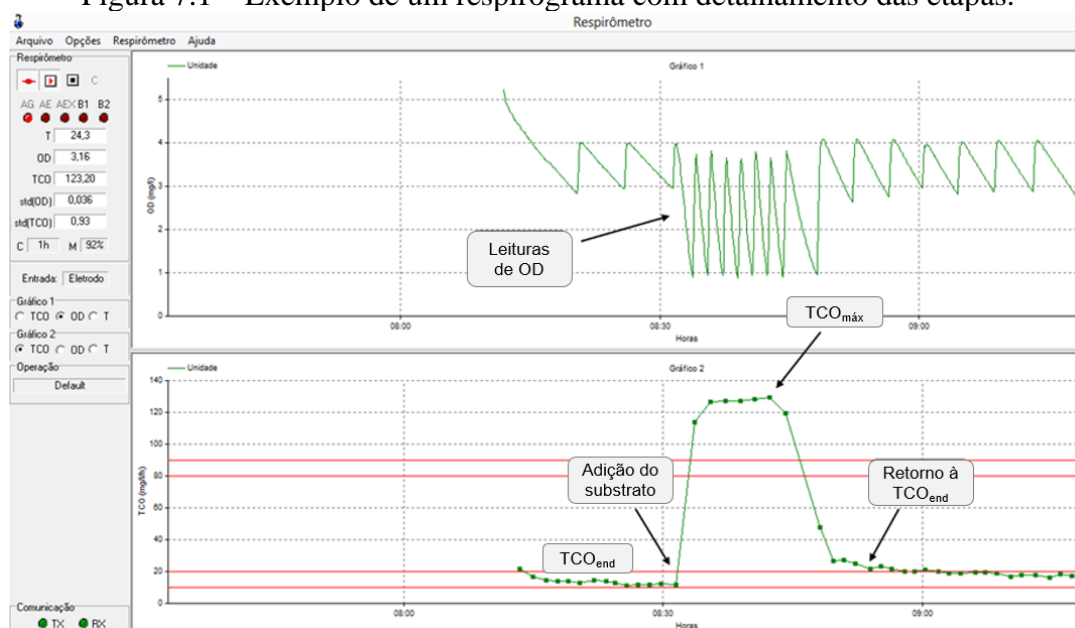
7.2.4.1 Atividade heterotrófica aeróbia e nitrificante

A taxa de consumo de oxigênio (TCO) foi o parâmetro utilizado para obter as características da biomassa dos principais grupos funcionais que utilizam o oxigênio como

aceptor final de elétrons, por vias heterotróficas e nitrificantes. Assim, os valores de TCO permitem conhecer e monitorar a atividade metabólica dos microrganismos presentes no lodo em tempo real através do respirograma (Figura 7.1). As taxas foram obtidas através do respirômetro Beluga e do *software* Resp43 com concentração de OD mínima e máxima fixadas em 1,0 e 3,0 mg·L⁻¹, respectivamente, para garantir condições metabólicas ideais para os diferentes grupos estudados.

Para a execução desses testes, além do respirômetro acima citado, foram utilizados: um béquer de 2 litros para comportar o licor misto de lodo, um agitador mecânico para manter a biomassa em constante suspensão durante os testes, um aerador com pedra porosa, um eletrodo de oxigênio (Modelo YSI 5718), um notebook com o *software* Resp43 instalado para gerar o respirograma e os substratos acetato de sódio (120 mg DQO·L⁻¹), cloreto de amônio (10 mg N-NH₄⁺·L⁻¹) e nitrito de sódio (8 mg N-NO₂⁻·L⁻¹), separadamente, para se avaliarem os diferentes grupos microbianos presentes na biomassa.

Figura 7.1 – Exemplo de um respirograma com detalhamento das etapas.



A partir dos dados gerados pelo *software* (TCO × tempo), foram calculadas as áreas de cada ponto de TCO exógena (TCO_{exo}) no tempo e a concentração de lodo ativo (X_a), de acordo com Barros (2013) e Silva Filho et al. (2015). A biocinética dos microrganismos aeróbios, como a constante específica máxima de crescimento (μ_m), foi estimada de acordo com Rollemberg et al. (2019), Zafiriadis et al. (2017) e Chandran e Smets (2000). Neste estudo, para os microrganismos heterotróficos, foram assumidos os seguintes parâmetros/premissas: fração catabólica de 55% e produção celular (Y_{ae}) de 0,3 g SSV·g

DQO_{rem}^{-1} . Para as BOA e as BON, foram adotados Y_n iguais a $0,10 \text{ g SSV} \cdot \text{g N-NH}_4^{++-1}$ e $0,04 \text{ g SSV} \cdot \text{g N-NO}_2^{-1}$, respectivamente.

O procedimento realizado durante os testes foi:

- 1) Coletava-se 1 litro de licor misto de lodo ao fim da fase de aeração do ciclo para os testes com acetato de sódio. Para os testes com cloreto de amônio e nitrito de sódio, eram coletados 2 litros de licor misto de lodo, a fim de concentrar e conseguir uma maior representação das bactérias nitrificantes;
- 2) Ligavam-se os equipamentos (notebook e respirômetro), e, então, calibrava-se o eletrodo de oxigênio;
- 3) Colocava-se o béquer com a amostra no agitador mecânico, e, então, o aerador e o eletrodo de oxigênio eram colocados dentro do béquer em contato com a amostra;
- 4) Após isso, o teste era iniciado, e o *software* monitorava a aeração. Sob agitação constante, o substrato remanescente na amostra era consumido para que se pudesse ter uma TCO constante e mínima, chamada de TCO_{end} , que corresponde à respiração endógena;
- 5) Após detectar a TCO_{end} , adicionava-se o substrato para serem determinadas as constantes cinéticas;
- 6) Os dados de TCO eram gerados pelo *software* e salvos automaticamente pelo programa.

A partir dos resultados obtidos, as constantes específicas máximas de crescimento (μ_m) para os organismos heterotróficos e nitrificantes, foram calculadas.

7.2.4.2 Testes de desnitrificação

Os testes foram feitos em condições de endogenia e com a presença de substrato externo. Para cada teste, foi coletado uma amostra de 1 litro de licor misto de lodo ao final da fase de aeração. Em um béquer de 2 litros, era colocada a amostra, e a respiração endógena era identificada com auxílio do respirômetro. Para a primeira condição, após a identificação da condição endógena da amostra, era adicionado nitrato ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ou nitrito ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Para a segunda condição, além das frações de nitrogênio, uma matéria orgânica rapidamente biodegradável era adicionada como substrato ($400 \text{ mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetato de sódio).

As taxas de desnitrificação foram determinadas pela diminuição das

concentrações de nitrito ou nitrato, e matéria orgânica, ao longo do tempo do teste. Esses dados foram obtidos através de análises físico-químicas de DQO, nitrito, nitrato e SSV (APHA, 2012).

A partir dos resultados das análises físico-químicas, as taxas de liberação média de nitrito e nitrato foram calculadas, assim como o consumo total de nitrito e nitrato, todos em $\text{mg}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

7.2.4.3 Atividade biodesfosfatadora

Os testes de biodesfosfatação foram baseados em análises de DQO, nitrito, nitrato, fosfato e SSV (APHA, 2012). Coletava-se 1 litro de lodo dos reatores, e esperava-se que se atingisse a TCO endógena, com o auxílio do respirômetro. Então, eram adicionados aproximadamente $400 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ na forma de acetato, deixando o lodo sob leve agitação. Posteriormente, eram coletadas alíquotas de 50 mL em intervalos de trinta minutos durante duas horas. Então, a amostra de lodo era submetida a três situações diferentes:

- 1) Injeção de O_2 através do aerador conectado ao respirômetro, o qual era ligado e desligado quando atingia valores de OD mínimo e máximo de 1 e $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, com o objetivo de analisar a atividade cinética dos OAF;
- 2) Adição de nitrito ($30 \text{ mg N-NO}_2\cdot\text{L}^{-1}$), a fim de serem obtidas as constantes cinéticas dos ODAF que utilizam nitrito como acceptor final de elétrons no processo de biodesfosfatação, além de realizarem desnitrificação;
- 3) Adição de nitrato ($30 \text{ mg N-NO}_3\cdot\text{L}^{-1}$), a fim de serem obtidas as constantes cinéticas dos ODAF que utilizam nitrato como acceptor final de elétrons no processo de biodesfosfatação, além de realizarem desnitrificação.

Em cada uma dessas três situações, determinavam-se as concentrações de ortofosfato, DQO, nitrito e nitrato, possibilitando, a partir desses valores, o cálculo das constantes cinéticas de cada grupo de microrganismos relacionados à remoção de fósforo.

Ressalta-se que os testes se iniciavam em ambiente anaeróbico com grande oferta de substrato, e, após a adição de cada oxidante, aguardava-se até haver um ambiente anaeróbico novamente, em que o fósforo armazenado anteriormente tivesse liberado mais uma vez.

A partir dos resultados das análises físico-químicas, foram calculadas as taxas de liberação e absorção médias de fosfato, em $\text{mg}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

7.3 Resultados e discussão

7.3.1 Formação, estabilidade e características do LGA

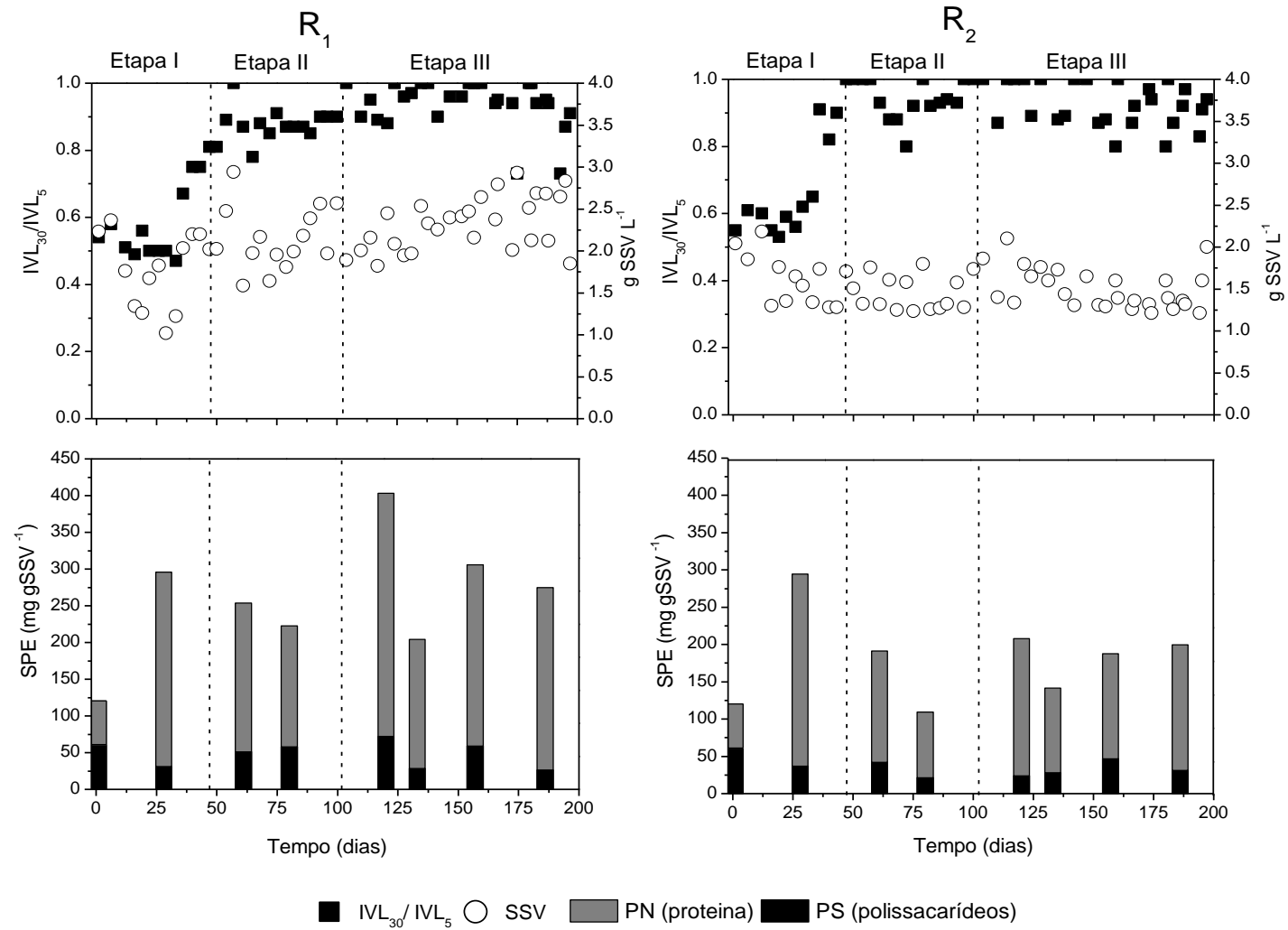
O lodo de inóculo possuía IVL_5 e IVL_{30} iguais a 189 e 93 $mL \cdot g^{-1}$, respectivamente, e, logo, razão IVL_{30}/IVL_5 de 0,5. Ao longo da etapa I, observou-se a formação dos grânulos acompanhada do decaimento dos valores de IVL_{30} e IVL_5 e do aumento do IVL_{30}/IVL_5 nos dois reatores (Figura 7.2). O valor de SSV, que, no início, era de 2,8 $g \cdot L^{-1}$, também diminuiu nessa fase, apresentando valores médios de 1,8 $g \cdot L^{-1}$, no R1, e 1,6 $g \cdot L^{-1}$, no R2. Com a diminuição do tempo de sedimentação (etapas II e III), a razão IVL_{30}/IVL_5 de ambos os reatores aumentou consideravelmente até próximo de 1.

Porém, com relação à biomassa nas etapas II e III, enquanto, no R1, o valor médio de SSV aumentou para aproximadamente 2,2 $g \cdot L^{-1}$, no R2, permaneceu próximo a 1,5 $g \cdot L^{-1}$ (Figura 7.2). Essa diminuição inicial de SSV após a inoculação acontece porque, em sistemas de LGA, a maioria dos sólidos filamentosos presentes no lodo de inóculo são lavados pelas pressões de seleção impostas (curto tempo de sedimentação, volume de troca do reator de 50% e velocidade de descarte). Nas etapas seguintes, a tendência é o sistema se adaptar, e a biomassa crescer, como observado no R1 (ROLLEMBERG et al., 2019; WANG; DU; CHEN, 2004). Porém, provavelmente, no R2, o crescimento da biomassa foi controlado pela presença dos parabens, já que eles possuem ação antimicrobiana (DORON et al., 2001; HAMAN et al., 2015).

Quanto ao tamanho dos grânulos, os dois reatores apresentaram elevadas proporções de grânulos com diâmetro superiores a 1 mm (> 70%) ainda na etapa I. Após a maturação do LGA (final da etapa III), os grânulos maiores que 1 mm eram cerca de 97,4% do lodo, no R1, e 92,7%, no R2. Em relação à velocidade de sedimentação, os grânulos cultivados no R1 apresentaram velocidade média de 21,3 $m \cdot h^{-1}$, e os cultivados no R2, de 22,2 $m \cdot h^{-1}$. Logo, os parabens não interferiram no processo de sedimentação, o que também foi confirmado pelos valores de IVL_{30} dos dois reatores (< 40 $mL \cdot g^{-1}$).

A idade de lodo também foi monitorada durante todo o período de operação, mantendo-se entre 6 e 11 dias, no R1, e entre 5 e 9 dias, no R2. Esses valores favoreceram a estabilidade dos grânulos, pois, conforme Zhu et al. (2013), os quais avaliaram a descarga seletiva de lodo em RBS de LGA com volume de troca de 75%, longas idades de lodo (> 11 dias) levam à deterioração dos grânulos aeróbios.

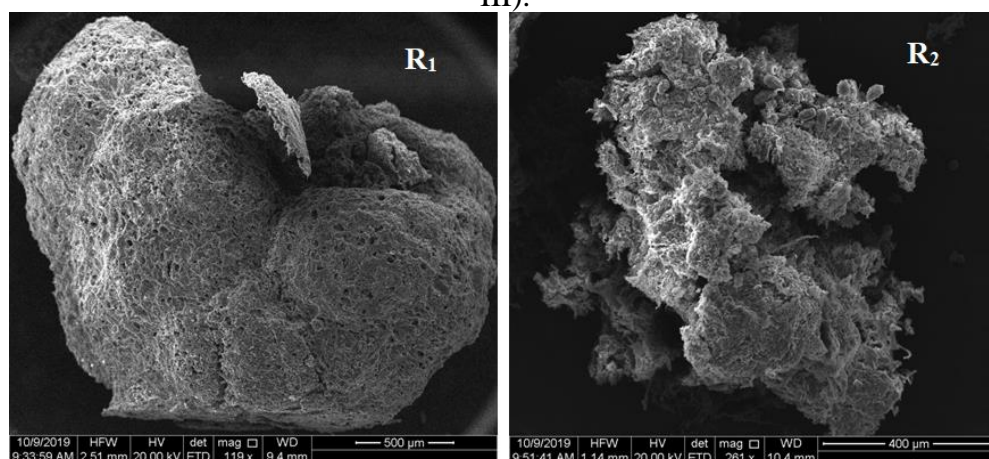
Figura 7.2 – Caracterização do LGA dos reatores R₁ e R₂ ao longo do experimento.



As SPE são biopolímeros, compostas de proteínas (PN), polissacarídeos (PS) e outras substâncias, que atuam na formação e na estabilidade dos grânulos (ROLLEMBERG et al., 2018), sendo um parâmetro fundamental para entender a estrutura dos grânulos formados, principalmente na presença de micropoluentes emergentes. No momento da partida dos reatores, as quantidades eram de 61 mg PS·g SSV⁻¹ e 59 mg PN·g SSV⁻¹. Com 28 dias de operação, observou-se um aumento expressivo no teor de SPE, e, conforme o LGA foi sendo formado, a quantidade de PN se manteve superior à de PS nos dois reatores, chegando a ser 9 vezes maior, no R1, e 7 vezes maior, no R2, na etapa III (Figura 7.2). A partir desses valores, entende-se, que as bactérias produtoras de SPE foram beneficiadas pela estratégia de granulação utilizada no sistema. Porém, no R2, a produção de SPE foi menor devido provavelmente à presença dos parabenos.

De fato, os grânulos do R1 possuíam estrutura mais densa e compacta, enquanto os do R2 apresentaram uma estrutura frágil e sem uniformidade (Figura 7.3). Possivelmente, a ação microbicida dos parabenos (DARWISH; BLOOMFIELD, 1995; DORON et al., 2001) pode ter influenciado na produção de SPE e, logo, na formação dos grânulos, justificando a menor concentração de SSV do R2.

Figura 7.3 – Micrografia eletrônica por varredura dos grânulos dos reatores R1 e R2 (etapa III).



Ao contrário do observado no presente trabalho, Zhao et al. (2015) reportaram aumento de SPE em um sistema de LGA tratando água residuária sintética (1000 mg DQO·L⁻¹, 90-110 mg NH₄⁺·N·L⁻¹ e 4-7 mg PO₄³⁻·P·L⁻¹) em ciclos de 3 h após a adição de cinco fármacos (ibuprofeno, naproxeno, prednisolona, norfloxacino e sulfametoxazol, em uma concentração de 50 µg·L⁻¹ cada). Segundo os autores, esse aumento foi o mecanismo de defesa dos microrganismos contra a toxicidade dos micropoluentes adicionados.

7.3.2 Remoção de matéria orgânica, N e P

Os resultados de remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo são apresentados na Tabela 7.2. Durante todo o período de operação, a eficiência de remoção de DQO foi superior a 90% nos dois reatores, indicando que o lodo apresentava grande atividade biológica, mesmo com a presença de parabenos.

Para o nitrogênio, a eficiência de remoção cresceu da etapa I para as duas últimas, mantendo-se maior que 74% na etapa de maturação e estabilização (etapa III). A nitrificação foi bastante satisfatória em ambos os reatores, apresentando-se superior a 92% desde o início da operação, sugerindo que o lodo era rico em bactérias oxidantes de amônia (BOA) e bactérias oxidantes de nitrito (BON).

No entanto, entre a etapa I e as subsequentes, foi observado um aumento no processo de desnitrificação, possivelmente relacionado ao crescimento dos grânulos, que favoreceu o estabelecimento da zona anóxica/anaeróbia neles e, conseqüentemente, o mecanismo de nitrificação e desnitrificação simultâneas. Já para a remoção de fósforo, o processo de granulação com a distribuição de fases no ciclo operacional, com fase anaeróbia de 1,5 h, favoreceu o metabolismo dos microrganismos, havendo um aumento na eficiência de remoção da etapa I para a etapa III (de 55 para 73%, no R1, e de 51 para 69%, no R2), cuja concentração efluente de fósforo manteve-se em torno de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para os dois reatores.

Embora não tenham sido encontrados trabalhos que relatem o efeito de parabenos sobre a atividade dos microrganismos responsáveis pela remoção de matéria orgânica, N e P, há alguns estudos com outros tipos de micropoluentes (Amorim et al., 2016;Moreira et al, 2015).

Por exemplo, Amorim et al. (2016) avaliaram o desempenho de um RBS de LGA (ciclos de 6 h, taxa de troca volumétrica de 40% e TDH de 9,7 h) na presença de uma mistura de oito fármacos quirais (alprenolol, bisoprolol, metoprolol, propranolol, venlafaxina, salbutamol, fluoxetina e norfluoxetina, testados em uma concentração de $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cada). Os resultados mostraram que, após a alimentação anaeróbia, tanto a absorção de DQO quanto a liberação de P diminuíram, provavelmente decorrente da atividade dos OAF ter sido afetada. Os autores também relataram que a nitrificação foi afetada pela presença dos micropoluentes.

Moreira et al. (2015), ao avaliarem a influência de elevada concentração de fluoxetina ($1,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) em um RBS de LGA operado em ciclos de 12 h, observaram que, enquanto a remoção de DQO não foi afetada, a remoção de fosfato e amônio foi seriamente prejudicada.

Tabela 7.2 – Eficiência de remoção de matéria orgânica, N e P dos reatores R1 e R2.

Reator		R1			R2		
Etapa		I	II	III	I	II	III
DQO	Afluente (mg·L ⁻¹)	578 ± 97	602 ± 65	571 ± 70	611 ± 60	561 ± 23	590 ± 56
	Efluente (mg·L ⁻¹)	53 ± 20	28 ± 10	42 ± 17	36 ± 16	20 ± 8	45 ± 20
	Eficiência (%)	91 ± 9	95 ± 3	92 ± 3	93 ± 3	98 ± 1	92 ± 3
Frações de nitrogênio	NH ₄ ⁺ afluente (mg NH ₄ ⁺ -N·L ⁻¹)	64,9 ± 10,9	54,9 ± 5,1	50,1 ± 5,5	60,4 ± 12,1	57,5 ± 10,6	52,2 ± 3,1
	NH ₄ ⁺ efluente (mg NH ₄ ⁺ -N·L ⁻¹)	5,1 ± 2,2	1,9 ± 0,5	3,5 ± 1,5	2,2 ± 1,7	2,4 ± 0,6	3,6 ± 1,5
	NO ₂ ⁻ efluente (mg NO ₂ ⁻ -N·L ⁻¹)	10,3 ± 4,5	2,9 ± 1,5	2,2 ± 0,7	9,9 ± 5,7	2,1 ± 0,9	2,8 ± 0,9
	NO ₃ ⁻ efluente (mg NO ₃ ⁻ -N·L ⁻¹)	6,0 ± 2,6	7,1 ± 1,6	6,5 ± 1,4	6,8 ± 2,0	6,7 ± 2,3	7,0 ± 0,9
	Eficiência de nitrificação (%)	92,5 ± 6,4	96,3 ± 1,1	92,9 ± 3,1	96,4 ± 7,7	95,6 ± 1,4	92,0 ± 3,0
	Eficiência de remoção de nitrogênio total (%)	68,3 ± 9,0	77,9 ± 2,6	75,0 ± 3,0	69,4 ± 7,0	79,1 ± 6,3	74,0 ± 4,5
Fósforo	Afluente (mg PO ₄ ³⁻ -P·L ⁻¹)	7,5 ± 0,9	7,7 ± 0,7	7,4 ± 0,7	7,1 ± 0,9	7,7 ± 0,7	7,1 ± 1,1
	Efluente (mg PO ₄ ³⁻ -P·L ⁻¹)	3,3 ± 0,7	2,1 ± 0,4	1,9 ± 0,4	3,5 ± 1,1	2,3 ± 0,5	2,1 ± 0,4
	Eficiência (%)	55,0 ± 10,0	71,9 ± 5,3	73,1 ± 5,8	51,3 ± 14,2	69,5 ± 9,0	69,2 ± 8,1

7.3.3 Remoção de parabenos

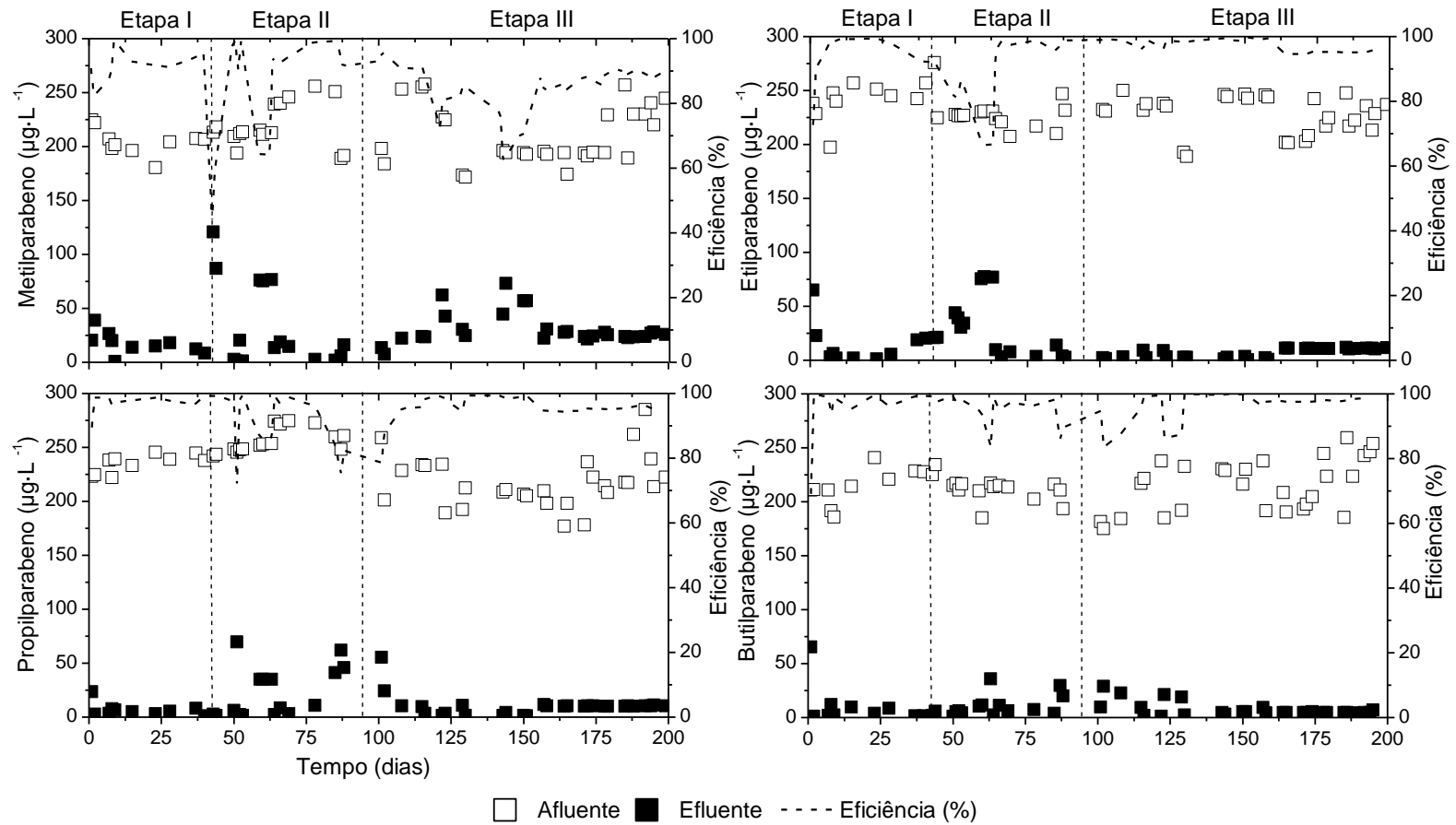
Já na etapa I, o sistema alcançou altas eficiências médias de remoção para todos os compostos (> 90%), sendo o menor valor obtido para o MeP (Tabela 7.3). Porém, na etapa II, com exceção do BuP, essas eficiências foram afetadas negativamente, principalmente as de MeP e de EtP (Tabela 7.3), cujos valores mínimos foram próximos a 50 e 65%, respectivamente (Figura 7.4). Provavelmente, a diminuição do tempo de sedimentação de 20 para 10 min. foi responsável pela instabilidade inicial observada (Figura 7.4).

Tabela 7.3 – Valores médios das concentrações afluentes e efluentes e das eficiências de remoção de parabenos do reator R2.

Etapa		I	II	III
MeP	Afluente ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	205 \pm 9	219 \pm 17	210 \pm 24
	Efluente ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	17 \pm 7	14 \pm 7	31 \pm 11
	Eficiência (%)	91,6 \pm 3,3	84,5 \pm 15,8	85,1 \pm 5,6
EtP	Afluente ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	245 \pm 16	247 \pm 28	223 \pm 24
	Efluente ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	15 \pm 14	18 \pm 9	7 \pm 4
	Eficiência (%)	94,0 \pm 5,6	87,6 \pm 9,7	93,7 \pm 6,2
PrP	Afluente ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	235 \pm 7	256 \pm 10	212 \pm 25
	Efluente ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	7 \pm 4	14 \pm 9	11 \pm 6
	Eficiência (%)	97,1 \pm 1,7	91,6 \pm 8,1	91,8 \pm 7,9
BuP	Afluente ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	214 \pm 12	212 \pm 8	213 \pm 38
	Efluente ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	10 \pm 4	11 \pm 7	7 \pm 5
	Eficiência (%)	95,1 \pm 5,4	95,1 \pm 3,5	93,1 \pm 8,3

Após o reator atingir a estabilização na etapa II, o tempo de sedimentação foi diminuído para 5 min. (etapa III). Novamente, com exceção do EtP, observou-se oscilação inicial na eficiência de remoção de parabenos, principalmente na de MeP (Figura 7.4). Enquanto as eficiências de remoção de PrP e de BuP estabilizaram um pouco após o dia 125 de operação (Figura 24), garantindo valores médios maiores do que 90% (Tabela 7.3), a eficiência de remoção de MeP continuou bastante instável até aproximadamente o dia 155 de operação, a partir do qual mostrou uma tendência crescente, alcançando valores próximos a 90% apenas no fim do experimento (Figura 7.4). Consequentemente, a eficiência média de remoção de MeP permaneceu semelhante à da etapa anterior (85%) e a menor dos quatro compostos testados (Tabela 7.3).

Figura 7.4 – Concentrações afluentes e efluentes e eficiências de remoção de parabenos do reator R2.



As eficiências obtidas no presente trabalho estão dentro da mesma faixa de eficiências globais de remoção de parabenos ($< 5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de ETEs do tipo lodo ativado (60-100% dependendo do composto) (GONZÁLEZ-MARIÑO et al., 2011; KARTHIKRAJ et al., 2017; LI et al., 2015; WANG; KANNAN, 2016). Contudo, normalmente, não é especificado que unidade de tratamento (primário, secundário ou terciário) é a principal responsável por essa remoção.

Em sistemas de lodo ativado, a remoção de parabenos pode ser resultante da ação conjunta dos processos de biodegradação e adsorção (LU et al., 2018). Sun et al. (2014) observaram elevadas eficiências de remoção de MeP ($140\text{-}270 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) e PrP ($125\text{-}390 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) no tratamentoprimário de uma ETE (70% e 50% para o MeP e o PrP, respectivamente)seguidapor valo de oxidaçãoedesinfecção UV. Logo, esses autores sugeriram a adsorção como um processo significativo de remoção de parabenos. Por outro lado, Lu et al. (2018), em ensaios em batelada com lodo ativado ($5,5 \text{ g SS L}^{-1}$) sob condições aeróbias, não observaram remoção significativa de MeP, EtP, PrP e BuP ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cada) por adsorção (1-15%).

Com relação à preferência de remoção dos compostos, embora não haja uma tendência clara de que parabenos são mais facilmente removidos nas ETEs supracitadas, González-Mariño et al. (2011) e Lu et al. (2018) observaram que, sob condições aeróbias, os parabenos de cadeia alquílica mais longa são degradados mais rapidamente. Por outro lado, é válido mencionar que Wu et al. (2017) observaram esse mesmo comportamento apenas sob condições anaeróbias, não havendo diferença significativa na cinética de degradação aeróbia dos parabenos testados. Logo, de maneira geral, entre os parabenos estudado o MeP parece ser o composto menos removido do sistema (Tabela 13).

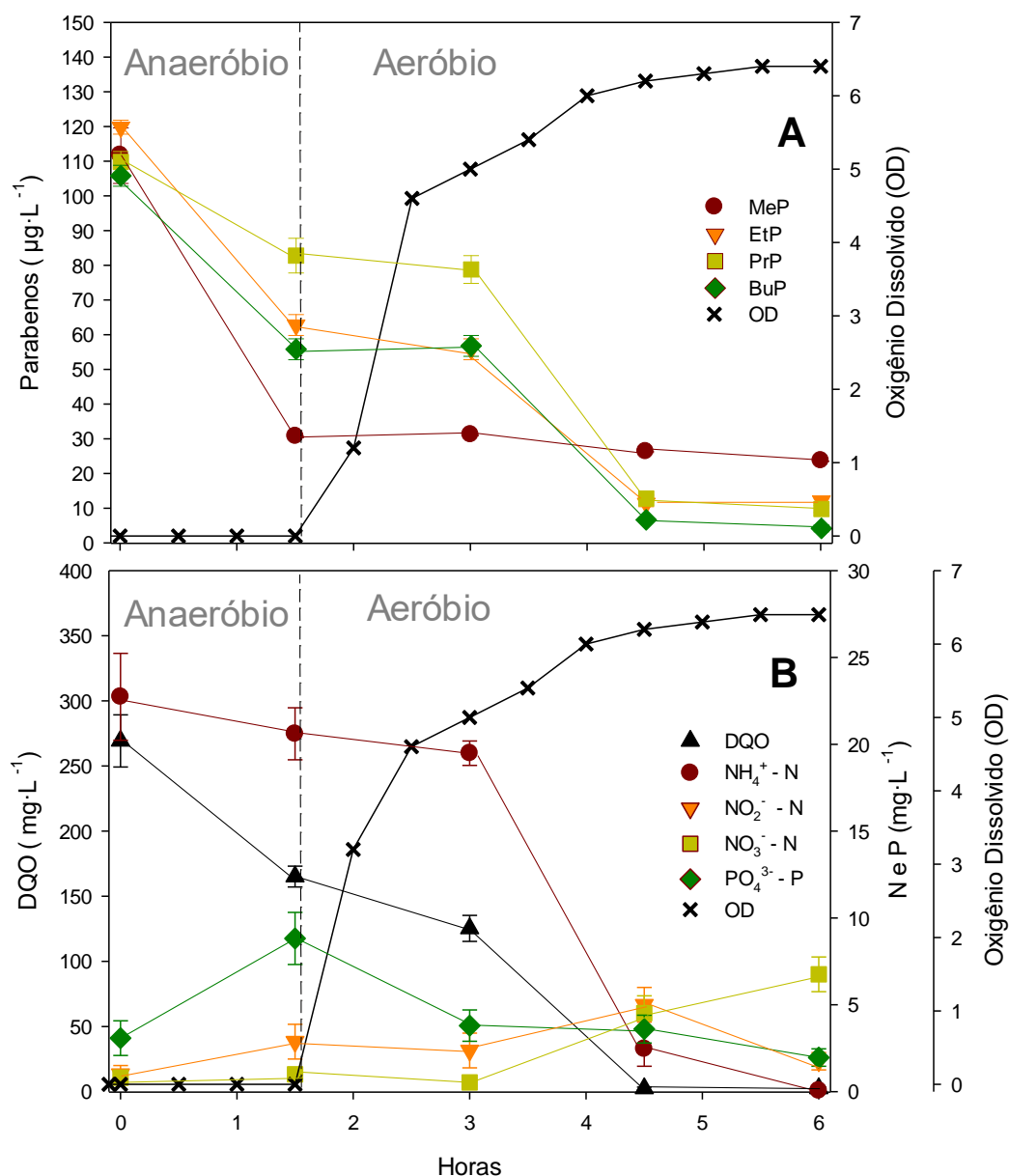
7.3.4 Perfil de remoção de parabenos, matéria orgânica, N e P ao longo do ciclo

A fim de avaliar, mais detalhadamente, a remoção dos parabenos no sistema de LGA e identificar uma possível correlação com a ação de determinados grupos microbianos funcionais responsáveis pela remoção de matéria orgânica, N e P, foram realizados ensaios para determinação do perfil de remoção desses elementos e dos parabenos ao longo do ciclo (Figura 7.5).

Na fase anaeróbia, todos os parabenos foram removidos concomitantemente com o consumo de matéria orgânica por organismos heterotróficos ordinários (OHO), principalmente, assim como por acumuladores de fósforo (OAF) e de glicogênio (OAG)

(Figura 7.5). Portanto, aparentemente, a presença de um cosubstrato facilmente biodegradável (acetato) não dificultou a remoção de parabenos.

Figura 7.5 – Remoção de parabenos (a), matéria orgânica, N e P (b) ao longo de um ciclo do R₂ no final da etapa III.



Por estarem em concentrações muito baixas, é bastante improvável que esses compostos sejam utilizados como fonte principal de carbono e energia por algum grupo de microrganismos. Logo, a hipótese mais provável é que micropoluentes sejam degradados por vias cometabólicas pela ação de enzimas não específicas (FISCHER; MAJEWSKY, 2014). De fato, Fan e Wang (2017) observaram efeito cometabólico na remoção de elevadas

concentrações de MeP, EtP e PrP ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) quando foram adicionados a esgoto sintético contendo $50 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ em um filtro horizontal aberto. Porém, é importante mencionar que, mesmo quando esses parabenos eram dissolvidos somente em água, ou seja, na ausência de um cosubstrato orgânico, eles eram efetivamente removidos, embora com eficiências menores, pois estavam em quantidades suficientes para serem utilizados como fonte de carbono e energia pela microbiota do sistema de tratamento (FAN; WANG, 2017).

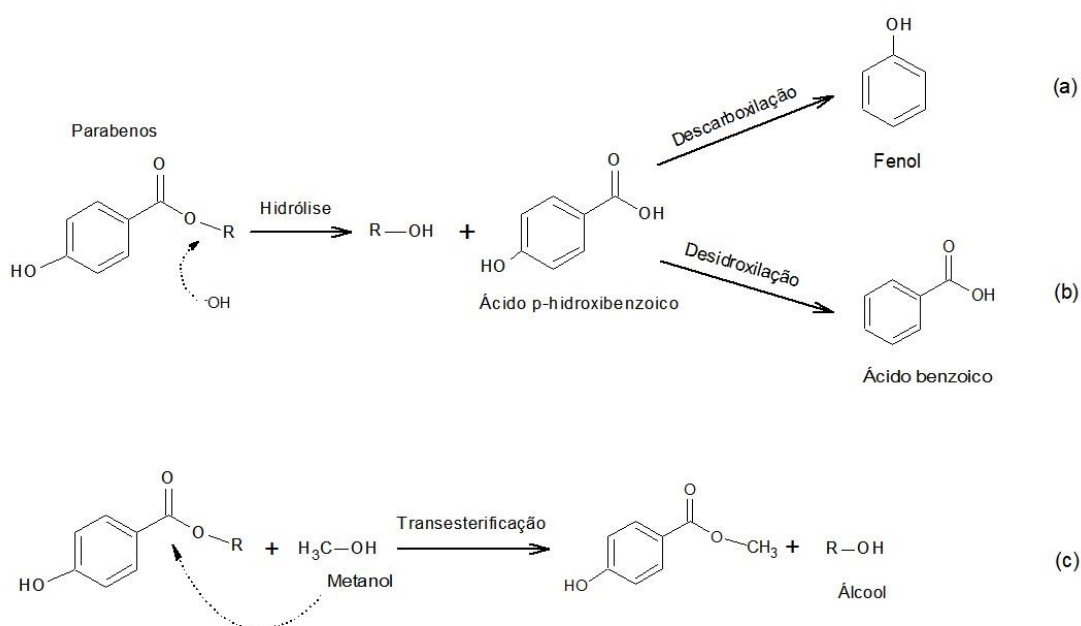
As remoções de parabenos, na fase anaeróbia, foram bastante expressivas, particularmente a do MeP ($\sim 70\%$) (Figura 7.5). Entretanto, isso não era esperado, principalmente considerando o curto tempo dessa fase (1,5 h), pois a degradação de parabenos, normalmente, é bastante lenta sob condições anaeróbias e anóxicas (WU et al., 2017). Logo, muito provavelmente, a adsorção teve um papel importante na remoção desses compostos. Em contraste, Ashfaq et al. (2017) registraram eficiências de remoção de MeP ($166 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) e PrP ($170 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) acima de 70% no tanque anaeróbio de um sistema de tratamento A2/O (TDH não especificado), em que a remoção por adsorção foi mínima. Todavia, o LGA possui teor de SPE bem maior do que o LA, e estas estão diretamente relacionadas à remoção de compostos recalcitrantes em sistemas granulares aeróbios (ROLLEMBERG et al., 2018). Portanto, a hipótese de adsorção não pode ser desprezada.

Após 1,5 h de aeração (3 h de ciclo), com o aumento do OD e o início da nitrificação, houve redução da concentração de EtP, PrP e BuP juntamente com a de DQO e amônio, estabilizando-se quando o cosubstrato (acetato) foi quase totalmente consumido e o nitrogênio amoniacal atingiu concentrações abaixo de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ às 4,5 h do tempo do ciclo (Figura 7.5). Esses resultados reforçam a hipótese de cometabolismo como principal mecanismo de remoção de micropoluentes, especialmente pela atividade das BOA, já que sua enzima não específica amônia mono-oxigenase é capaz de degradar uma série de compostos como diclofenaco, sulfametoxazol, neproxeno, tetraciclina, entre outros (NSENGA KUMWIMBA; MENG, 2019). Com relação ao metabolismo de acumulação de fósforo, aparentemente, aconteceu independentemente da remoção de parabenos (Figura 7.5).

Inesperadamente, o MeP apresentou concentração praticamente constante durante toda a fase aeróbia (Figura 7.5a), contrariando os resultados reportados por Wu et al. (2017), em que os parabenos são rapidamente degradados sob condições aeróbias (tempo de meia-vida $< 20 \text{ min}$). Uma hipótese que poderia justificar a aparente persistência de MeP no meio seria a conversão dos outros parabenos no referido composto durante o processo de degradação. Entretanto, segundo Wang et al. (2018a), tal conversão só acontece na presença de metanol por meio da reação de transesterificação (Figura 7.6). Na ausência de álcoois, a

degradação dos parabenos ocorre por meio de hidrólise da ligação éster, sendo gerados um álcool e o ácido p-hidroxibenzoico (WANG et al., 2018b), o qual pode ser posteriormente biotransformado em fenol (VALKOVA et al., 2001) ou ácido benzoico (WU et al., 2017) (Figura 7.6). Portanto, no presente trabalho, em que o co substrato utilizado era o acetato, é bastante improvável a formação de MeP por transesterificação.

Figura 7.6– Rotas de degradação dos parabenos sob condições aeróbias.



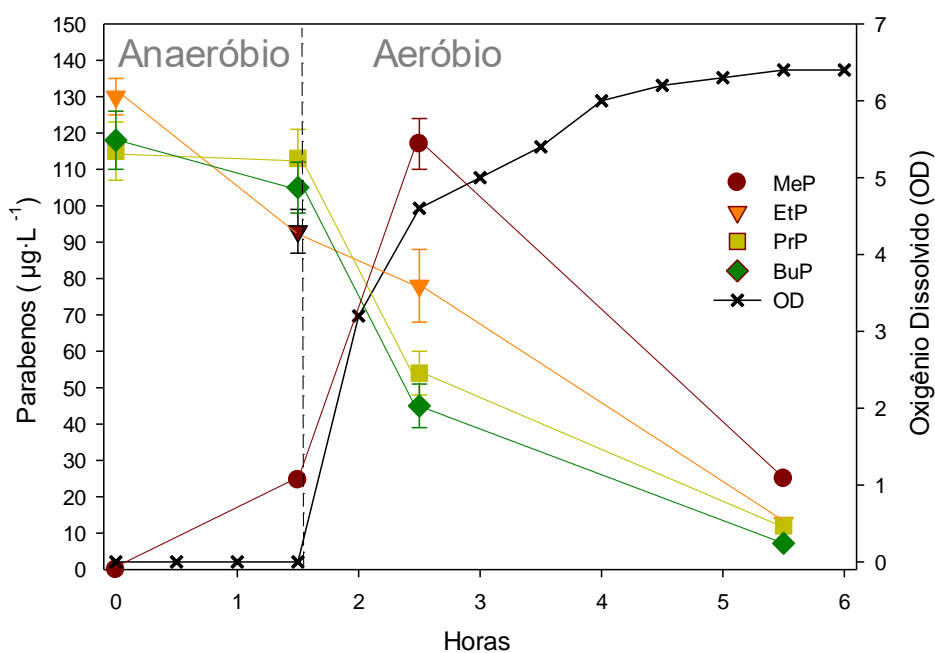
Fonte: Adaptado de Valkova et al., (2001), Wang et al. (2018a) e Wu et al. (2017).

Para verificar a hipótese de conversão dos parabenos maiores em MeP, inicialmente, o R2 foi alimentado com água residuária sintética livre de parabenos até que não fossem mais detectados no efluente (~15 dias). Então, passou a ser suplementado apenas com EtP, PrP e BuP, e, após 7 dias de operação, fez-se uma nova análise de ciclo (Figura 7.7).

Durante a fase anaeróbia, os três compostos começaram a ser removidos (principalmente o EtP) (Figura 7.7), porém não com a mesma intensidade observada no teste anterior, com os quatro parabenos (Figura 7.4). Interessantemente, o MeP foi detectado em concentração aproximada de $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ logo no final da fase anaeróbia (Figura 7.7). Isso reforça a hipótese de que há biotransformação dos parabenos testados em MeP sob essas condições e que a remoção não é resultado exclusivo de adsorção, embora ela ainda possa ter um papel relevante, já que a concentração de MeP esperada, levando em consideração a reação supracitada, era de aproximadamente $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Todavia, também é provável que uma fração do MeP não recuperado ($\sim 15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) tenha sido biotransformada.

Na fase aeróbia, o EtP, o PrP e o BuP foram degradados mais expressivamente (Figura 7.7) como observado anteriormente (Figura 7.5). Quando o OD atingiu uma concentração maior que $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2,5 h de ciclo), a concentração de MeP foi aproximadamente $125 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 26), um pouco menor do que a esperada ($\sim 150 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), reforçando a hipótese proposta e indicando que a reação pode ocorrer independentemente das condições redox. A partir de então, todos os compostos foram removidos, e, ao final dessa fase, as concentrações de EtP, PrP e BuP foram menores do que $15 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto a do MeP foi próxima a $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 7.6), semelhantes às encontradas nos ciclos anteriores (Figura 7.5).

Figura 7.7 – Remoção de parabenos ao longo de um ciclo do R2 quando alimentado sem MeP.



É importante enfatizar que, apesar de o MeP ter sido apontado como um provável intermediário da degradação anaeróbia e aeróbia dos parabenos de cadeia alquílica mais longa, investigações mais aprofundadas sobre as rotas de degradação de parabenos devem ser conduzidas, incluindo o monitoramento de outros intermediários citados na literatura, como o ácido p-hidroxibenzoico, o fenol e o ácido benzoico, para confirmar a hipótese levantada.

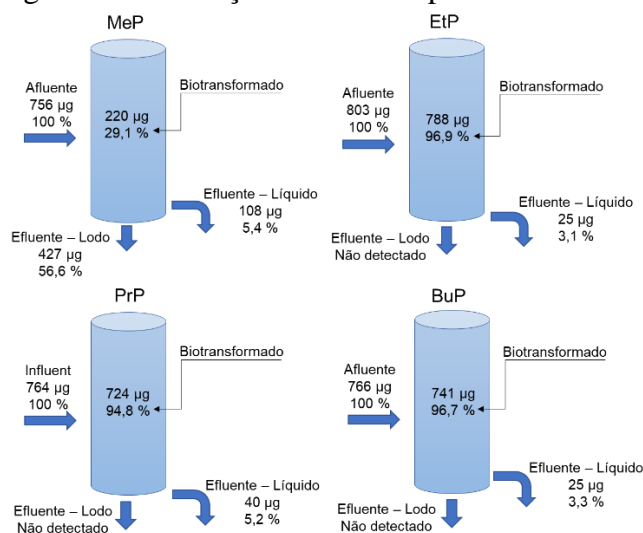
7.3.5 Balanço de massa de parabenos

Como mencionado anteriormente, outro provável mecanismo de remoção de

parabenos, além da biodegradação, é a adsorção no lodo, uma vez que é característico do LGA adsorver micropoluentes nas SPE (NANCHARAI AH; KIRAN KUMAR REDDY, 2018). Quando o R2 foi alimentado com água residuária sintética contendo os quatro parabenos, apenas o MeP foi detectado no lodo ($\sim 300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Logo, para esse composto, a adsorção foi o principal mecanismo de remoção ($\sim 57\%$). Por outro lado, a remoção dos parabenos de cadeia alquílica maior ocorreu predominantemente por biotransformação (94-97%), já que não foram detectados no lodo (Figura 7.8). Considerando a hipótese de que o MeP é um dos intermediários da rota de degradação deles, foi estimado o balanço de massas dos poluentes no reator, em termos de MeP. Constatou-se que a fração de poluente que sofreu biotransformação no reator foi de 76,7%, enquanto 6,5% foram eliminados no efluente líquido, e 16,8%, no lodo de descarte.

Ashfaq et al. (2017), ao avaliarem um sistema A2/O durante o tratamento de água residuária contendo $166 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeP e $170 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de PrP, verificaram que 88,6% da carga diária de MeP e 93,5% da de PrP foram removidos por biotransformação, enquanto a adsorção no lodo de descarte foi responsável por apenas 1,4% e 0,3% da remoção de MeP e PrP, respectivamente. Li et al. (2015), também em um sistema A2/O, observaram que os parabenos de cadeia alquílica mais longa (EtP, PrP e BuP em concentrações de 140, 438 e $28 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) foram quase totalmente removidos ($>99\%$), sendo majoritariamente removidos por biotransformação (95-99%). Por outro lado, assim como no presente trabalho, o MeP ($567 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) teve uma parcela significativa removida por adsorção (no lodo primário e de descarte) ($\sim 22\%$), mas a biotransformação ainda foi o principal mecanismo de remoção do sistema, diferentemente dos resultados supracitados (Figura 7.8).

Figura 7.8 – Balanço de massa de parabenos no R2.



7.3.6 Metabolismo bacteriano

A bioatividade do R1 e R2 foi quantificada com base na taxa de consumo de oxigênio (TCO) através da análise respirométrica. No início, as TCO_{end} das biomassas eram de 14,8 e 17,5 $mg\ O_2 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, que correspondiam a um X_a de 1,1 e 0,8 $mg\ X_a \cdot L^{-1}$ para R1 e R2, respectivamente. Durante os testes de oxidação aeróbia para matéria orgânica (120 $mg\ DQO\ L^{-1}$), a razão TCO_{exo}/X_a máxima foi de 93,4 e 90,2 $mg\ O_2 \cdot g\ X_a^{-1} \cdot h^{-1}$ para R1 e R2, respectivamente, indicando que não houve evidência de inibição desse grupo por parte dos parabenos nas concentrações testadas como foi observado no item 7.3.2, em que as eficiências de remoção de DQO dos reatores foram superiores a 90%.

Os valores das constantes μ_m encontrados neste estudo, no R1 e no R2, foram 1,24 e 1,26 d^{-1} , respectivamente. Tais resultados permitem inferir que a presença dos parabenos não interferiu no metabolismo desses microrganismos, o que era esperado, já que os parabenos não apresentaram resistência de degradação e estavam em ordem de $\mu g \cdot L^{-1}$. Esses valores foram semelhantes aos reportados pela literatura. Liu et al. (2016) obtiveram valores entre 0,5 e 1,5 d^{-1} , e Rollemberg et al. (2019) obtiveram 0,9 d^{-1} .

Com relação aos organismos nitrificantes, os valores médios das constantes cinéticas encontram-se na Tabela 7.4. Pode-se perceber que a constante μ_m foi cinco vezes maior no R1, para as BOA, em comparação ao R2, indicando que os parabenos prejudicaram bastante a atividade desse grupo, enquanto, para as BON, percebe-se que esses compostos podem não ter sido prejudiciais, pois os valores de μ_m foram iguais. Zhou et al. (2019) operaram um RBS de LA com ciclos de 12 h, TDH de 24 h e troca volumétrica de 40% na presença de ibuprofeno e constataram que esse micropoluente foi prejudicial para as BOA e as BON, inibindo o crescimento delas. Logo, no presente estudo, é possível que o mesmo tenha acontecido com as BOA na presença dos parabenos.

Tabela 7.4– Valores das constantes cinéticas das bactérias nitrificantes para os reatores R1 (controle) e R2 (parabenos).

Reator	Grupo de bactéria	μ_m (d^{-1})
R1	BOA	0,5
	BON	0,1
R2	BOA	0,1
	BON	0,1

Essa diferença de crescimento entre BOA e BON, no R1, permite inferir que há uma tendência de acúmulo de nitrito (XAVIER, 2017), já que teoricamente há uma alta taxa

de conversão de amônia a nitrito, e baixa taxa de conversão deste a nitrato. Já no R2, mesmo com μ_m iguais, pela Figura 7.5, percebe-se que durante 4,5 h do ciclo o nitrito aparece em concentração levemente maior, que marca o início da atividade das BON. Entretanto, nos dois reatores, mesmo com essa limitação de BON, os valores da eficiência de nitrificação mantiveram-se altos (superior a 92%) durante toda a operação, provavelmente porque o período aeróbio do ciclo é suficientemente grande para promover toda a conversão de NO_2^- a NO_3^- . Comparando-se as constantes μ_m encontradas no R1 com as de Rollemberg et al. (2019), os resultados foram parecidos, $0,3 \text{ d}^{-1}$ e $0,2 \text{ d}^{-1}$ para BOA e BON, respectivamente.

Para os organismos desnitrificantes, a Tabela 7.5 demonstra os valores das taxas de consumo médias de nitrogênio ($\text{mg N} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) da desnitrificação endógena e exógena, tanto via nitrito quanto via nitrato.

Tabela 7.5– Taxas de consumo médias ($\text{mg N} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) no processo de desnitrificação para os reatores R1 (controle) e R2 (parabenos).

Reator	Aceptor	Condição	
		Endógena	Exógena
R ₁	NO_2^-	7,1	37,5
	NO_3^-	3,9	50,2
R ₂	NO_2^-	12,1	70,9
	NO_3^-	7,4	106,9

Observa-se que todas as taxas de consumo médias sob a condição exógena, ou seja, utilizando a matéria orgânica extracelular (acetato) como doador de elétrons, foram consideravelmente maiores que a endógena, conforme esperado. No geral, os valores da taxa de consumo para a desnitrificação endógena foram menores que os obtidos por Rollemberg et al. (2019) quando estes utilizaram LGA, porém maiores quando utilizaram lodo ativado (LA), principalmente via nitrito, possivelmente por causa da maior quantidade de SPE presente no LGA, a qual passa a ser utilizada como fonte de carbono, na ausência de acetato (HE et al., 2018).

Outro fato observado é que, comparando-se uma mesma situação em reatores diferentes, as taxas de consumo médias foram maiores em todo o período no R2, levantando uma hipótese de que, por possuírem menos SPE e apresentarem os microrganismos mais expostos, conforme mostra a Figura 7.3, os grânulos desse reator possibilitaram uma melhor penetração do substrato, fazendo com que os organismos desnitrificantes o consumissem mais rapidamente que os do R1, os quais apresentaram grânulos mais compactos, e conseqüentemente, uma difusão mais dificultada. Também é importante reforçar que grânulos grandes (mais de 70% dos grânulos eram maiores que 1mm) possuem zonas anóxicas maiores

que favorecem os organismos desnitrificantes. No entanto, tal aumento na rapidez das reações aparentemente não interferiu no resultado final, visto que as eficiências de remoção de nitrogênio foram semelhantes nos dois reatores.

Comparando-se os resultados obtidos nesta pesquisa com os de Rollemberg et al. (2019), na desnitrificação exógena, eles encontraram valores de $36,5 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $57 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para o LGA, apresentando uma grande semelhança com os obtidos no R1. Já na desnitrificação endógena, comparando-se esse mesmo reator (R1), o valor médio foi similar para a via do nitrito ($8,0 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e bastante acima para a via do nitrato ($12,5 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

E, por fim, para os testes metabólicos de fósforo, analisaram-se as taxas de liberação e absorção de fosfato pelos OAF e pelos ODAF. No R1, as taxas de liberação foram de aproximadamente $3 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto, no R2, elas foram próximas de $1,5 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Isso indica que os parabenos interferiram na ação dos microrganismos responsáveis pela liberação de fósforo. No entanto, os dois reatores apresentaram valores menores que os obtidos por Rollemberg et al. (2019), que foi de aproximadamente $6,2 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Quanto à absorção de fósforo, os dados estão apresentados na Tabela 7.6. Pode-se perceber que, no R1, a absorção dos OAF é bem maior que a dos ODAF, isso pode indicar que existe maior quantidade do primeiro grupo no sistema em comparação com o segundo. Porém, no R2, não houve grande diferença entre os valores de absorção dos OAF e dos ODAF. Comparando-se os dois reatores, a menor absorção dos OAF apresentada pelo R2 pode significar que a presença dos parabenos interferiram negativamente na atividade desse grupo funcional de organismos. Para os ODAF, as absorções nos dois reatores foram similares, indicando que a presença dos parabenos provavelmente não interferiu na atividade desse grupo.

Tabela 7.6– Valores de absorção de fosfato ($\text{mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) dos OAF e ODAF para os reatores R1 (controle) e R2 (parabenos).

Reator	Grupo de microrganismos		
	OAF	ODAF (via NO_3^-)	ODAF (via NO_2^-)
R ₁	4,5	2,4	2,1
R ₂	2,3	1,8	2,0

As Figuras 7.9, 7.10 e 7.11 trazem os perfis de concentração de DQO, P-PO_4^{3-} , NO_2^- e NO_3^- ao longo dos ensaios.

Figura 7.9 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos OAF para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).

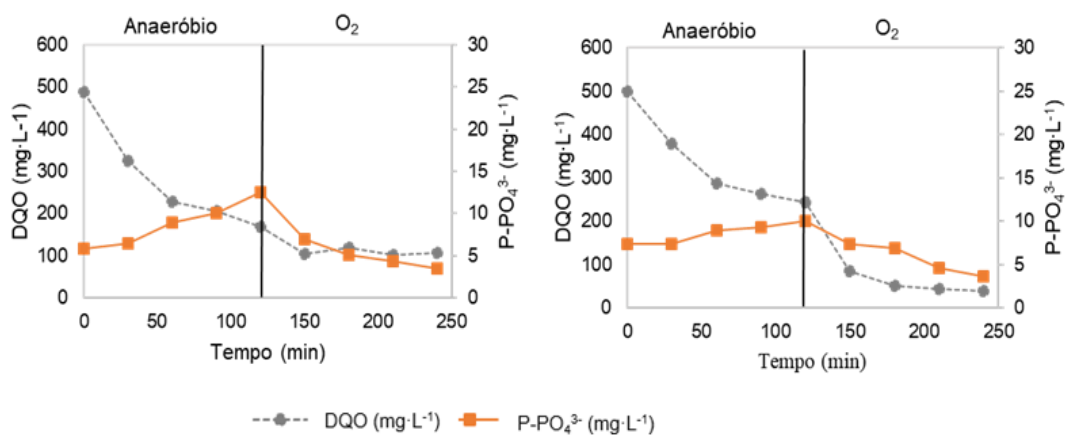


Figura 7.10 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos ODAF – via nitrato para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).

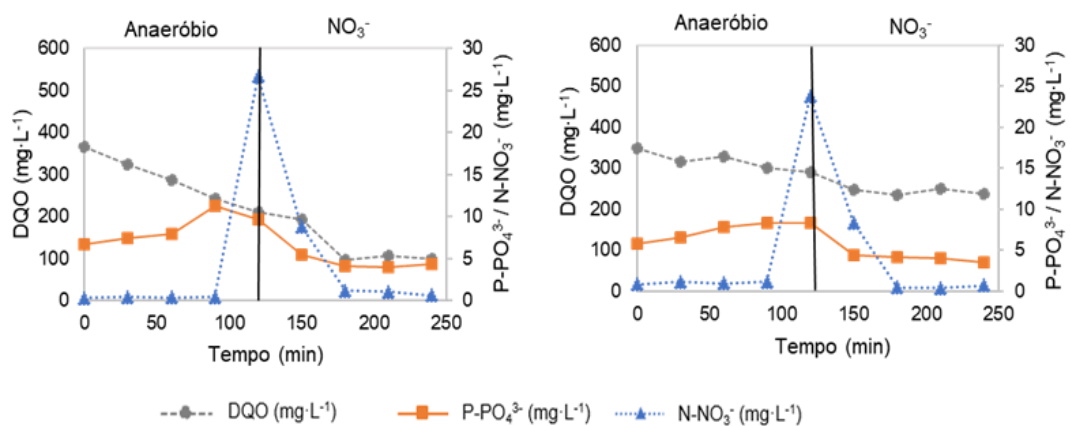
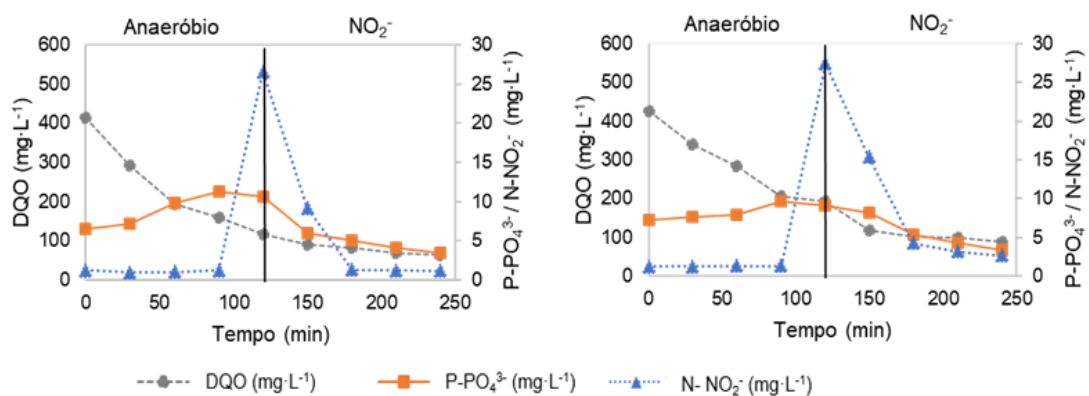


Figura 7.11 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos ODAF – via nitrito para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).



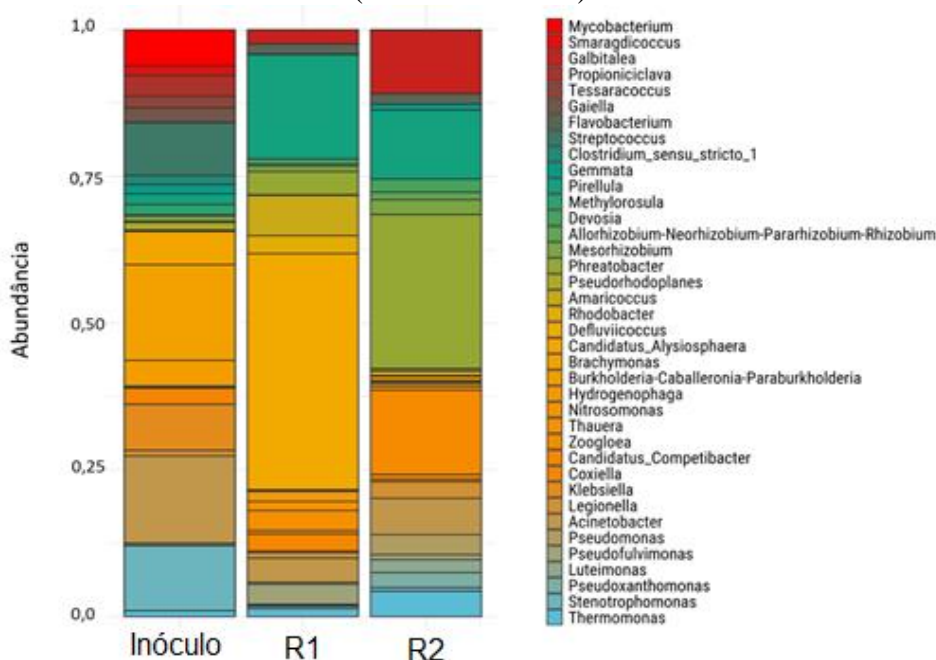
7.3.7 Caracterização microbiológica

A análise microbiológica foi realizada no lodo de inóculo e nos lodos do R1 e do R2 no dia 180 de operação. O lodo de inóculo apresentou 28 famílias diferentes de microrganismos, sendo as de maiores abundâncias: Burkholderiaceae (20,7%), Moraxellaceae (14,8%), Xanthomonadaceae (13,5%), Streptococcaceae (9%), Enterobacteriaceae (7,9%) e Mycobacteriaceae (6,2%). Com o processo de granulação, o lodo do R₁ apresentou 32 famílias, sendo as mais abundantes: Rhodospirillaceae (39,3%), Pirellulaceae (17,4%), Rhodobacteraceae (9,8%) e Moraxellaceae (4%). Em contraste, no lodo do R₂, foram identificadas 29 famílias, sendo as de maior proporção: Rhizobialesincertaesedis (25,8%), Rhodocyclaceae (14,7%), Pirellulaceae (11,5%), Microbacteriaceae (10,6%) e Moraxellaceae (6,1%). Portanto, a presença de parabens parece ter influenciado a dinâmica populacional durante o processo de granulação, refletindo, conseqüentemente, nas características físico-químicas do grânulo (seção 7.3.1).

A Figura 7.12 apresenta a diversidade de microrganismos por gênero, presentes no lodo de inóculo e nos reatores. Observou-se que, nas três amostras, a predominância foi de bactérias heterotróficas. No R1, os gêneros dominantes são *Defluviicoccus* (39,3%), que são organismos desnitrificantes acumuladores de glicogênio (ODAG), e *Amaricoccus* (6,7%), que são OAG (FALVO et al., 2001; WONG; LIU, 2007). Já no R2, predominaram os gêneros *Phreatobacter* (25,8%), que são OHO (TÓTH et al., 2014), e *Zoogloea* (14,1%), que são desnitrificantes. Segundo Rollemberg et al. (2018), os OHO não têm um papel direto na granulação. Assim, o fato de estarem em abundância no R2 pode estar relacionado com a estrutura frágil dos grânulos. Ainda que o gênero *Zoogloea* seja reportado como produtora de SPE (TANSEL, 2018), ele estava em menor quantidade.

As nitrificantes são caracterizadas pela presença das BOA do gênero *Nitrosomonas* (1,5% no R1 e 0,5% no R2) e das BON do gênero *Candidatus Nitrotoga* (0,7% no R1 e 0,1% R2) (LÜCKER et al., 2015; WAGNER et al., 2000). Apesar de o R2 apresentar menor quantidade de nitrificantes, a remoção de nitrogênio não foi prejudicada (Tabela 7.2). No entanto, a diferença de abundância pode estar relacionada à ação dos parabens na zona externa dos grânulos. Em contraste, Zhou et al. (2019) operaram um RBS de LA com ciclos de 12 h, TDH de 24 h e troca volumétrica de 40% na presença de ibuprofeno e constataram que esse micropoluinte, apesar de não ter ação antimicrobiana predominante, interferiu negativamente na nitrificação, pois inibiu o crescimento das BOA e das BON.

Figura 7.12 – Diversidade dos microrganismos por gênero do inóculo e dos reatores R1 e R2 (abundância >1%).



Com relação à remoção de fósforo, citam-se, principalmente, os OAF do gênero *Acinetobacter* (MINO; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1998), com abundância de 4%, no R1, e 6,1%, no R2. Como essas proporções são bem próximas, podem justificar a similaridade entre o desempenho dos dois reatores (Tabela 7.2).

Outro aspecto relevante é a produção de SPE. No R1, foram identificados os gêneros produtores de SPE *Thauera* (3,3%) e *Thermomonas* (1,3%), enquanto, no R2, *Zoogloea* (14,1%) e *Thermomonas* (4,2%). Ainda, esses grupos também estão relacionados com o processo de desnitrificação (LARSEN et al., 2008; TANSEL, 2018; TIAN et al., 2019). Embora o R2 tenha apresentado abundância de produtores de SPE maior do que o R1, o teor de SPE foi quase 30% menor, sobretudo devido ao menor teor de PN (Figura 7.2). Mesmo assim, os resultados evidenciam que a presença dos parabenos pode ter gerado pressão seletiva que favoreceu a sobrevivência de microrganismos produtoras de SPE, cuja produção é utilizada como mecanismo de defesa contra agentes tóxicos (ROLLEMBERG et al., 2018; TIAN et al., 2019; ZHAO et al., 2015b).

Complementarmente, foi comparado entre os grânulos formados os gêneros mais comuns e os mais abundantes no reator exposto aos parabenos levando em consideração o nível de detecção >1% e o mínimo de prevalência de 66% (correspondente à presença mínima semelhante entre os dois lodos). Os resultados mostraram que os gêneros *Acinetobacter* e *Pirellula* foram os mais comuns, e os que mais se desenvolveram no R2 foram *Phreatobacter*,

Zoogloea, *Galbitalea* e *Thermomonas*.

Não foram encontrados estudos que relacionam a degradação de parabenos a grupos específicos de bactérias. Porém, alguns gêneros identificados no R2 estão relacionados à degradação de compostos com estruturas semelhantes. Tian et al. (2019) afirmam que as SPE produzidas pelo gênero *Zoogloea* podem ser responsáveis por remover hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por adsorção, podendo ser posteriormente degradados. Li et al. (2019) apontam que bactérias dos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* estão relacionadas à degradação de fenol, assim como *Thermomonas* (BAEK et al., 2003).

Finalmente, como os principais grupos de microrganismos presente no reator com presença de parabenos são heterotróficos aeróbios e desnitrificantes, há indícios de que a degradação dos poluentes pode estar relacionada ao metabolismo dos mesmos, reforçando a hipótese de que a degradação é, provavelmente, resultado de cometabolismo.

7.4 Conclusão

Foi possível desenvolver grânulos aeróbios, na presença de parabenos, com boa sedimentabilidade, porém com estrutura frágil e desuniforme devido à menor produção de SPE, o que também afetou a concentração de sólidos do sistema. Em relação à remoção de matéria orgânica, N e P, não foi evidenciado efeito negativo significativo dos parabenos nas concentrações testadas.

Elevadas eficiências de remoção de parabenos foram alcançadas (> 85%), tendo sido verificado acúmulo do MeP, possivelmente por ser um produto da conversão dos demais parabenos. Embora os parabenos tenham sido parcialmente removidos na fase anaeróbia, a fase aeróbia foi a principal responsável pela remoção desses compostos, muito provavelmente por cometabolismo. Enquanto a adsorção não contribuiu evidentemente para a remoção de EtP, PrP e BuP, foi o principal mecanismo de remoção de MeP (~57%), o qual foi sugerido como provável intermediário da degradação dos demais parabenos.

Os testes metabólicos mostraram que os parabenos nas concentrações testadas, não alteraram a atividade dos organismos heterotróficos. Quanto aos organismos nitrificantes (BOA e BON), esses compostos afetaram negativamente apenas o crescimento das BOA, porém isso não comprometeu a eficiência de nitrificação do sistema.

Finalmente, em relação à remoção de N e P, enquanto a taxa de desnitrificação, via nitrito ou nitrato, foi maior no R2, a taxa de absorção de P, notadamente dos OAF, foi maior no R₁. Mesmo assim, não houve diferença significativa entre as remoções de N e P dos dois reatores.

8 CAPÍTULO VI-REMOÇÃO DE TRIMETOPRIMA E SULFAMETOXAZOL EM SISTEMAS DE GRANULAÇÃO AERÓBIA

8.1 Introdução

Os antibióticos trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) pertencem à classe de micropoluentes emergentes (ME), são geralmente utilizados em conjunto na medicina humana e veterinária, e estão normalmente presentes em águas residuárias e mesmo em águas superficiais. Por exemplo, em rios, a TMP geralmente é encontrada em concentrações na ordem de dezenas a centenas de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto o SMX é detectado em concentrações abaixo de $100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (CARVALHO; SANTOS, 2016)

A referida presença merece atenção, visto que existem evidências de que esses fármacos podem gerar impactos sobre o meio ambiente. Em relação à TMP, há registros de seu efeito negativo sobre células de mexilhões (BINELLI et al., 2009; MATOZZO et al., 2015), mamíferos e peixes (PAPIS; DAVIES; JHA, 2011). Por sua vez, o SMX é capaz de afetar o crescimento populacional de algas e crustáceos (ISIDORI et al., 2005), além de haver relatos de seu impacto transgeracional sobre nematoides (YU et al., 2017).

Entre as diversas tecnologias de tratamento de esgotos utilizadas para remoção de TMP e SMX, o tratamento anaeróbio parece ser mais eficiente, apresentando remoções superiores a 90% (ALVARINO et al., 2014; CARBALLA et al., 2007). Por outro lado, sistemas de lodo flocular aeróbio (LFA) registraram eficiências menores, porém com faixas de variação mais amplas. As remoções estão entre 0 e 83%, para a TMP, e entre 40 e 75%, para o SMX (ALVARINO et al., 2014; JEWELL et al., 2016b; KANG et al., 2018a). A exceção normalmente se dá no caso de LFA rico em população de BOA (bactérias oxidadoras de amônia), para o qual se obteve remoção de SMX superior a 95% (KASSOTAKI et al., 2016).

Já no caso de sistemas de lodo granular aeróbio (LGA), só há estudos de longo prazo para o SMX, e sua faixa de remoção fica entre 60 e 91% (LIU et al., 2019b; ZHAO et al., 2015a). Comparativamente, apesar de esses valores apresentarem uma faixa de variação mais ampla do que aquela reportada para sistemas anaeróbios, eles são melhores do que a maioria dos valores obtidos com biomassa flocular, o que aponta o LGA como uma tecnologia promissora para tratamento de ME.

Associado a isso, o uso de mediadores redox em tecnologias biológicas de tratamento de esgoto também se torna uma possibilidade para potencializar o seu desempenho quanto à remoção de ME. Essas substâncias são amplamente utilizadas devido a sua

capacidade de acelerar a transferência de elétrons ou se comportarem como aceptores finais de elétrons (SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007; MARTINEZ; ZHU; LOGAN, 2017; VAN DER ZEE; CERVANTES, 2009). Nesse sentido, vários compostos vêm sendo estudados, como riboflavina, antraquinona-2-sulfonato (AQS) e, especialmente, antraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS), como auxiliador na degradação de muitos compostos poluidores, como corantes (SILVA et al., 2012), cromo (IV) (MENG et al., 2018), pentaclorofenol (CHEN et al., 2016), pesticidas (LIU; XU; FAN, 2015), solventes e detergentes industriais (AULENTA et al., 2010), entre outros. Com relação aos antibióticos, Zhou et al. (2018) reportam que a degradação de sulfametoxazol (SMX) por *Shewanellaoneidensis* MR-1, sob condições redutoras de Fe (III), pôde ser melhorada na presença de AQDS e riboflavina.

Entretanto, percebe-se algumas inconsistências e escassez de trabalhos que avaliem a remoção de TMP e SMX em sistemas de granulação aeróbia, sobretudo quando associados, investigando em detalhes o processo de formação dos grânulos, a ecologia microbiana e as eficiências de remoção de poluentes. Desse modo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos antibióticos TMP e SMX ($200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cada) na formação e manutenção do lodo aeróbio, na produção de SPE, na eficiência de remoção e na capacidade de remover adicionalmente carbono, nitrogênio e fósforo. Também foi investigada a influência dos fármacos sobre a atividade metabólica dos principais grupos funcionais e as comunidades microbianas que se mostraram preferencialmente envolvidas na degradação dessas substâncias. Além disso, foi avaliado o impacto do AQDS como auxiliador na biotransformação dos poluentes em sistemas de LGA.

8.2 Materiais e métodos

8.2.1 Configuração dos sistemas e condições operacionais

Dois RBS convencionais (diâmetro: 100 mm, altura: 1 m, volume útil: 7,2L), R1 e R2, foram operados com tempos de sedimentação diminuídos progressivamente para obtenção de biomassa granular (Tabela 8.1). Foi adotada troca volumétrica de 50% e velocidade ascensional de ar de $2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Os reatores foram envoltos com papel alumínio para evitar fotodegradação dos micropoluentes.

A solução de alimentação era composta por: carbono solúvel na forma de acetato ($\sim 500 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$), amônio ($\sim 50 \text{ mg NH}_4^+\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$), fosfato ($\sim 7 \text{ mg PO}_4^{3-}\cdot\text{P}\cdot\text{L}^{-1}$), magnésio ($\sim 75 \text{ mg MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\cdot\text{L}^{-1}$), cálcio ($\sim 7,5 \text{ mg CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}\cdot\text{L}^{-1}$), bicarbonato de sódio como

alcalinizante ($\sim 1 \text{ g CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) e solução de micronutrientes ($\sim 1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$), cuja composição foi adaptada a partir de Santos et al. (2005). A solução de alimentação do reator R2 continha ainda os compostos TMP e SMX ($\sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ cada), obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) e preparados usando acetato como solvente. O reator R1 foi mantido como controle, no qual não houve exposição aos supracitados fármacos. As soluções de alimentação foram mantidas a 4°C , sendo o recipiente de alimentação do reator R2 também envolto com papel alumínio para evitar fotodegradação dos micropoluentes.

Tabela 8.1– Etapas da operação dos reatores de LGA e divisão entre as diferentes fases do ciclo do RBS.

	Etapa I	Etapa II	Etapas III e IV
Alimentação (min.)	30	30	30
Período Anaeróbio/Anóxico (min.)	60	60	60
Aeração (min.)	250	260	265
Sedimentação (min.)	18	8	3
Descarte (min.)	1	1	1
Descanso (min.)	1	1	1
Tempo total de ciclo (h)	6		
Duração (dias)	47	57	113

Na Etapa IV, o reator R2 foi também suplementado com antraquinona-2,6-dissulfonato de sódio (AQDS) (Sigma-Aldrich, EUA), um composto modelo mediador redox a uma concentração de $25 \mu\text{M}$, a fim de avaliar o seu impacto na eficiência de remoção de TMP e SMX.

8.2.2 Monitoramento do sistema

Foram monitorados os valores de DQO (demanda química de oxigênio); de nitrogênio na forma de amônio ($\text{NH}_4^+\text{-N}$), nitrito ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) e nitrato ($\text{NO}_3^-\text{-N}$); de fósforo na forma de fosfato (PO_4^-P) e de todas as frações de sólidos, de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). Essas análises foram realizadas para as correntes afluente e efluente, 3 vezes por semana. A aferição do índice volumétrico de lodo (IVL) dinâmico para os tempos de 5 e 30 min. (SCHWARZENBECK; BORGES; WILDERER, 2005) também foi realizada na mesma frequência.

A determinação da distribuição granulométrica da biomassa foi realizada pela passagem do licor misto por peneiras de aberturas 0,2 e 1 mm, sendo registrados os pesos secos da amostra total e das alíquotas que passavam em cada uma das peneiras. Essa verificação também foi realizada a cada quinze dias.

Quinzenalmente, as SPE foram quantificadas. Para extraí-las, 5 mL de licor misto eram adicionados de 5 mL de solução 1 M de NaOH, aquecidos em banho-maria a 80 °C durante 30 min, mantidos em banho ultrassônico de 55 kHz por 5 min., filtrados (membrana de porosidade 0,45 µm) e diluídos (fator de diluição 2) (TAY; LIU; LIU, 2001c). Para quantificação das proteínas (PN) e polissacarídeos (PS) foram utilizados, respectivamente, uma modificação do método de Lowry e o método fenol-ácido sulfúrico (LONG et al., 2014).

Os microrganismos presentes nos grânulos maduros (amostras coletadas na Etapa IV) foram identificados conforme descrito por Rollemberg et al. (2019). A extração de DNA foi feita em triplicata para cada amostra de lodo.

8.2.3 Quantificação de TMP e SMX

Para, a quantificação das concentrações afluentes e efluentes de TMP e SMX no R2, as amostras (500 mL) eram previamente filtradas (0,45µm) e acidificadas com HCl(pH 2,5-3). Em seguida, eram percoladas através de cartuchos Strata-X® (500 mg, 6 mL) (Phenomenex®, EUA) para a extração em fase sólida dos antibióticos, os quais eram eluídos com metanol grau HPLC/UV (4 mL) (99,8%, Neon, Brasil). O eluato (20 µL) era, então, analisado por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, *high-performance liquid chromatograph*) LC-20A Prominence equipado com uma coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 (4,6×150 mm, 5 µm) e um detector UV-Vis SPD-20A (258 nm) (Shimadzu Corporation, Japão). Foi realizada eluição por fase móvel composta por acetonitrila grau HPLC/UV (99,9%, Sigma-Aldrich, Alemanha) e solução de HCl 0,1% com o seguinte gradiente: aumento de 10 até 80% de acetonitrila em 10 min., retornando a 10% em 4 min. O fluxo era, inicialmente, de 1,0 mL·min⁻¹ e, após 5 min. de corrida, foi aumentado para 2,0 mL·min⁻¹. A temperatura do forno foi mantida a 35 °C durante toda a corrida.

Ao final da Etapa III (após maturação dos grânulos), o perfil de remoção dos antibióticos ao longo do ciclo do R2 foi avaliado em duplicata (dois ciclos). Durante cada ciclo, o oxigênio dissolvido (OD) foi medido continuamente (YSI 5000, YSI Incorporated, EUA).

8.2.4 Quantificação de TMP e SMX no lodo

A quantificação de TMP e SMX adsorvidos no lodo foi realizada no final da Etapa III com aproximadamente 200 dias de exposição aos antibióticos conforme metodologia

adaptada de López-Serna et al. (2018). Um volume de 100 mL de amostra de lodo fresco foi liofilizado (Liofilizador L101, Liobras, Brasil). Após liofilizado, o lodo seco foi pesado em um frasco de vidro de 20 mL, juntamente com 5 mL de acetona (99%, Sigma-Aldrich, Alemanha). A mistura foi completamente agitada em vórtex e permaneceu durante 12 h em repouso para permitir a evaporação do solvente. Um volume de 12 mL de água MilliQ® pH 9 foi então adicionado ao frasco, que foi vigorosamente agitado com vórtex para obter uma suspensão homogênea. Em seguida, o frasco foi submetido à extração assistida por ultrassom (EAU) por 30 min. a temperatura ambiente e 60 Hz (Cristófoli Biossegurança, Brasil). Posteriormente, a suspensão foi centrifugada por 5 min a 3600 rpm (Excelsa II 206 BL, Fanem, Brasil). O sobrenadante resultante foi então coletado com uma pipeta de vidro e transferido para um balão volumétrico de 25 mL. O processo de extração por água MilliQ® era repetido mais uma vez com o pellet, sendo o sobrenadante adicionado àquele já presente no balão volumétrico, cujo volume era completado com água MilliQ®. Os fármacos foram extraídos da solução resultante e quantificados conforme item 8.2.3.

8.2.5 Bioatividade dos principais grupos microbianos

Testes metabólicos foram conduzidos de maneira similar à metodologia proposta por Zafiriadis et al. (2017) a fim de obter os parâmetros cinéticos: taxa de crescimento e de utilização de substrato pelas bactérias aeróbias (heterotróficas e autotróficas). A biocinética dos microrganismos aeróbios foi estimada de acordo com Chandran e Smets (2000) e Silva Filho et al. (2015).

Foi utilizado um respirômetro modelo Beluga S32c, do tipo aberto e semicontínuo, conectado a um computador e controlado pelo software Resp43, que media os valores de OD e temperatura, calculando a taxa de consumo de oxigênio (TCO) durante os ensaios. Realizaram-se testes em bateladas a fim de determinar os parâmetros microbianos, envolvendo fases anaeróbias ou anóxicas, de acordo com Corsino et al. (2018) e Zafiriadis et al. (2017).

Todos os testes respirométricos foram conduzidos a mesma temperatura, com um volume de 1 L de lodo, coletado no final da fase de aeração do ciclo operacional, a fim de garantir a endogenia e a mínima presença possível de nitrogênio e fósforo. Os grupos de microrganismos foram divididos em quatro grupos principais: organismos heterotróficos (OH), organismos desnitrificantes (via NO_2^- e NO_3^-), organismos acumuladores de fósforo com diferentes aceptores de elétrons (via O_2 , NO_2^- e NO_3^-) e organismos nitrificantes (BOA e

BON).

Os testes permitiram o cálculo de constantes e parâmetros biocinéticos dos lodos, dentre eles: a constante específica máxima de crescimento (μ_m) e a constante de meia saturação para os organismos heterotróficos e nitrificantes, a taxa de consumo média (TCM) para os organismos desnitrificantes e os parâmetros de liberação e absorção de fosfato para aqueles que removem fósforo.

A amostra de 1 L de licor misto era submetida a uma leve agitação com um agitador magnético e tinha aeração controlada pelo respirômetro Beluga a fim de que todo o substrato remanescente fosse consumido e se atingisse a TCO endógena. Quando esta era atingida, adicionava-se o substrato referente ao grupo de microrganismos que se pretendia analisar, sendo 10 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ (cloreto de amônio) para as BOA, 8 mg $\text{NO}_2^-\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ (nitrito de sódio) para as BON e 120 mg $\text{DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ (acetato de sódio) para as heterotróficas. Finalmente, após a adição dos substratos, eram registrados os valores de OD e TCO em intervalos de tempo definidos ao longo de todo o período de degradação destes, permitindo o cálculo das constantes cinéticas em questão.

Os testes de desnitrificação foram fundamentados em análises de DQO, nitrito e nitrato. Também se coletava 1 litro de lodo dos reatores ao fim do período de aeração, identificando, em seguida, a situação de respiração endógena com o auxílio do respirômetro, e colocando-o sob agitação leve. Para a obtenção das constantes referentes à desnitrificação endógena, adicionava-se somente o nitrito ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ou o nitrato ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Já para a desnitrificação exógena, adicionava-se, além destas, 500 mg $\text{DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ (acetato de sódio). As taxas de desnitrificação foram determinadas a partir da depleção das concentrações de nitrito, nitrato e matéria orgânica presentes ao longo do teste, as quais eram obtidas a cada 30 min., durante 3 h.

Já os testes de biodesfosfatação foram baseados em análises de DQO, nitrito, nitrato e fosfato. Coletava-se 1 L de lodo dos reatores e esperava-se que atingisse a TCO endógena, com o auxílio do respirômetro, quando eram adicionados 500 mg $\text{DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ na forma de acetato, deixando o lodo sob leve agitação. Então, a amostra de lodo era submetida a três situações diferentes:

- 1) Injeção de O_2 através do aerador conectado ao respirômetro, o qual era ligado e desligado quando atingia valores de OD mínimo e máximo de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, com o objetivo de analisar a atividade cinética dos OAF;

- 2) Adição de nitrito ($30 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$), a fim de serem obtidas as constantes cinéticas dos ODAF que utilizam nitrito como acceptor final de elétrons no processo de biodesfosfatação, além de realizarem desnitrificação.
- 3) Adição de nitrato ($30 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$), a fim de serem obtidas as constantes cinéticas dos ODAF que utilizam nitrato como acceptor final de elétrons no processo de biodesfosfatação, além de realizarem desnitrificação.

Em cada uma dessas três averiguações, determinavam-se as concentrações de ortofosfato, DQO, nitrito e nitrato a cada 30 min., durante 4 h, possibilitando, a partir desses valores, o cálculo das constantes cinéticas de cada grupo de microrganismos relacionados à remoção de fósforo.

Ressalta-se que os testes se iniciavam em ambiente anaeróbio com grande oferta de substrato, e, após a adição de cada oxidante, aguardava-se até haver um ambiente anaeróbio novamente, em que o fósforo armazenado anteriormente tenha sido liberado mais uma vez.

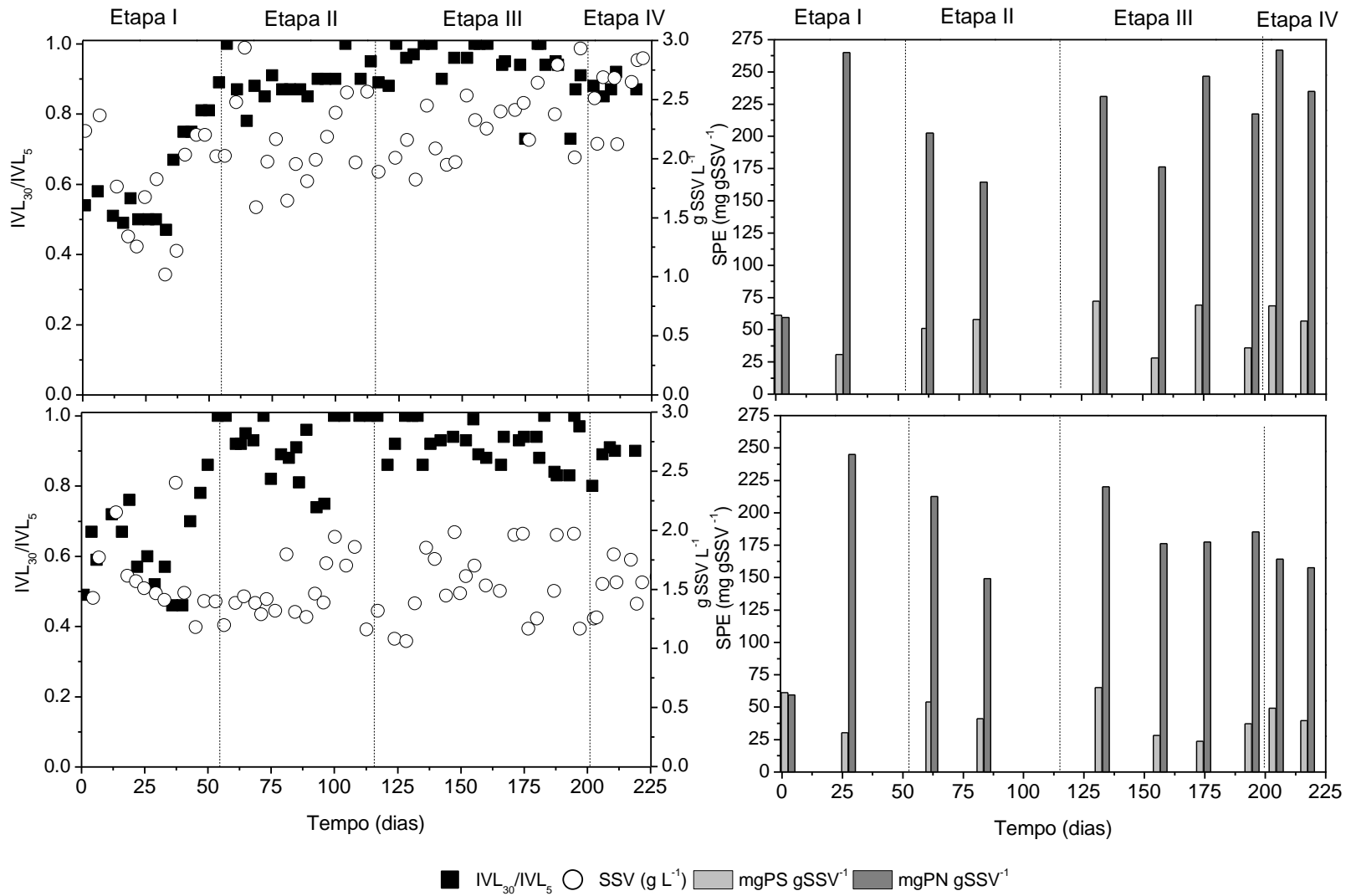
8.3 Resultados e discussão

8.3.1 Granulação

O aparecimento de grânulos aeróbios foi observado a partir do 30º dia de operação. Concomitantemente, os valores de IVL diminuíram, de modo que, no início da segunda etapa de operação, a razão IVL_5/IVL_{30} já estava em torno de 0,9 para ambos os reatores (Figura 8.1), marcando o atingimento da granulação (LIU; TAY, 2007). Após a granulação (Etapas II e III), o IVL_5 ficou entre 30 e 50 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ para ambos os reatores, o que condiz com o IVL_5 de 50 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ reportado por Kang et al. (2018b), trabalhando com um GSBR (*granular sludge batch reactor*) alimentado com 2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de SMX.

No mesmo período, a proporção de grânulos com diâmetro maior que 1mm se tornou, em média, maior que 90% em ambos os reatores. A retenção de biomassa foi maior no reator controle (1,75-3 $\text{g SSVLM} \cdot \text{L}^{-1}$ a partir da Etapa II) do que no reator adicionado de fármacos (1-2 $\text{g SSVLM} \cdot \text{L}^{-1}$ a partir da Etapa II). Os valores registrados são menores do que aqueles reportados por Kang et al. (2018b) e por Zhao et al. (2015) (GSBR adicionado de 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de SMX), os quais registraram retenção de biomassa próxima de 3 $\text{gSSVLM} \cdot \text{L}^{-1}$.

Figura 8.1– Evolução de sedimentabilidade do lodo, retenção de biomassa e matrix de SPE ao longo das etapas de operação.

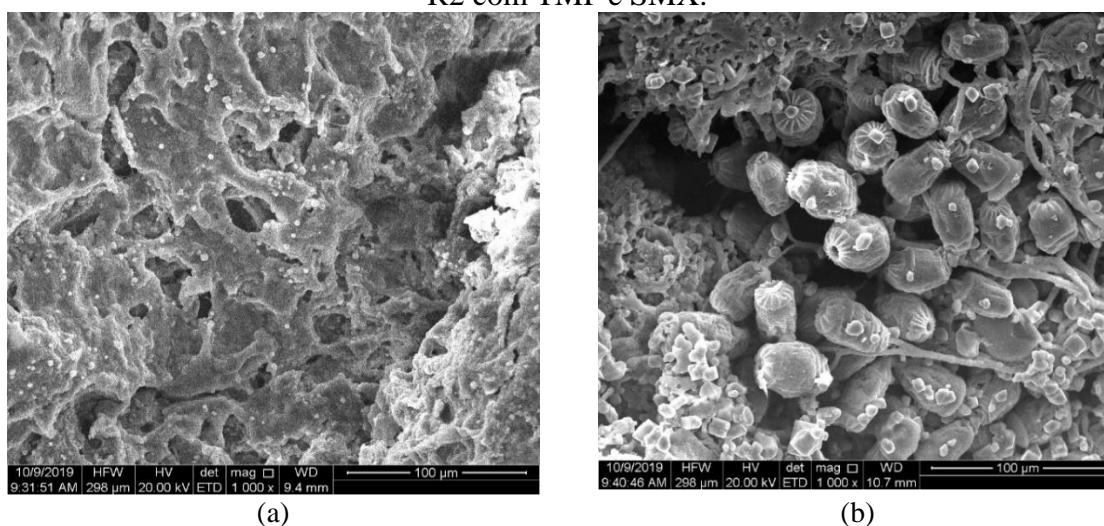


Durante a operação com AQDS (Etapa IV), os grânulos do R2 não apresentaram diferença na sedimentabilidade e na composição do SPE, quando comparado com a Etapa III (Figura 8.1). A relação IVL_{30}/IVL_5 permaneceu em torno de 0,9, com concentração de $1,5 \pm 0,3$ g SSVLM·L⁻¹.

Em relação aos valores de SPE, de forma geral, o reator controle apresentou valores superiores de PS e PN ao longo de todo o experimento, com impacto maior na produção de proteínas (Figura 8.1). Teoricamente, a adição de fármacos deveria estimular a produção de SPE, o qual funcionaria como uma barreira protetora contra os antibióticos (SHI et al., 2013). No entanto, foi observado na análise de MEV uma estrutura de grânulo bastante diferente da verificada no reator controle (Figura 8.2), com colônias bacterianas totalmente expostas, provavelmente decorrente da redução de SPE, estando em concordância com as verificações de Zhao et al. (2015). Outra análise também extraída da observação dos grânulos é que a pouca produção de SPE foi compensada pela colonização de outros microrganismos como protozoários do tipo *Vorticella* (Figura 8.2b)

As sulfonamidas e as diaminopirimidina, associação dos compostos utilizados no experimento, tem ação competitiva da enzima bacteriana de sintase de dihidroperato e diidrofolato-redutase, respectivamente, compostos fundamentais na síntese do ácido tetra-hidrofólico (folínico – vitamina B9), necessária para a síntese dos ácidos nucleicos e a formação do DNA bacteriano, que por consequência interferem na formação das proteínas (CALVO; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2009). Dessa forma, a ação dos antibióticos pode ter agido das seguintes formas: (i) impedindo o desenvolvimento de bactérias produtoras de SPE e/ou (ii) interferindo na produção de proteínas expelidas pelas bactérias do lodo.

Figura 8.2– Estrutura dos grânulos no 180º dia de operação (a) reator controle R1 e (b) reator R2 com TMP e SMX.



8.3.2 Remoção de carbono, nitrogênio e fósforo

A remoção média de carbono, expressa em termos de DQO, ficou acima de 90% durante todas as etapas de operação para ambos os reatores (Tabela 8.2). Esses resultados condizem com as remoções de DQO encontradas por Kang et al. (2018b), as quais ficaram acima de 95% tanto para o RBS de biomassa flocular, quanto para o RBS de biomassa granular, ambas expostas a $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SMX. Liu et al.(2019), trabalhando com GSBP alimentado com $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SMX também encontraram remoções de DQO superiores a 90%. Já em relação à remoção de nitrogênio, os autores reportam remoções em torno de 50% e 30%, respectivamente, as quais são bastante inferiores às verificadas no presente estudo (entre 60 e 80% para ambos os reatores).

Tabela 8.2– Remoção de DQO, nitrogênio e fósforo.

Reator		R1				R2				
Etapa		I	II	III	IV	I	II	III	IV	
DQO	Afl. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	578 (97)	602 (65)	571 (70)	581 (40)	565 (46)	532 (28)	569 (72)	589 (67)	
	Efl. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	53 (20)	28 (10)	42 (17)	46 (20)	28 (8)	31 (7)	38 (10)	46 (14)	
	Remoção (%)	91,5 (9,8)	95,5 (3,4)	92,7 (3,1)	93,6 (5,3)	94,2 (1,7)	94,3 (3,2)	93,4 (1,3)	92,2 (4,9)	
N	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ afl. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	64,9 (10,9)	54,9 (5,1)	50,1 (5,5)	55,7 (3,3)	53,6 (5,1)	50,5 (2,0)	50,6 (3,8)	57,1 (3,7)	
	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ efl. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	5,1 (2,2)	1,9 (0,5)	3,5 (1,5)	2,3 (0,8)	3,4 (1,8)	2,1 (0,6)	3,7 (1,7)	2,3 (0,9)	
	$\text{NO}_2^-\text{-N}$ efl. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	10,3 (4,5)	2,9 (1,5)	2,2 (0,7)	2,6 (1,0)	10,3 (6,8)	2,1 (0,9)	2,7 (1,3)	1,1 (0,3)	
	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ efl. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6, (2,6)	7,1 (1,6)	6,5 (1,4)	7,5 (1,4)	5,9 (2,0)	6,9 (1,3)	7,0 (1,4)	4,6 (0,5)	
	Remoção $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (%)	92,5 (6,4)	96,3 (1,1)	92,9 (3,1)	96,1 (1,3)	93,4 (5,3)	95,8 (1,0)	92 (3)	97,5 (3,0)	
	Remoção de N total (%)	68,3 (9,0)	77,9 (2,6)	75,4 (3,2)	77,6 (2,9)	64,0 (14)	77,8 (2,8)	73,6 (5,3)	88,0 (1,7)	
	P	$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ afl. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	7,5 (0,9)	7,7 (0,7)	7,4 (0,7)	7,5 (0,6)	7,7 (0,4)	7,5 (0,8)	7,4 (1,1)	7,7 (0,5)
		$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ efl. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	3,3 (0,7)	2,1 (0,4)	1,9 (0,4)	2,1 (0,3)	3,5 (1,1)	2,5 (0,3)	2,3 (0,5)	2,1 (0,4)
		Remoção (%)	55,0 (10,0)	71,9 (5,3)	73,1 (5,8)	70,0 (5,9)	53,4 (12,4)	66,5 (5,0)	69,6 (5,8)	73,6 (4,2)

Os desvios padrão estão entre parênteses.

A remoção de fósforo ficou entre 60 e 70%, sendo inferior àquela apresentada por Kang et al. (2018b) (em torno de 90% com relação P/DQO de 0,02) e superior àquela reportada por Liu et al.(2019) (em torno de 30% com relação P/DQO de 0,0175). A remoção

inferior desenvolvida por Liu et al. (2019) pode ser explicada pelo fato de que os autores não incluíram um período anaeróbio/anóxico na operação dos GSB. No entanto, Kang et al. (2018b) empregaram um ciclo bastante similar àquele utilizado no presente estudo: alimentação (15 min), período anaeróbio/anóxico (75 min), aeração (375 min. para grânulos e 349 min. para flocos), sedimentação (4 min. para grânulos e 30 min. para flocos), descarte (10 min.) e descanso (1 min.). Curiosamente, enquanto o presente estudo obteve alta remoção de nitrogênio e baixa remoção de fósforo, Kang et al. (2018b) obtiveram o resultado oposto. Isso parece indicar que esses dois processos competem entre si. De fato, em ambiente anóxico, os ODH e os OAF competem por substrato e, por razões cinéticas, ODH geralmente ganham a competição, atrapalhando, dessa forma, a remoção de fósforo (CHUANG; OUYANG; WANG, 1996).

Quando operado com AQDS (Etapa IV), as remoções médias de DQO e fósforo do R2 ficaram iguais às verificadas antes da adição do mediador redox (Tabela 8.2). Da Silva et al. (2012), avaliando o impacto do AQDS em processos de descoloração do corante azo *Reactive Red 2* (RR2) em sistemas anaeróbios (um estágio - UASB e de dois estágios – reator acidogênico seguido de UASB) relataram que a suplementação do mediador redox não afetou a remoção de DQO nos dois sistemas estudados. Como esse tipo de mediador não é consumido pelos microrganismos (CERVANTES; SANTOS, 2011; SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007; MOOK et al., 2013), os processos tendem a acontecer da mesma forma.

Contudo, observou-se um aumento tanto da remoção de nitrogênio amoniacal quanto de nitrogênio total (Tabela 8.2), este último indicando que o processo de desnitrificação foi melhorado. Li et al. (2013) observaram que a função biocatalisadora do organismo desnitrificantes *Paracoccus versutus* sp.GW1 era melhorada na presença de AQDS.

8.3.3 Remoção de TMP e SMX

8.3.3.1 Remoção de TMP e SMX na ausência de AQDS

As remoções de TMP e SMX são apresentadas a seguir tanto ao longo das etapas de operação (Figura 8.3) quanto ao longo de um ciclo de operação (Figura 8.4).

Com base na Figura 8.3, verifica-se uma baixa remoção de TMP no reator de granulação aeróbia, ficando em torno de 20% nas Etapas I e II, e aumentando suavemente sua remoção na Etapa III. Tal remoção parece acontecer durante o período anóxico, sem remoções

adicionais durante a fase aeróbia do RBS (Figura 8.4). Para o referido composto, não foram encontradas concentrações significativas no lodo (dados não apresentados).

A literatura reporta que maiores eficiências são alcançadas em condições anaeróbias, por exemplo, remoções de TMP superiores a 90% foram encontradas em reator UASB alimentado com 10 ng TMP·L⁻¹ (ALVARINO et al. 2014). Os autores atribuem esse elevado desempenho à estrutura química do TMP, já que os compostos heterocíclicos, como piridinas, uracilas ou furanos, resistem à degradação sob condições anaeróbias, exceto a pirimidina (ADRIAN; SUFLITA, 1994). Assim, a presença de uma pirimidina substituída com o grupo amima poderia explicar a biotransformação do TMP nessas condições. Jewell et al. (2016), trabalhando com reator RBS (ciclo de 1 h em condição anóxica seguida de 2 h em condição aeróbia) com lodo aeróbio flocular alimentado com esgoto real, cuja concentração de TMP se situava entre 20 e 225 ng·L⁻¹, encontraram remoções superiores a 83%. No entanto, não está claro por que a remoção obtida no presente experimento foi tão inferior se o período anóxico empregado (1 h 30 min.) foi superior ao do referido trabalho. No entanto, para esses estudos as concentrações utilizadas são muito menores que as estudadas neste experimento.

Figura 8.3– Remoção de TMP e SMX ao longo das etapas de operação.

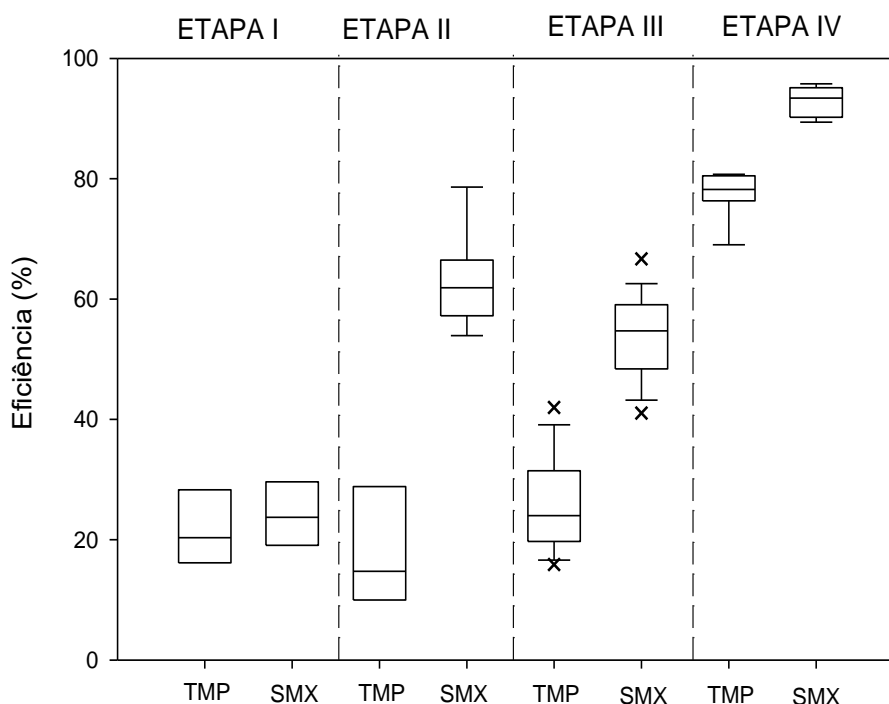
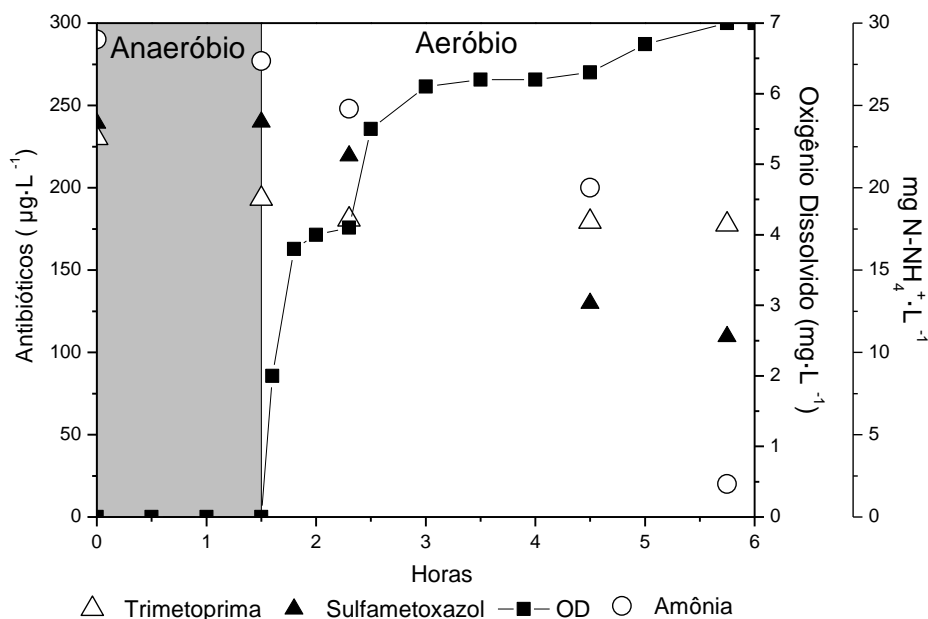


Figura 8.4 – Acompanhamento de um ciclo de operação - Etapa III (190º dia de operação).



Outra possibilidade é que a fonte de carbono utilizada possa influenciar na remoção de fármacos. Mery-Araya et al. (2019) realizaram testes com o lodo granular proveniente de RBS cultivados com acetato ou glicerol, com DQO de $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, e registraram que, a uma concentração de TMP de $750 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, a biomassa cultivada com acetato removeu menos TMP (12%) do que aquela cultivada com glicerol (16%) na presença dos substratos. Segundo os autores, fontes de carbono mais complexas gerariam comunidades mais diversas, as quais teriam maior capacidade de degradar poluentes. Apesar da diferença ter sido relativamente pequena para a TMP, houve um aumento de 73% para o ibuprofeno e 86% para o naproxeno, quando comparado acetato e glicerol, respectivamente. Tendo em vista que Jewell et al. (2016) operaram um reator alimentado com esgoto real, contendo fontes mais complexas que o acetato (empregado no presente estudo), esse fator pode ter contribuído para a diferença de remoção entre os estudos.

A relação TMP/biomassa empregada também poderia ter motivado a baixa remoção de TMP. Jewell et al. (2016) expuseram diferentes diluições (1:1 e 1:20) de lodo flocular cultivado em RBS a diferentes concentrações de TMP (5 ou $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Eles perceberam que o aumento da razão TMP/biomassa, tanto pelo aumento da concentração inicial de TMP, quanto pela diluição do lodo, diminuía a constante de velocidade da remoção biológica de TMP. Porém, não foi fornecida a concentração inicial de sólidos utilizadas nas diluições. Contudo, a não detecção no lodo sugere que a remoção do antibiótico

está relacionada a sua biotransformação embora a remoção de TMP tenha sido baixa.

Para o composto SMX, durante a Etapa I, verifica-se que as eficiências de remoção foram bem próximas às alcançadas com o TMP (cerca de 20%), mas aumentando para valores próximos a 60% nas Etapas II e III (Figura 8.3). No perfil do ciclo, verifica-se que a remoção ocorreu grandemente na fase aeróbia do RBS (Figura 8.4). Esse resultado condiz com a remoção entre 60 e 72% reportada por Zhao et al. (2015), que trabalharam com RBS e $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SMX. No entanto, ela é bem menor do que aquela encontrada em RBS para cultivo de biomassa flocular com elevada concentração de BOA, em que se obteve uma remoção em torno de 98% para concentrações de SMX de 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (KASSOTAKI et al., 2016).

Em relação à remoção aeróbia de SMX, Kassotaki et al. (2016) realizaram uma série de experimentos com biomassa flocular rica em BOA e concluíram que a remoção de SMX estava claramente relacionada à taxa de oxidação da amônia pelo lodo. Segundo os autores, se essa taxa se encontrasse entre $0-0,4 \text{ mg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, a remoção observada seria limitada (16-33%); se a taxa ficasse entre $0,5-1,3 \text{ mg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, a remoção seria moderada (53-83%); e, se ficasse entre $1,6-2,1 \text{ mg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, a remoção seria alta (79-91%).

Tendo em vista que as remoções de amônia observadas no presente estudo ficaram acima de 90%, é possível assumir seguramente que o lodo cultivado era rico em BOA, de modo similar àquele estudado por Kassotaki et al. (2016). No entanto, pela análise da Figura 8.4, o efeito observado parece ser oposto ao descrito pelos autores.

Entre o início da aeração (1,5h) e a hora 4,5, a remoção de amônia é praticamente nula, muito provavelmente devido à competição por oxigênio entre as BOA e os OHO (organismos heterotróficos ordinários), e a concentração de amônia cai de $27,2$ para $20 \text{ mg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$. A taxa de oxidação de amônia nesse período é de aproximadamente $0,05 \text{ mg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, o que seria compatível com uma remoção limitada de SMX (16-33%). No entanto, a remoção de SMX é alta, de modo que cerca de 46% do fármaco é removido durante esse período. Em seguida, após a diminuição da DQO, a atividade dos OHO cai, enquanto a atividade das BOA aumenta. Durante esse período, a concentração de amônia cai de 20 para $2 \text{ mg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$, e a taxa de oxidação de amônia é de $0,54 \text{ mg NH}_4^+-\text{N}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Esse valor seria condizente com uma remoção moderada (53-83%), mas a remoção de SMX observada no período é baixa, com 9% de remoção.

Kassotaki et al. (2016) também realizaram testes com a adição de acetato ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e perceberam que, na presença e na ausência de amônia, a remoção de SMX foi de 54%

e 48%, respectivamente. Isso parece indicar que, na presença de acetato, os OHO também seriam capazes de degradar SMX. A remoção mais alta ocorrida no presente estudo, entre as horas 1,5 e 4,5 do ciclo, corrobora essa hipótese.

Foi detectado que na amostra de lodo analisada (coletada na Etapa III), havia uma presença considerável de SMX no lodo. Apesar da notória biotransformação durante o ciclo, quando calculada a remoção global em termos de massa, cerca de 70% da SMX removida pelo LGA era relacionada à adsorção proveniente ao descarte de lodo imposto pela alta pressão de seleção decorrente da operação do RBS.

8.3.3.2 Remoção de TMP e SMX na presença de AQDS

A Figura 8.3 mostra que as remoções de TMP e SMX aumentaram durante a Etapa IV, chegando a 75% para TMP e 95% para SMX, indicando que o AQDS auxiliou na biotransformação dos compostos estudados. A propriedade do AQDS em facilitar ou possibilitar biotransformações em águas residuárias é decorrente de suas propriedades catalíticas (pela presença de quinonas em sua estrutura molecular) tanto de aumentar o transporte de elétrons (mediador redox) quanto em ser o acceptor final de elétrons (LI et al., 2013; MENG et al., 2018; ZHOU et al., 2018). Provavelmente, na presente pesquisa, o AQDS atuou como mediador redox, facilitando a transferência de elétrons dos processos cometabólicos envolvidos na biotransformação dos antibióticos, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias/anóxicas.

A dificuldade de remover os antibióticos por LGA, principalmente TMP, poderia estar relacionada ao tipo de biomassa desenvolvida e os principais grupos microbiológicos. Adicionalmente, Alvarino et al. (2014) sugerem que a remoção de TMP poderia estar relacionada a biotransformação em ambiente anaeróbia/anóxica. Nesse sentido, os grânulos aeróbios, por serem bastante compactos e apresentarem populações anaeróbias/anóxicas cuja diversidade e localização variam usualmente conforme o tipo de substrato e tamanho do grânulo desenvolvido (NANCHARAI AH; KIRAN KUMAR REDDY, 2018), era provável que esse entrave tivesse relação com a penetração do composto até as camadas mais internas dos grânulos, onde ocorreria sua biotransformação, estando assim relacionado ao metabolismo desses microrganismos. No entanto, as elevadas remoções obtidas na presença do AQDS indicaram que possivelmente o principal problema da remoção dos antibióticos era a dificuldade de ativação da reação de oxidação dos compostos associado a um co-substrato e não de transferência de massa.

Alguns estudos já observaram que os antibióticos pode ser cometabolizados, e esse tipo de evidência reforça a hipótese levantada no presente trabalho. Feng et al.(2019) explorando os efeitos de fontes externas de carbono na degradação cometabólica de ciprofloxacina por lodo de esterco animal, e foi observado que a suplementação com co-substrato estimulou o crescimento celular de microrganismos degradantes de poluentes e resultou em rápida degradação do antibiótico estudado. A mesma tendência já foi observada para a degradação de SMX. Müller et al. (2013) observaram que, em condições aeróbias e mesofílicas no escuro com dosagem semicontínua de SMX, a biomassa de um sistema de lodo ativado foi capaz de utilizar o SMX como fonte de carbono e/ou nitrogênio. No entanto, a biodegradação do SMX foi aprimorada quando um suprimento de energia prontamente degradável (acetato) foi fornecido, o que promoveu a atividade metabólica.

8.3.4 Metabolismo bacteriano

Os valores médios das constantes específicas máximas de crescimento (μ_m) das bactérias heterotróficas em R1 e R2 foram iguais a 1,2 e 0,9 d⁻¹, respectivamente. Tais resultados permitem inferir que a produção de lodo foi um pouco menor no reator com a adição dos fármacos (R2), sugerindo que a presença destes interfere negativamente na reprodução desses microrganismos, enfatizando, assim, os dados de SSV comentados anteriormente e a ideia de aumento da fragilidade dos grânulos formulada por Zhao et al. (2015).

Os valores obtidos para tal estudo foram de acordo com os encontrados na literatura, visto que, para lodos granulares, Liu et al. (2016) obtiveram valores entre 0,5 e 1,5 d⁻¹, e Rollemberg et al. (2019b) obtiveram 0,9 d⁻¹, enquanto, para lodos ativados convencionais, Barros (2014) encontrou μ_m entre 2,2 e 3,7 d⁻¹, e Metcalf e Eddy (2003) indicam um valor dessa constante variando entre 1,5 e 5,0 d⁻¹.

Com relação aos organismos nitrificantes, os valores médios das constantes cinéticas encontram-se na Tabela 8.3. Pode-se perceber que os valores da constante específica máxima de crescimento (μ_m) foram bem próximos, não se podendo afirmar que a presença de fármacos prejudicou o crescimento dos organismos nitrificantes. Os valores encontrados estão de acordo com a literatura específica de LGA, entre 0,1 e 0,3 d⁻¹ para BOA e entre 0,2 e 0,3 d⁻¹ para BON (Rollemberg et al., 2019b; Fang et al., 2009).

Comparando com o efeito dos fármacos nos organismos heterotróficos, verifica-se um comportamento inesperado, já que os organismos nitrificantes são normalmente mais

sensíveis quando expostos a compostos tóxicos. Uma possibilidade seja de que os organismos nitrificantes se localizem um pouco mais internamente ao grânulo, sendo os heterotróficos aeróbios localizados na parte mais externa e, conseqüentemente, mais expostos aos fármacos.

Tabela 8.3– Valores das constantes cinéticas das bactérias nitrificantes para os reatores LGA R1 (controle) e R2 (fármacos).

Reator	Grupo de bactéria	μ_m (d ⁻¹)
R1	BOA	0,5
	BON	0,1
R2	BOA	0,4
	BON	0,2

Ao comparar os valores dessa constante entre os dois grupos de bactérias nitrificantes, nota-se que as BOA possuem crescimento de 5 e 2 vezes mais rápido que as BON, permitindo inferir que há uma tendência de acúmulo de nitrito no reator (XAVIER, 2017), já que teoricamente há uma alta taxa de conversão de amônia a nitrito, e baixa taxa de conversão deste a nitrato, principalmente no reator controle, em que a diferença de crescimento é maior. Entretanto, mesmo com essa limitação de BON, os valores de eficiência de nitrificação mantiveram-se altos (entre 92% e 96,3%) durante toda a operação, provavelmente porque o período aeróbio do ciclo é suficientemente grande para promover toda a conversão de NO₂⁻ a NO₃⁻.

Com relação aos organismos desnitrificantes, os valores das taxas de consumo médias de nitrogênio (mg N·g SSV⁻¹·h⁻¹) da desnitrificação endógena e exógena, tanto via nitrito quanto via nitrato são apresentados na Tabela 8.4.

Tabela 8.4– Taxas de consumo médias (mg N·g SSV⁻¹·h⁻¹) no processo de desnitrificação para os reatores LGA R1 (controle) e R2 (fármacos).

Reator	Aceptor	Condição	
		Endógena	Exógena
R1	NO ₂ ⁻	7,1	37,5
	NO ₃ ⁻	3,9	50,2
R2	NO ₂ ⁻	11,8	90,7
	NO ₃ ⁻	6,0	106,2

Observa-se, primeiramente, que, como esperado, todas as taxas de consumo médias sob a condição exógena, ou seja, utilizando a matéria orgânica extracelular (acetato) como doador de elétrons, foram consideravelmente maiores que a endógena. No geral, os valores da taxa de consumo para a desnitrificação endógena foram menores que os obtidos por Rollemberg et al. (2019b) quando estes utilizaram LGA, porém maiores quando

utilizaram LAC, principalmente via nitrito, possivelmente por causa da maior quantidade de SPE presente no lodo granular aeróbio, o qual passa a ser utilizado como fonte de carbono na ausência de acetato.

Também pode ser observado que, comparando-se uma mesma situação em reatores diferentes, as taxas de consumo médias foram sempre maiores em R2, levantando uma hipótese de que, por terem menos SPE e apresentarem os microrganismos mais expostos, conforme mostra a Figura 8.2b, os grânulos deste reator permitiam uma melhor penetração do substrato, fazendo com que os organismos desnitrificantes o consumissem mais rapidamente que os de R1, os quais apresentaram grânulos mais compactos e, conseqüentemente, uma difusão mais dificultada. No entanto, tal aumento na rapidez das reações aparentemente não interferiu no resultado final, visto que as eficiências de remoção de nitrogênio foram semelhantes nos dois reatores.

Rolleberg et al. (2019b) obtiveram na desnitrificação exógena para o LGA, valores de 36,5 mg $\text{NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e 57 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, percebendo-se uma grande semelhança com os dados obtidos nesse trabalho em R1. Já em relação à desnitrificação endógena do R1, o valor médio foi similar para a desnitrificação via nitrito (8,0 mg $\text{NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), mas bastante acima para a desnitrificação via nitrato (12,5 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Por fim, com relação aos testes metabólicos de fósforo, foram analisados os parâmetros de liberação e absorção de fosfato pelos OAF (Figura 8.6), ODAF via nitrato (Figura 8.7) e ODAF via nitrato (Figura 8.8). No reator R1, as taxas de liberação variaram de 2 a 5 mg $\text{PO}_4^{3-} \cdot \text{P} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto, em R2, variaram de 1 a 3 mg $\text{PO}_4^{3-} \cdot \text{P} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Portanto, pode-se afirmar que, no geral, houve maiores taxas de liberação de fosfato no reator sem a presença de TMP e SMX, levando a crer que estes, de certa forma, inibem a ação dos organismos responsáveis pela liberação/acumulação de fósforo. Rolleberg et al. (2019b) reportam um valor de aproximadamente 6,2 mg $\text{PO}_4^{3-} \cdot \text{P} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a partir de um ensaio respirométrico com LGA, valor este bem superior aos obtidos com a biomassa dos dois reatores do presente experimento.

Os dados referentes à absorção de fosfato pelos microrganismos responsáveis pela remoção de fósforo encontram-se na Tabela 8.5.

Tabela 8.5 – Valores de absorção de fosfato ($\text{mg PO}_4^{3-}\text{-P}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) dos OAF e ODAF para os reatores LGA R1 (controle) e R2 (fármacos).

Reator	Grupo de Microrganismos		
	OAF	ODAF (via NO_3^-)	ODAF (via NO_2^-)
R1	4,5	2,4	2,1
R2	4,9	1,2	1,2

Pode-se perceber que a absorção dos OAF é consideravelmente maior que dos ODAF, provavelmente em decorrência da maior quantidade do primeiro grupo no lodo dos sistemas em comparação ao segundo. Não houve diferenças marcantes nas absorções de OAF entre R1 e R2, porém, com relação aos ODAF, notou-se uma diminuição desse valor em torno de 2 vezes, no reator com a presença dos antibióticos. Tais resultados provavelmente ocorreram devido aos ODAF serem mais sensíveis aos poluentes, os quais novamente parecem ter afetado negativamente um grupo específico de microrganismos.

Nota-se, pela inclinação dos gráficos de concentração de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, que, após a introdução do acceptor de elétrons (O_2 para os OAF, e NO_3^- ou NO_2^- para os ODAF), a diminuição da concentração de fosfato foi mais acentuada em R1 que em R2, para as três situações (Figuras 8.5, 8.6 e 8.7). Tal observação confirma os dados apresentados na Tabela 8.6, que indica uma maior absorção por parte dos ODAF presentes no R1, enquanto os OAF mantiveram valores similares nos dois reatores. Entretanto, ressalta-se que todos os microrganismos em questão atingiram um patamar de concentração de fosfato semelhante ao final de cada teste, em torno de $5 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}$.

Essa situação também pode ser explicada pelo fato de as concentrações do íon fosfato, nas condições anaeróbias, terem atingido patamares mais altos em R1 que em R2, logo após a introdução do acceptor de elétrons. Nos pontos referentes aos 120 min. de teste, observa-se que no R1 a concentração de fosfato esteve sempre acima de $11 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto no R2 esteve sempre abaixo de $10 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}$. Com isso, também podem ser confirmados os dados obtidos de liberação, que indicam uma faixa de valores maior no reator controle R1, justificando essa queda mais acentuada da concentração de PO_4^{3-} após a introdução dos aceptores.

Por fim, comparando-se somente o comportamento dos ODAF, percebe-se que a velocidade de consumo de nitrito e nitrato como aceptores de elétrons é menor no R2, principalmente nos minutos finais dos testes respirométricos. Ressalta-se que, apesar disso, as taxas de desnitrificação ainda são maiores no R2, possivelmente por causa dos outros microrganismos desnitrificantes, como ODAG e ODH. Observa-se, também, que, entre esses dois processos, o consumo de nitrito é ainda mais lento em R1 e similar em R2, fato que pode ser confirmado pela Tabela 8.6.

Figura 8.5–Perfil de liberação e assimilação de P pelos OAF para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).

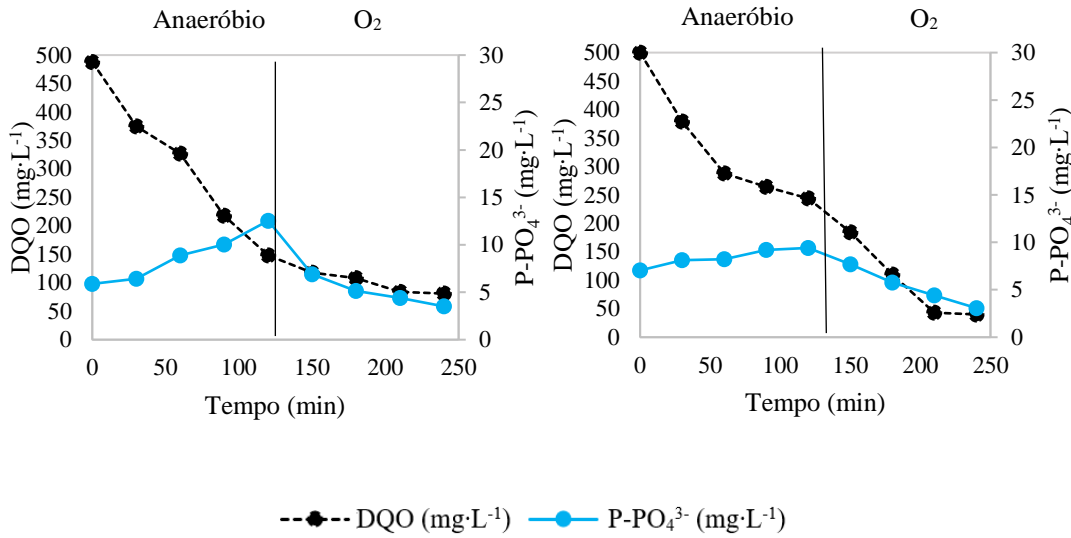


Figura 8.6 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos ODAF – via nitrato para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).

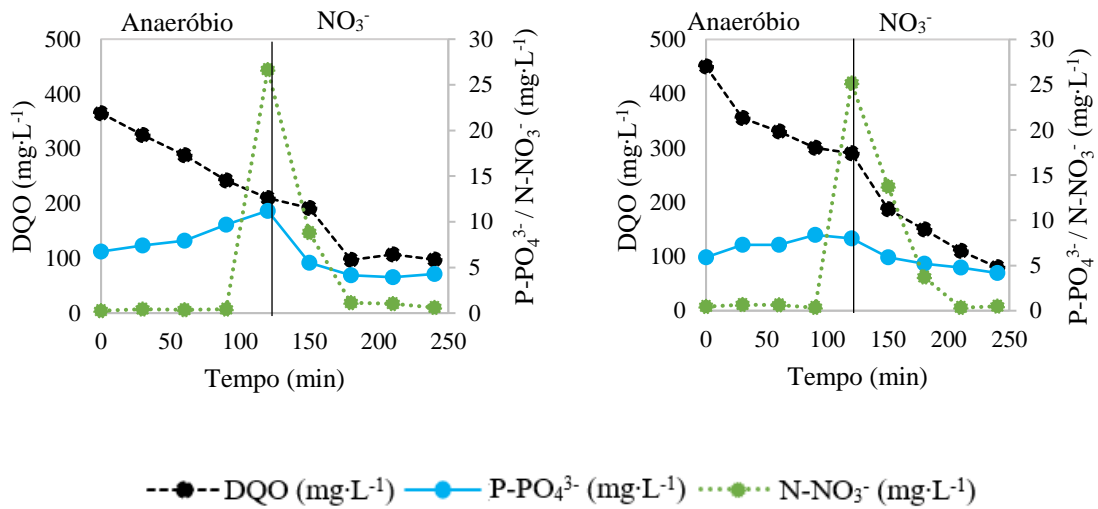
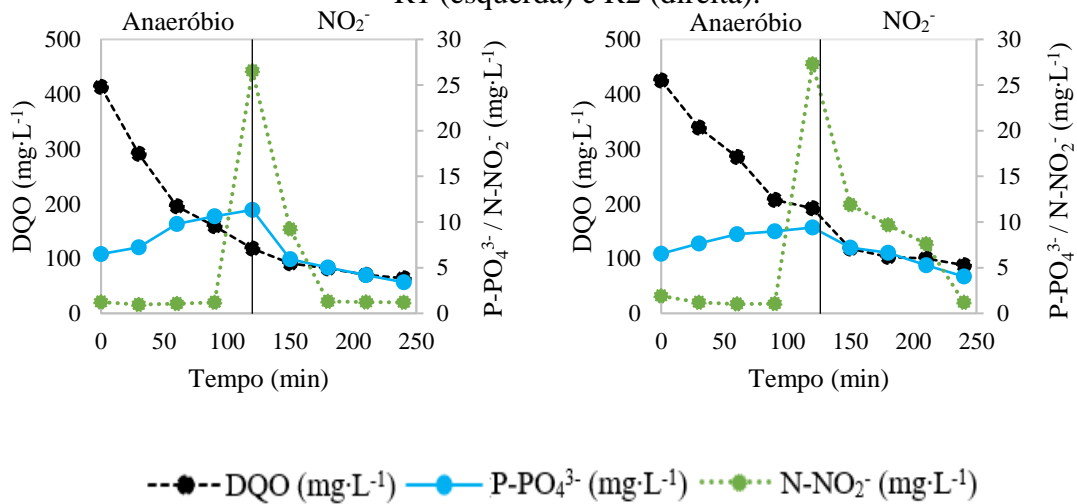


Figura 8.7 – Perfil de liberação e assimilação de P pelos ODAF – via nitrito para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).



8.3.5 Dinâmica populacional microbiana

O processo de granulação proporcionou uma mudança muito expressiva nas populações (Figura 8.8a). No lodo de inóculo, existia uma distribuição de vários filos, como bactérias Proteobacteria (41%) Actinobacteria (22%), Planctomycetes (19%), Firmicutes (7%), Chloroflexi (4 %) e arqueias Thaumarchaeota (3%). Percebe-se um crescimento do grupo Proteobacteria nos dois reatores, com valores de 61% e 69% em R1 e R2, respectivamente. O filo Proteobacteria apresenta uma diversidade de metabolismo muito importante para a granulação, como produtores de SPE, BOA, BON, ODH, OAF, ODAF, OAG e ODAG. Alguns estudos com micropoluentes emergentes também identificaram a predominância desse filo (KANG et al., 2018b; ZHAO et al., 2015b).

Verifica-se também um crescimento expressivo das bactérias do filo Bacteroidetes, saindo de uma baixíssima abundância relativa para cerca de 16% em ambos os reatores. Estas são geralmente bactérias gram-negativas fermentativas, responsáveis pela degradação de polissacarídeos (BIRG; RITZ; LIN, 2019). Por outro lado, houve uma diminuição da presença de Planctomycetes, atingindo valores de 11% e 6%, para os reatores R1 e R2, respectivamente. Apesar de essas bactérias não serem reportadas com frequência nos estudos de granulação aeróbia, elas possuem formato ovoide (JESKE et al., 2015), morfologia esta típica de organismos favorecidas no processo de formação de LGA.

Os resultados a nível de família mostram que a permanência das Rhodocyclaceae e Xanthomonadaceae após a granulação indica que estes possivelmente são os principais responsáveis pela produção de SPE, pois vários trabalhos reportaram essa função em lodo granular (MERY-ARAYA et al., 2019; SZABÓ et al., 2017; WEISSBRODT et al., 2013). Quanto à resistência à exposição de TMP e SMX, as duas famílias aparecem em maior percentual no reator com antibióticos (5,5% e 2,2%, respectivamente), enquanto no reator controle foi de 3,2% e 1,3% (Figura 8.9b).

A Figura 8.9 apresenta a dinâmica populacional entre os reatores e o lodo de inóculo a nível de gênero. Por similaridade, o lodo do R2 se assemelha mais com o lodo de inóculo que o lodo do reator controle R1, mostrando que a presença dos antibióticos inibiu ou favoreceu alguns gêneros durante a formação dos grânulos, possivelmente proporcionado pela ação bactericida. Foi observado que o uso de acetato como fonte de carbono proporcionou uma seleção que favoreceu a predominância de gêneros como *Defluviicoccus*, *Candidatus Competibacter* e *Amaricoccus* com afinidade a substratos de cadeia curta. Entretanto, esses grupos são conhecidos por assimilarem matéria orgânica solúvel em ambiente anaeróbio

(BLACKALL et al., 1998; WONG et al., 2004) e competirem diretamente por substrato com os OAF, o que pode justificar a remoção incompleta de fósforo (seção 8.3.2). Os principais microrganismos responsáveis pela biodesfosfatação pertenciam ao gênero *Acinetobacter* (TANDOI et al., 1998), apresentando percentuais de 4% no R1 e 5% no R2.

As nitrificantes, *Nitrosomonas* (BOA) e *CandidatusNitrotoga* (BON), foram favorecidas pela granulação. No lodo de inóculo foram encontrados percentuais < 0,1% dos dois gêneros. Entretanto, foi observado maior abundância no lodo exposto a TMP e SMX, 2,8% de BOA e 18% de BON, ao passo que no lodo do reator controle R1 as concentrações eram de 1,5% de BOA e 0,7 % de BON. Para o processo de granulação, o favorecimento desses grupos já é muito reportado pela literatura (KONG et al., 2017; LIANG et al., 2015; ROSMAN et al., 2013). Quanto à presença dos antibióticos, a relação entre a atividade dos grupos que removem nitrogênio, TMP e SMX, já foi reportado por vários trabalhos (EICHHORN et al., 2005; KANG et al., 2018a; KASSOTAKI et al., 2016). Essa relação está diretamente ligada à ação inespecífica da enzima mono-oxigenase de degradar uma grande variedade de produtos químicos orgânicos por biodegradação cometabólica, como hidrocarbonetos, metano, alcenos, hidrocarbonetos halogenados e aromáticos (NSENGA KUMWIMBA; MENG, 2019).

No entanto, a diferença observada neste estudo, em que o grupo BON apresentou maior abundância que BOA, pode estar relacionado às atividades metabólicas. De acordo com os testes que revelaram a taxa de crescimento dos grupos nitrificantes, é observado um crescimento um pouco maior para as BON do lodo exposto aos antibióticos (Tabela 8.4). Uma possibilidade que também não pode ser descartada é de que como os heterotróficos aeróbios foram mais afetados do que os nitrificantes (item 8.3.4), possivelmente porque eram mais expostos aos fármacos, houve menos consumo de oxigênio e, conseqüentemente, havia mais oxigênio disponível para as nitrificantes que se localizavam um pouco mais internamente no LGA do reator R2.

Essa relação também pode ser identificada para os principais microrganismos desnitrificantes. Os gêneros mais abundantes foram *Thauera*, *Zoogloea* e *Pseudomonas* com valores inferiores a 0,1% no inóculo e chegaram a 3,3%, 0,5% e 0,3% no reator controle R1 e 5,3%, 1,0% e 1,7% no R2, respectivamente. Assim como as taxas de desnitrificação, as abundâncias também foram maiores no R2. Cabe ressaltar que as *Pseudomonas* já foram reportadas como consumidoras de SMX (HERZOG et al., 2013), porém o seu aumento na abundância não pode ser relacionado exclusivamente a sua degradação pois foram encontrados grupos com metabolismo similar e abundância superior no lodo do reator com

antibióticos.

Figura 8.8 – Diversidade dos microrganismos por filo (a) e família (b) do inóculo e dos reatores R1 e R2.

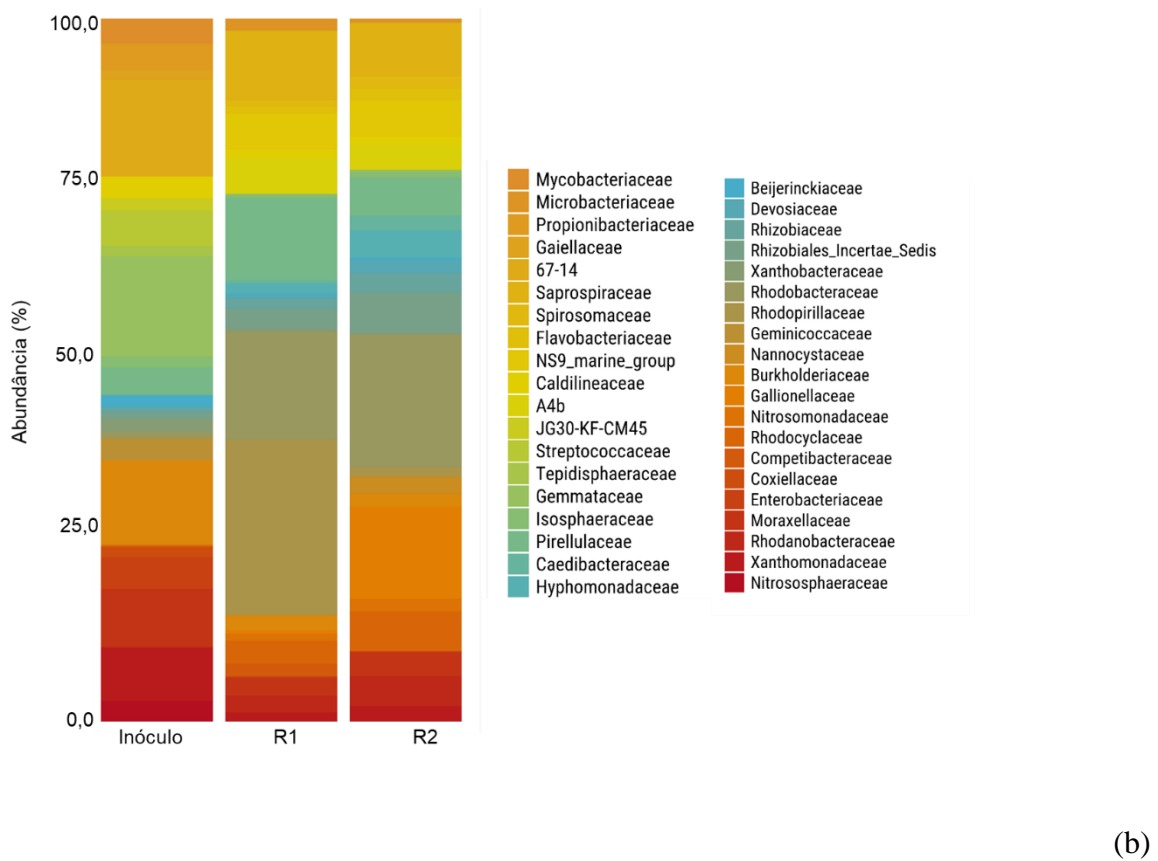
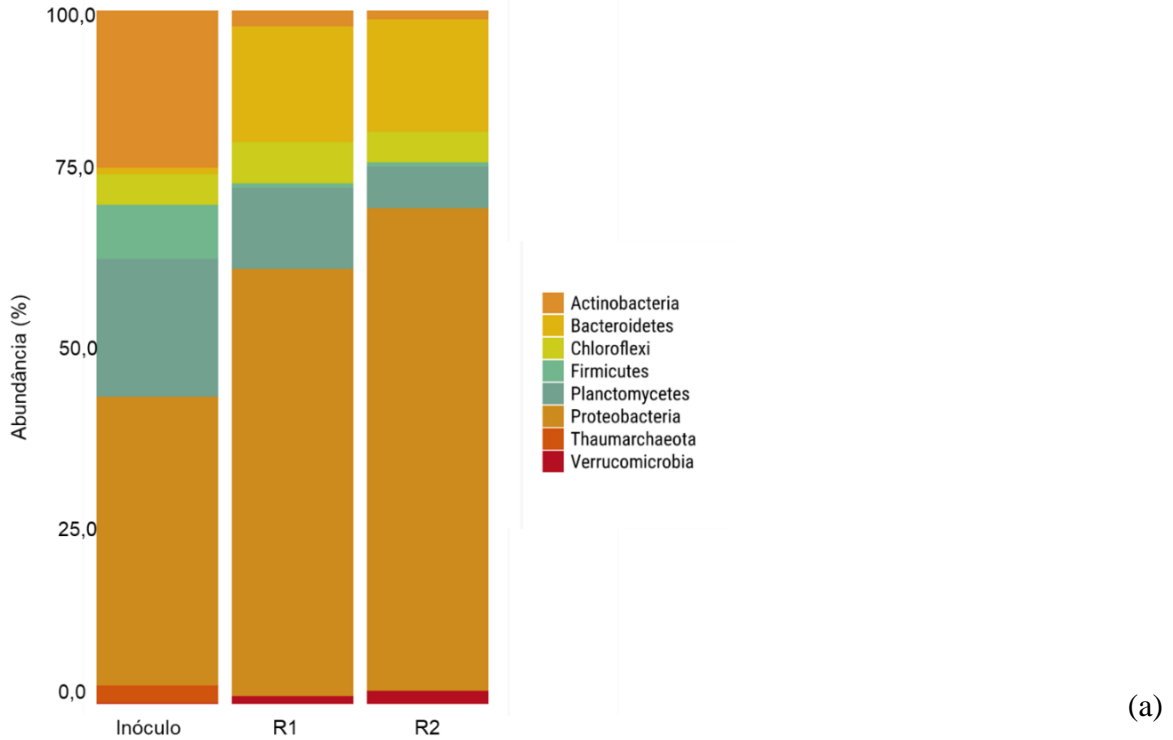
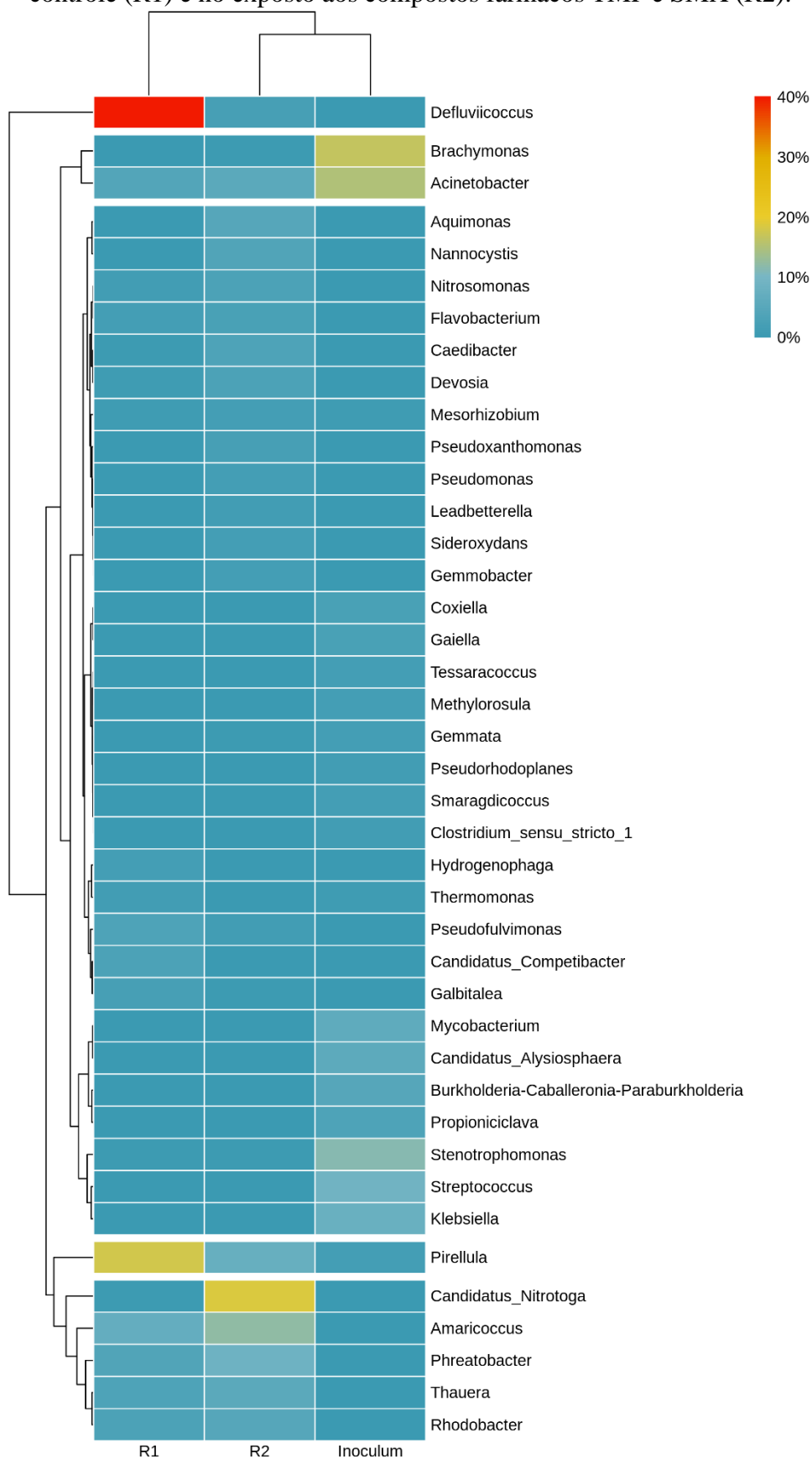


Figura 8.9– Distribuição da microbiologia a nível de gênero (abundância >1%) nos reatores controle (R1) e no exposto aos compostos fármacos TMP e SMX (R2).



8.4 Conclusão

O LGA produzido na presença de altas doses de TMP e SMX ($200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cada) apresentou boa sedimentabilidade, porém sua integridade estrutural ficou prejudicada, interferindo na quantidade de lodo no reator. A capacidade de remover C, N e P foi semelhante àquela desenvolvida no reator controle. No entanto, não foram observadas remoções elevadas de TMP (~30%) e SMX (~60%) quando comparadas a sistemas anaeróbios ou aeróbios de biomassa flocular. Foram encontradas concentrações significativas apenas de SMX no lodo. Quando o sistema foi suplementado com AQDS, foi observado aumento nos valores de remoção dos antibióticos TMP (~75%) e SMX (~95%), possivelmente pela ação catalítica do mediador redox em processos cometabólicos.

Os ensaios respirométricos relevaram que a presença dos fármacos impactou negativamente a atividade dos organismos heterotróficos e envolvidos na remoção do fósforo, mas impactaram positivamente a atividade dos organismos nitrificantes e desnitrificantes.

Percebe-se um crescimento do grupo Proteobacteria e Bacteroidetes nos dois reatores, e diminuição do grupo Planctomycetes. Verificou-se que o lodo exposto aos antibióticos se assemelha mais com o lodo de inóculo que o lodo do reator controle R1, mostrando que a presença dos mesmos inibiu ou favoreceu alguns gêneros durante a formação dos grânulos, possivelmente proporcionado pela ação bactericida. Entre estes, verificou-se que as nitrificantes, *Nitrosomonas* (BOA) e *CandidatusNitrotoga* (BON), foram favorecidas pela granulação e tiveram a abundância relativa muito maior do reator R2 do que no R1.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O lodo granular aeróbio (LGA) vem se configurando como uma tecnologia emergente promissora para a remoção simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de cátions divalentes e micropoluentes emergentes (fármacos e parabenos) na formação, remoção, microbiologia e estabilidade operacional de sistemas de LGA. Dessa forma, como principais conclusões e recomendações para trabalhos futuros, podem ser destacados os seguintes aspectos:

- O uso de RBS com alimentação/descarte simultâneos foi capaz de formar grânulos mesmo operado em baixa velocidade ascensional. O uso de cálcio para esse tipo de reator ajuda na sedimentabilidade dos grânulos, porém não se mostrou marcante no tempo de granulação. A adição de cálcio se mostrou mais impactante na formação e estabilidade operacional de RBS convencional, onde as pressões de seleção são mais elevadas, que acabam por estimular mais a produção de SPE.
- A cinza de carvão mineral não foi um bom elemento agregador do LGA devido a uma única dosagem no sistema e incapacidade de imobilização no RBS, que apesar da baixa pressão de seleção, resultou na saída desta com o efluente, mesmo em poucos dias de operação. Com isso, sugere-se um estudo mais aprofundado sobre essa alternativa com dosagens contínuas.
- A presença de micropoluentes emergentes (como antibióticos e parabenos) interfere na formação e estabilidade dos grânulos, especialmente da produção de SPE, morfologia do grânulo, maior exposição da biomassa a eventuais agentes tóxicos e concentração de biomassa dentro do sistema.
- Foram obtidas elevadas remoções de parabenos em sistemas LGA. Contudo, alguns antibióticos são mais resistentes à degradação em LGA, como é o caso da trimetoprima, e alguns ajustes podem ser usados para facilitar a remoção desses compostos por LGA. Um deles é aumentar o tempo anaeróbio do ciclo A/O (anaeróbio e aeróbio) para intensificar a formação de SPE, para removê-lo por adsorção, e favorecer reações redutivas que facilitam a remoção desse composto. Outras investigações ainda podem ser realizadas, como avaliar outras configurações de ciclo, como A/O/A(anaeróbio, aeróbio e anóxico), assim como com outros tipos de substratos que facilitem as reações cometabólicas desse composto.

REFERÊNCIAS

- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10006**: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos, 2004.
- AB HALIM, M. H. et al. Aerobic sludge granulation at high temperatures for domestic wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 445–449, 2015.
- AB HALIM, M. H. et al. Influence of high temperature on the performance of aerobic granular sludge in biological treatment of wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 184, p. 271–280, 2016.
- ADAV, S. S. et al. Degradation of phenol by Acinetobacter strain isolated from aerobic granules. **Chemosphere**, v. 67, n. 8, p. 1566–1572, 2007.
- ADAV, S. S. et al. Aerobic granular sludge: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 411–423, 2008.
- ADAV, S. S.; LEE, D.-J.; LAI, J.-Y.. Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1601–1610, 2010.
- ADAV, S. S.; LEE, D. J.; LAI, J. Y.. Biological nitrification-denitrification with alternating oxic and anoxic operations using aerobic granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1181–1189, 2009.
- ADRIAN, N. R.; SUFLITA, J. M. Anaerobic biodegradation of halogenated and nonhalogenated N-, s-, and o-heterocyclic compounds in aquifer slurries. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1551–1557, 1994.
- ALVARINO, T. et al. Understanding the removal mechanisms of PPCPs and the influence of main technological parameters in anaerobic UASB and aerobic CAS reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 506–513, 2014.
- AMORIM, C. L. et al. Treatment of a simulated wastewater amended with a chiral pharmaceuticals mixture by an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 115, p. 277–285, 2016.
- AMORIM, C. L. et al. Bacterial community dynamics within an aerobic granular sludge reactor treating wastewater loaded with pharmaceuticals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. September 2017, p. 905–912, 2018.
- APHA. **Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.
- ASHFAQ, M. et al. Occurrence, fate, and mass balance of different classes of pharmaceuticals and personal care products in an anaerobic-anoxic-oxic wastewater treatment plant in Xiamen, China. **Water Research**, v. 123, p. 655–667, 2017.
- AULENTA, F. et al. Bioresource Technology The humic acid analogue antraquinone-2, 6-disulfonate (AQDS) serves as an electron shuttle in the electricity-driven microbial

dechlorination of trichloroethene to cis-dichloroethene. **Bioresource Technology**,v. 101, n. 24, p. 9728–9733, 2010.

BAEK, S. H. et al. Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Degrading Phenol and Reducing Nitrate under Low-Oxygen Conditions. **Current Microbiology**,v. 47, n. 6, p. 462–466, 2003.

BARAT, R. et al. Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal. **Water Science and Technology**,v. 53, n. 12, p. 29–37, 2006.

BARROS, A. R. M.. **Avaliação dos parâmetros cinéticos de biomassa gerada em sistemas de lodo ativado**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental (PPGECA) , Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

BARROS, A. R. M. et al. Effect of calcium addition on the formation and maintenance of aerobic granular sludge (AGS) in simultaneous fill/draw mode sequencing batch reactors (SBRs). **Journal of Environmental Management**,v. 255, p. 109850, 2020.

BASSIN, J. P. Tecnologia de Granulação Aeróbia (Lodo Granular Aeróbio). In: **Processos biológicos avançados para tratamento de efluentes e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. p. 368.

BASSIN, J. P. et al. Simultaneous nitrogen and phosphate removal in aerobic granular sludge reactors operated at different temperatures. **Water Research**,v. 46, n. 12, p. 3805–3816, 2012.

BATT, A. L.; KIM, S.; AGA, D. S. Enhanced biodegradation of lopromide and trimethoprim in nitrifying activated sludge. **Environmental Science and Technology**,v. 40, n. 23, p. 7367–7373, 2006.

BENGTSSON, S. et al. A comparison of aerobic granular sludge with conventional and compact biological treatment technologies. **Environmental Technology**,v. 13, p. 1479–1487, 2018.

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

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

BINELLI, A. et al. A multi-biomarker assessment of the impact of the antibacterial trimethoprim on the non-target organism Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**,v. 150, n. 3, p. 329–336, 2009.

BIRG, A.; RITZ, N. L.; LIN, H. C. **The Unknown Effect of Antibiotic-Induced Dysbiosis on the Gut Microbiota**.Elsevier Inc., 2019.

BLACKALL, L. L. et al. A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. **Journal of Intelligent and Robotic Systems: Theory and Applications**,v. 22, n. 3–4, p. 255–267, 1998.

BŁEDZKA, D.; GROMADZIŃSKA, J.; WASOWICZ, W.. Parabens. From environmental studies to human health. **Environment International**,v. 67, p. 27–42, 2014.

BOBERG, J. et al. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. **Reproductive Toxicology**,v. 30, n. 2, p. 301–312, 2010.

BOUJU, H. et al. Isolation of bacterial strains capable of sulfamethoxazole mineralization from an acclimated membrane bioreactor. **Applied and Environmental Microbiology**,v. 78, n. 1, p. 277–279, 2012.

BROGDEN, R. N. et al. Trimethoprim: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic Use in Urinary Tract Infections. **Drugs**,v. 23, n. 6, p. 405–430, 1982.

CALVO, J. ; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**,v. 27, n. 1, p. 44–52, 2009.

CÂNDIDO, E. A.; SILVA, F. et al. Caracterização química das cinzas do carvão para classificação quanto sua periculosidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, VII, 2016 Campina Grande **Anais**. IBEAS – Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais, 2016. p1-5.

CANOSA, P. et al. Formation of halogenated by-products of parabens in chlorinated water. **Analytica Chimica Acta**,v. 575, n. 1, p. 106–113, 2006.

CARBALLA, M. et al. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. **Water Research**,v. 41, p. 2139–2150, 2007.

CARVALHO, I. T.; SANTOS, L.. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. **Environment International**,v. 94, p. 736–757, 2016.

CERVANTES, F. J.; SANTOS, A. B.. Reduction of azo dyes by anaerobic bacteria: Microbiological and biochemical aspects. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**,v. 10, n. 2, p. 125–137, 2011.

CHANDRAN, K.; SMETS, B. F. Single-step nitrification models erroneously describe batch ammonia oxidation profiles when nitrite oxidation becomes rate limiting. **Biotechnology and Bioengineering**,v. 68, n. 4, p. 396–406, 2000.

CHEN, M. et al. A humic substance analogue AQDS stimulates *Geobacter* sp. abundance and enhances pentachlorophenol transformation in a paddy soil. **Chemosphere**,v. 160, p. 141–148, 2016.

CHUANG, S. H.; OUYANG, C. F.; WANG, Y. B. Kinetic competition between phosphorus release and denitrification on sludge under anoxic condition. **Water Research**,v. 30, n. 12, p. 2961–2968, 1996.

CORSINO, S. F. et al. Cultivation of granular sludge with hypersaline oily wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**,v. 105, p. 192–202, 2015.

CORSINO, S. F. et al. Simultaneous nitrification-denitrification for the treatment of high-strength nitrogen in hypersaline wastewater by aerobic granular sludge. **Water Research**,v.88, p. 329–

336, 2016.

CORSINO, S. F. et al. Aerobic granular sludge treating high strength citrus wastewater: Analysis of pH and organic loading rate effect on kinetics, performance and stability. **Journal of Environmental Management**, v. 214, p. 23–35, 2018.

DARBRE, P. D. et al. Concentrations of Parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 5–13, 2004.

DARWISH, R. M.; BLOOMFIELD, S. F. The effect of co-solvents on the antibacterial activity of paraben preservatives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 119, n. 1, p. 182–192, 1995.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental health perspectives**, v. 107, n. 6, p. 907–938, 1999.

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

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

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.

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.

DORON, S. et al. Antibacterial effect of parabens against planktonic and biofilm *Streptococcus sobrinus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 575–578, 2001.

EICHHORN, P. et al. Application of ion trap-MS with H/D exchange and QqTOF-MS in the identification of microbial degradates of trimethoprim in nitrifying activated sludge. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 13, p. 4176–4184, 2005.

EKAMA, G. A.; WENTZEL, M. C. Nitrogen Removal. In: HENZE, Mogens et al. (Eds.). **Biological wastewater treatment: principles, modelling and design**.: IWA Publishing, 2008. p. 528.

FALVO, A. et al. Synthesis of intracellular storage polymers by *Amaricoccus kaplicensis*, a tetrad forming bacterium present in activated sludge. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 299–305, 2001.

FAN, C.; WANG, S. C.. Co-metabolic enhancement of organic removal from waste water in the presence of high levels of alkyl paraben constituents of cosmetic and personal care products. **Chemosphere**, v. 179, p. 306–315, 2017.

FAN, X. Y. et al. Shifts in bacterial community composition and abundance of nitrifiers

during aerobic granulation in two nitrifying sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 99–107, 2018.

FANG, F. et al. Kinetic analysis on the two-step processes of AOB and NOB in aerobic nitrifying granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 1159–1169, 2009.

FENG, N. et al. Co-metabolic degradation of the antibiotic ciprofloxacin by the enriched bacterial consortium XG and its bacterial community composition. **Science of The Total Environment**, v. 665, p. 41–51, 2019.

FERNÁNDEZ-NAVA, Y. et al. Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 7976–7981, 2008.

FIGUEROA, M. et al. Nitrogen removal in aerobic granular systems. *In*: Cervantes, F. J. (organizador) **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution**. Editora: IWA Publishing, 2009. p. 373–401.

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

FISCHER, K.; MAJEWSKY, M.. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 15, p. 6583–6597, 2014.

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.

FU, C. et al. Membrane fouling between a membrane bioreactor and a moving bed membrane bioreactor: Effects of solids retention time. **Chemical Engineering Journal**, v. 309, p. 397–408, 2017.

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

GIESEN, A.; THOMPSON A. Aerobic granular biomass for cost-effective , energy efficient and sustainable wastewater treatment . *In*: EUROPEAN WASTEWATER MANAGEMENT CONFERENCE, 7 th, 2013, Emirates Old Trafford. **Anais**. Aqua Enviro Technology Transfer, 2013.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I. et al. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate-mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6770–6780, 2011.

GUIMARÃES, L. B. **Caracterização microbiológica do lodo granular na remoção de nutrientes e potencial de recuperação de exopolímeros de efluentes reatores em bateladas sequenciais**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, p. 261, 2017.

HAMAN, C. et al. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A

review. **Water Research**, v. 68, p. 1–11, 2015.

HAO, W. et al. The biological effect of metal ions on the granulation of aerobic granular activated sludge. **Journal of Environmental Sciences**, v. 44, p. 252–259, 2016.

HE, Q. et al. Microbial population dynamics during sludge granulation in an A/O/A sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 1–8, 2016.

HE, Q. et al. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in aerobic granular sequencing batch reactors with high aeration intensity: Impact of aeration time. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 214–222, 2018.

HENZE, M. et al. **Biological Wastewater Treatment. Principles, Modelling and Design.**: IWA Publishing, 2008.

HERZOG, B. et al. Characterization of pure cultures isolated from sulfamethoxazole-acclimated activated sludge with respect to taxonomic identification and sulfamethoxazole biodegradation potential. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2013.

ILLUMINA. **16S Metagenomic Sequencing Library**. 2013. Disponível em: <http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>.

ISIDORI, M. et al. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science of the Total Environment**, v. 346, n. 1–3, p. 87–98, 2005.

JESKE, O. et al. Planctomycetes do possess a peptidoglycan cell wall. **Nature Communications**, v. 6, n. May, 2015.

JEWELL, K. S. et al. New insights into the transformation of trimethoprim during biological wastewater treatment. **Water Research**, v. 88, p. 550–557, 2016.

JIANG, H. L. et al. Ca²⁺ augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 95–99, 2003.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A.. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 7. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2014.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KANG, A. J. et al. Removal of antibiotic sulfamethoxazole by anoxic/anaerobic/oxic granular and suspended activated sludge processes. **Bioresource Technology**, v. 251, n. October 2017, p. 151–157, 2018.

KARTHIKRAJ, R. et al. Occurrence and fate of parabens and their metabolites in five sewage treatment plants in India. **Science of the Total Environment**, v. 593–594, n. set. 2017, p. 592–598, 2017.

KASSOTAKI, E. et al. Enhanced sulfamethoxazole degradation through ammonia oxidizing bacteria co-metabolism and fate of transformation products. **Water Research**, v. 94, p. 111–

119, 2016.

KENT, J.; TAY, J. H.. Treatment of 17 α _ethinylestradiol, 4_nonylphenol, and carbamazepine in wastewater using an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. **Science of the Total Environment**,v.652, p. 1270-1278, 2019.

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

KOŃCZAK, B.; KARCZ, J.; MIKSCH, K.. Influence of Calcium, Magnesium, and Iron Ions on Aerobic Granulation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,v. 174, p. 2910–2918, 2014.

KONG, Q. et al. The performance and evolution of bacterial community of activated sludge exposed to trimethoprim in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**,v. 244, n. August, p. 872–879, 2017.

KRAGELUND, C. et al. Ecophysiology of different filamentous Alphaproteobacteria in industrial wastewater treatment plants. **Microbiology**,v. 152, p. 3003–3012, 2006.

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

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

LI, H. et al. Effective and characteristics of anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) on denitrification by *Paracoccus versutus* sp.GW1. **Environmental Technology (United Kingdom)**,v. 34, n. 17, p. 2563–2570, 2013.

LI, H. et al. Biodegradation of phenol in saline or hypersaline environments by bacteria: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, p. 109658, 2019.

LI, W. et al. Occurrence, fate and risk assessment of parabens and their chlorinated derivatives in an advanced wastewater treatment plant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 300, p. 29–38, 2015.

LI, X. M. et al. Enhanced aerobic sludge granulation in sequencing batch reactor by Mg²⁺ augmentation. **Bioresource Technology**,v.184, p. 109658, 2009.

LI, X. et al. Seawater-based wastewater accelerates development of aerobic granular sludge: A laboratory proof-of-concept. **Water Research**,v. 115, p. 210–219, 2017.

LIANG, Y. et al. Rapid start-up and microbial characteristics of partial nitrification granular sludge treating domestic sewage at room temperature. **Bioresource Technology**,v. 196, p. 741–745, 2015.

LIN, Y. M.; LIU, Y.; TAY, J. H. Development and characteristics of phosphorus-accumulating microbial granules in sequencing batch reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**,v. 62, n. 4, p. 430–435, 2003.

- LIN, Y. M.; SHARMA, P. K.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The chemical and mechanical differences between alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic flocculent sludge and aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 47, n. 1, p. 57–65, 2013.
- LIN, Y. et al. Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant. **Water Research**, v. 44, n. 11, p. 3355–3364, 2010.
- LIU, C.; XU, X.; FAN, J.. Accelerated anaerobic dechlorination of DDT in slurry with Hydragric Acrisols using citric acid and anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS). **Journal of Environmental Sciences**, v. 38, p. 87–94, 2015.
- LIU, J. et al. Bioresource Technology Reports Role of adding dried sludge micropowder in aerobic granular sludge reactor with extended filamentous bacteria. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, n. November 2018, p. 51–58, 2019.a
- LIU, L. et al. Comparison of Ca²⁺ and Mg²⁺ enhancing aerobic granulation in SBR. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 382–387, 2010. a.
- LIU, L. et al. Behavior of antibiotics and antibiotic resistance genes in aerobic granular reactors: Interrelation with biomass concentration. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 139, n. February, p. 18–23, 2019. b.
- LIU, Y.; SUN, D. D.. Calcium augmentation for enhanced denitrifying granulation in sequencing batch reactors. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 987–992, 2011.
- LIU, Y.-Q. et al. Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 520–525, 2010. b.
- LIU, Y. Q. et al. Effects of hydraulic retention time on aerobic granulation and granule growth kinetics at steady state with a fast start-up strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 469–477, 2016. a.
- LIU, Y. Q.; LAN, G. H.; ZENG, P.. Size-dependent calcium carbonate precipitation induced microbiologically in aerobic granules. **Chemical Engineering Journal**, v. 285, p. 341–348, 2016.
- LIU, Y. Q.; TAY, J. H.. Characteristics and stability of aerobic granules cultivated with different starvation time. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 205–210, 2007.
- LIU, Y. et al. A general model for biosorption of Cd²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ by aerobic granules. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 233–239, 2003.
- LIU, Y. et al. Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 26–32, 2005.
- LIU, Y.; LIU, Q. S.. Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 115–127, 2006.
- LIU, Y.; TAY, J. H.. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. **Water Research**, v. 36, p. 1653–1665, 2002.

- LIU, Y.; TAY, J. H.. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**,v. 22, n. 7, p. 533–563, 2004.
- LIU, Y.; WANG, Z.; TAY, J.. A unified theory for upscaling aerobic granular sludge sequencing batch reactors. **Biotechnology Advances**,v. 23, p. 335–344, 2005.
- 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. b.
- LONG, B. et al. Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**,v. 166, p. 57–63, 2014.
- LÓPEZ-SERNA, R. et al. Multiresidue analytical method for pharmaceuticals and personal care products in sewage and sewage sludge by online direct immersion SPME on-fiber derivatization – GCMS. **Talanta**,v. 186, p. 506-512, 2018.
- LU, J. et al. Biodegradation of four selected parabens with aerobic activated sludge and their transesterification product. **Ecotoxicology and Environmental Safety**,v. 156, n. December 2017, p. 48–55, 2018.
- LÜCKER, S. et al. Nitrotoga-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants. **ISME Journal**,v. 9, n. 3, p. 708–720, 2015.
- LV, Y. et al. Microbial communities of aerobic granules: Granulation mechanisms. **Bioresource Technology**,v. 169, p. 344–351, 2014.
- MA, W. L. et al. Concentrations and fate of parabens and their metabolites in two typical wastewater treatment plants in northeastern China. **Science of the Total Environment**,v. 644, p. 754–761, 2018. a.
- MA, X. et al. Occurrence of benzophenones, parabens and triclosan in the Yangtze River of China, and the implications for human exposure. **Chemosphere**,v. 213, p. 517–525, 2018. b.
- MAÑAS, A.; BISCANS, B.; SPÉRANDIO, M.. Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process. **Water Research**,v. 45, n. 12, p. 3776–3786, 2011.
- MARTINEZ, C. M.; ZHU, X.; LOGAN, B. E. Bioelectrochemistry AQDS immobilized solid-phase redox mediators and their role during bioelectricity generation and RR2 decolorization in air-cathode single-chamber microbial fuel cells. **Bioelectrochemistry**,v. 118, p. 123–130, 2017.
- MATOZZO, V. et al. Environmentally realistic concentrations of the antibiotic Trimethoprim affect haemocyte parameters but not antioxidant enzyme activities in the clam *Ruditapes philippinarum*. **Environmental Pollution**,v. 206, p. 567–574, 2015.
- MENG, Y. et al. Science of the Total Environment Iron (III) minerals and anthraquinone-2 , 6-disulfonate (AQDS) synergistically enhance bioreduction of hexavalent chromium by *Shewanella oneidensis* MR-1. **Science of the Total Environment**,v. 640–641, p. 591–598, 2018.

- MERY-ARAYA, C. et al. Using carbon substrate as a selection pressure to enhance the potential of aerobic granular sludge microbial communities for removing contaminants of emerging concern. **Bioresource Technology**,v. 290, n. March, p. 121705, 2019.
- MINO, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. **Water Research**,v. 32, n. 11, p. 3193–3207, 1998.
- MOGHADDAM, S. S.; MOGHADDAM, M. R. A. Cultivation of aerobic granules under different pre-anaerobic reaction times in sequencing batch reactors. **Separation and Purification Technology**,v. 142, p. 149–154, 2015.
- MOOK, W. et al. A review on the effect of bio-electrodes on denitrification and organic matter removal processes in bio-electrochemical systems. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**,v. 19, n. 1, p. 1–13, 2013.
- MOREIRA, I. S. et al. Removal of fluoxetine and its effects in the performance of an aerobic granular sludge sequential batch reactor. **Journal of Hazardous Materials**,v.287, p. 93–101, 2015.
- MORGENROTH, E. et al. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. **Water Research**,v. 31, n. 12, p. 3191–3194, 1997.
- MOSQUERA-CORRAL, A. et al. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. **Water Research**,v. 39, n. 12, p. 2676–2686, 2005.
- MOTTERAN, F.; PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M. The behaviour of an anaerobic baffled reactor (ABR) as the first stage in the biological treatment of hog farming effluents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**,v. 30, n. 2, p. 299–310, 2013.
- MOY, B. Y. P. et al. High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. **Letters in Applied Microbiology**,v. 34, n. 6, p. 407–412, 2002.
- MUDA, K. et al. The effect of hydraulic retention time on granular sludge biomass in treating textile wastewater. **Water Research**,v. 45, n. 16, p. 4711–4721, 2011.
- MÜLLER, E. et al. Aerobic biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by activated sludge applied as co-substrate and sole carbon and nitrogen source. **Chemosphere**,v. 92, n. 8, p. 969–978, 2013.
- NANCHARAI AH, Y.v.; REDDY, G. K. K. Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. **Bioresource Technology**,v. 247, p. 1128–1143, 2018.
- NANCHARAI AH, Y.v.; SARVAJITH, M.; LENS, P. N. L. Selenite reduction and ammoniacal nitrogen removal in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 131, p. 131–141, 2018.
- NANCHARAI AH, Y.v.; SARVAJITH, M. Aerobic granular sludge process: A fast growing biological treatment for sustainable wastewater treatment. **Current Opinion in Environmental Science & Health**,v. 12, p. 57–65, 2019.

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

NOWAK, K. et al. Parabens and their effects on the endocrine system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 474, n. December 2017, p. 238–251, 2018.

NSENGA KUMWIMBA, M.; MENG, F.. Roles of ammonia-oxidizing bacteria in improving metabolism and cometabolism of trace organic chemicals in biological wastewater treatment processes: A review. **Science of the Total Environment**, v. 659, p. 419–441, 2019.

OU, D. et al. Salt-tolerance aerobic granular sludge: Formation and microbial community characteristics. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 132–138, 2018.

PAPIS, E.; DAVIES, S. J.; JHA, A. N. Relative sensitivity of fish and mammalian cells to the antibiotic, trimethoprim: Cytotoxic and genotoxic responses as determined by neutral red retention, Comet and micronucleus assays. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 208–217, 2011.

PATRAUCHAN, M. A. et al. Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas* sp. **Microbiology**, v. 151, n. 9, p. 2885–2897, 2005.

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

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

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

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

PUIG, S. et al. Selection between alcohols and volatile fatty acids as external carbon sources for EBPR. **Water Research**, v. 42, n. 3, p. 557–566, 2008.

RAMOS, C.; SUÁREZ-OJEDA, M. E.; CARRERA, J.. Long-term impact of salinity on the performance and microbial population of an aerobic granular reactor treating a high-strength aromatic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 844–851, 2015.

REN, T. T. et al. Calcium spatial distribution in aerobic granules and its effects on granule structure, strength and bioactivity. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3343–3352, 2008.

RIVERA-UTRILLA, J. et al. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. **Chemosphere**, v. 93, n. 7, p. 1268–1287, 2013.

ROLLEMBERG, S. L. S. **Aerobic granular sludge: formation/maintenance, system optimization and resource recovery possibilities**. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Ambiental) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal

do Ceará, Fortaleza 2020.

ROLLEMBERG, S. L. S. et al. Aerobic granular sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 270, n. August, p. 678–688, 2018.

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

ROLLEMBERG, S. L. S. et al. Influence of sequencing batch reactor configuration on aerobic granules growth: engineering and microbiological aspects. **Journal of Cleaner Production**, v. 238, p. 117906, 2019. b.

ROLLEMBERG, S. L. S. et al. Comparison of the dynamics, biokinetics and microbial diversity between activated sludge flocs and aerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, v. 294, n. September, p. 122106, 2019. c.

ROSE, R. K. The role of calcium in oral streptococcal aggregation and the implications for biofilm formation and retention. **Biochim Biophysica Acta**, v. 1475, p. 76–82, 2000.

ROSMAN, N. H. et al. Cultivation of aerobic granular sludge for rubber wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 620–623, 2013.

SACK, E. L. W.; VAN DER WIELEN, P. W. J. J.; VAN DER KOOIJ, D.. Polysaccharides and Proteins Added to Flowing Drinking Water at Microgram-per-Liter Levels Promote the Formation of Biofilms Predominated by Bacteroidetes and Proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2360–2371, 2014.

SAJJAD, M.; KIM, K. S.. Studies on the interactions of Ca²⁺ and Mg²⁺ with EPS and their role in determining the physicochemical characteristics of granular sludges in SBR system. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 966–972, 2015.

SANTOS, A. B. (Coordenador). **Caracterização, Tratamento e Gerenciamento de Subprodutos de Correntes de Esgotos Segregadas e Não Segregadas em Empreendimentos Habitacionais**. Impreca, 2019. p. 812.

SANTOS, A. B. et al. Applicability of both thermophilic treatment by anaerobic granular sludge and redox mediators on colour removal of textile wastewaters. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, p. 253–259, 2005.

SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2369–2385, 2007.

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

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

SCHWARZENBECK, N.; ERLEY, R.; WILDERER, P. A. Aerobic granular sludge in an

SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. **Water Science and Technology**, v. 49, n. 11–12, p. 41–46, 2004.

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

SEVIOUR, T. et al. Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis. **Water Research**, v. 151, p. 1–7, 2019.

SHEIK, A. R.; MULLER, E. E. L.; WILMES, P. A hundred years of activated sludge: Time for a rethink. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAR, p. 1–7, 2014.

SHI, Y. et al. Changes of the reactor performance and the properties of granular sludge under tetracycline (TC) stress. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 170–175, 2013.

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

SILVA, M. R. et al. Impact of the redox mediator sodium anthraquinone-2, 6-disulphonate (AQDS) on the reductive decolourisation of the azo dye Reactive Red 2 (RR2) in one- and two-stage anaerobic systems. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 1–7, 2012.

SILVA FILHO, H. A. et al. Seleção de substratos padrões para ensaios respirométricos aeróbios com biomassa de sistemas de lodo ativado. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 141–150, 2015.

SUÁREZ, S. et al. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7, n. 2, p. 125–138, 2008. .

SUJA, E. et al. Denitrification accelerates granular sludge formation in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 28–34, 2015.

SUN, Q. et al. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in a wastewater treatment plant in Xiamen, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 277, p. 69–75, 2014.

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.

TANDOI, V. et al. The behaviour of polyphosphate accumulating acinetobacter isolates in an anaerobic–aerobic chemostat. **Water Research**, v. 32, n. 10, p. 2903–2912, 1998.

TANSEL, B.. Morphology, composition and aggregation mechanisms of soft bioflocs in marine snow and activated sludge: A comparative review. **Journal of Environmental Management**, v. 205, p. 231–243, 2018.

TAO, J. et al. Effect of granular activated carbon on the aerobic granulation of sludge and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 236, p. 60–67, 2017.

TAY, J. H.; LIU, Q. S.; LIU, Y. The effects of shear force on the formation, structure and

metabolism of aerobic granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 227–233, 2001. a.

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

TAY, J. H.; LIU, Q. S.; LIU, Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. **Letters in applied microbiology**, England, v. 33, n. 3, p. 222–226, 2001. c.

TAY, J.-H.; JIANG, H.; TIONG-LEE TAY, S.. High-Rate Biodegradation of Phenol by Aerobically Grown Microbial Granules. **Journal of Environmental Engineering-asce - J ENVIRON ENG-ASCE**, v. 130, 2004.

THOMSEN, T. R.; KONG, Y.; NIELSEN, P. H.. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, n. 3, p. 370–382, 2007.

TIAN, X et al. The effect of extracellular polymeric substances on exogenous highly toxic compounds in biological wastewater treatment: An overview. **Bioresource Technology Reports**, v.5, p. 28–42., 2019.

TIWARI, M. et al. Elemental characterization of coal, fly ash, and bottom ash using an energy dispersive X-ray fluorescence technique. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 90, p. 53–57, 2014.

TÓTH, E. M. et al. *Phreatobacter oligotrophus* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from ultrapure water of the water purification system of a power plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 3, p. 839–845, 2014.

VALKOVA, N. et al. Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant *Enterobacter cloacae* Strain EM. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2404–2409, 2001.

VAN DER ZEE, F. P.; CERVANTES, F. J. Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 256–277, 2009.

WAGNER, M. et al. Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and. **Society**, v. 66, n. 12, p. 5368–5382, 2000.

WAN, C. et al. Formation of filamentous aerobic granules: role of pH and mechanism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 19, p. 8389–8397, 2014.

WAN, C. et al. Calcium precipitate induced aerobic granulation. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 32–37, 2015. a.

WAN, C. et al. Formation of bacterial aerobic granules: Role of propionate. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 489–494, 2015. b.

WAN, J.; BESSIÈRE, Y.; SPÉRANDIO, M.. Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at

reduced aeration rate. **Water Research**, v. 43, n. 20, p. 5097–5108, 2009.

WANG, D. et al. Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5466–5473, 2008.

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

WANG, L. et al. Transesterification of para-hydroxybenzoic acid esters (parabens) in the activated sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v.354, p. 145–152, 2018. b.

WANG, Q.; DU, G.; CHEN, J.. Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force. **Process Biochemistry**, v.33, p. 557–563, 2004.

WANG, Q. et al. Aerobic granules cultivated with simultaneous feeding/draw mode and low-strength wastewater: Performance and bacterial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 261, p. 232–239, 2018. c.

WANG, S.; WANG, J.; SUN, Y.. Degradation of chlorinated paraben by integrated irradiation and biological treatment process. **Journal of Environmental Management**, v. 189, p. 29–35, 2017.

WANG, S. et al. Formation of aerobic granules by Mg²⁺ and Al³⁺ augmentation in sequencing batch airlift reactor at low temperature. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 7, p. 1049–1055, 2012.

WANG, W.; KANNAN, K.. Fate of Parabens and Their Metabolites in Two Wastewater Treatment Plants in New York State, United States. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 1174–1181, 2016.

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.

WHITFIELD, G. B.; MARMONT, L. S.; HOWELL, P. L.. Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. May, p. 1–21, 2015.

WILÉN, B. M. et al. Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. **Water Research**, v. 42, n. 8–9, p. 2300–2308, 2008.

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, p. 489–502, 2018.

WINKLER, M. K. H.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Integration of anammox into the aerobic granular sludge process for main stream wastewater treatment at ambient temperatures. **Water Research**, v. 46, n. 1, p. 136–144, 2012.

WIRTZ, R. ; DAGUE, R. R. Enhancement of granulation and start-up in the anaerobic sequencing batch reactor. **Water Environment Research**, v. 68, n. 5, p. 883–892, 1996.

- WONG, M. T. et al. Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic-aerobic activated sludge processes. **Microbiology**, v. 150, n. 11, p. 3741–3748, 2004.
- WONG, M. T.; LIU, W. T.. Ecophysiology of Defluviicoccus-related tetrad-forming organisms in an anaerobic-aerobic activated sludge process. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1485–1496, 2007.
- WU, Y. et al. Comparative studies of aerobic and anaerobic biodegradation of methylparaben and propylparaben in activated sludge. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, n. December 2016, p. 25–31, 2017.
- XAVIER, J. A. **Granulação natural da biomassa em reator operado em bateladas sequenciais para tratamento de esgoto sanitário**. Dissertação (mestrado) -Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, p. 141, 2017.
- XU, H.; LIU, Y.; TAY, J. H.. Effect of pH on nickel biosorption by aerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 3, p. 359–363, 2006.
- XU, J. et al. Cultivation and stable operation of aerobic granular sludge at low temperature by sieving out the batt-like sludge. **Chemosphere**, v. 211, p. 1219–1227, 2018.
- YANG, S. F.; LI, X. Y.; YU, H. Q. Formation and characterisation of fungal and bacterial granules under different feeding alkalinity and pH conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 8–14, 2008.
- YANG, S. F.; TAY, J.; LIU, Y.. Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 1, p. 41–48, 2004.
- YANG, Y. et al. Enhanced aerobic granulation, stabilization, and nitrification in a continuous-flow bioreactor by inoculating biofilms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5737–5745, 2014.
- YE, C. et al. The shift of the microbial community in activated sludge with calcium treatment and its implication to sludge settleability. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 11–18, 2016.
- YI, T.; BARR, W.; HARPER, W. F. Electron density-based transformation of trimethoprim during biological wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 65, n. 4, p. 689–696, 2012.
- YU, T. et al. Chemosphere Removal of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs by extended sludge age biological process. **Chemosphere**, v. 77, n. 2, p. 175–181, 2009.
- YU, Z. et al. Trans-generational influences of sulfamethoxazole on lifespan, reproduction and population growth of *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, n. June 2016, p. 312–318, 2017.
- ZAFIRIADIS, I. et al. Inhibition of the respiratory chain reactions in denitrifying EBPR biomass under simultaneous presence of acetate and electron acceptor. **New Biotechnology**, v. 36, p. 42–50, 2017.

- ZAHARIA, C.; SUTEU, D.. Coal fly ash as adsorptive material for treatment of a real textile effluent: Operating parameters and treatment efficiency. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 4, p. 2226–2235, 2013.
- ZHANG, D. et al. Aerobic granulation accelerated by biochar for the treatment of refractory wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 314, p. 88–97, 2017.
- ZHANG, H. L. et al. Calcium effect on the metabolic pathway of phosphorus accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems. **Water Research**, v. 84, p. 171–180, 2015.
- ZHANG, H. et al. Aerobic granulation with low strength wastewater at low aeration rate in A/O/A SBR reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 215–222, 2011.
- ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D.. Aerobic granular processes: Current research trends. **Bioresource Technology**, v. 210, p. 78–80, 2016.
- ZHAO, X. et al. Remediation of pharmaceuticals and personal care products using an aerobic granular sludge sequencing bioreactor and microbial community profiling using Solexa sequencing technology analysis. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 104–112, 2015. a.
- ZHAO, X. et al. Remediation of pharmaceuticals and personal care products using an aerobic granular sludge sequencing bioreactor and microbial community profiling using Solexa sequencing technology analysis. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 104–112, 2015. b.
- ZHENG, Y. et al. Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. **Chemosphere**, v. 63, n. 10, p. 1791–1800, 2006.
- ZHOU, C. et al. Electron shuttles enhance the degradation of sulfamethoxazole coupled with Fe (III) reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 62, n. February, p. 156–163, 2018.
- ZHOU, D.; LIU, M.; GAO, L.. Calcium accumulation characterization in the aerobic granules cultivated in a continuous-flow airlift bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 871–877, 2013.
- ZHOU, G. et al. Chemical composition of extracellular polymeric substances and evolution of microbial community in activated sludge exposed to ibuprofen. **Journal of Environmental Management**, v. 246, p. 267–274, 2019.
- ZHU, L. et al. Role and significance of extracellular polymeric substances on the property of aerobic granule. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 46–54, 2012.
- ZHU, L. et al. Optimization of selective sludge discharge mode for enhancing the stability of aerobic granular sludge process. **Chemical Engineering Journal**, v. 217, p. 242–246, 2013.
- ZITA, A.; HERMANSSON, M.. Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, n. 2, p. 299–306, 1997.