

II-118 - AVALIAÇÃO DA DINÂMICA POPULACIONAL EM LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA) EM REATORES EM BATELADA SEQUENCIAL (RBS) EM REGIME DE ALIMENTAÇÃO/DESCARTE SIMULTÂNEOS

Antônio Ricardo Mendes Barros

Tecnólogo em Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte (IFCE/LN). Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Doutorando em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ian Holanda Herbster Moura

Graduando em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

Silvio Luiz de Sousa Rollemberg

Engenheiro Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente (PRODEMA) com ênfase em Gestão de Recursos Hídricos (UFC). Doutorando em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

Paulo Igor Milen Firmino

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutor em Engenharia Civil/Saneamento Ambiental (UFC). Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da UFC.

André Bezerra dos Santos⁽¹⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). PhD em Environmental Sciences pela Wageningen University, Holanda. Professor Associado do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da UFC.

Endereço⁽¹⁾: Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Campus do Pici, Bloco 713, Pici - Fortaleza - CE - CEP: 60455-900 - Brasil - Tel: (85) 3366-9628 - e-mail: andre23@ufc.br

RESUMO

O presente estudo investigou as populações de microrganismos presentes em um reator em batelada sequencial (RBS), operando em regime de alimentação/descarte simultâneos, comparando a quantidade e diversidade destas no lodo de inóculo com o lodo granular aeróbio formado posteriormente a partir da imposição de certas condições operacionais. O sistema foi alimentado com esgoto sintético a uma baixa velocidade ascensional de líquido ($\sim 1 \text{ m h}^{-1}$). Ademais, foi avaliado em termos de remoção de carbono, nitrogênio e fósforo, estabilidade operacional e comunidade microbiana. Os grânulos formados se mostraram bem consistentes, com predominância de microrganismos esféricos, conferindo boa sedimentabilidade, porém baixa resistência ao cisalhamento. A maior diversidade microbiana no LGA, em comparação ao lodo de inóculo, permite concluir que as condições operacionais não se constituíram como uma elevada pressão de seleção, favorecendo a maior riqueza e diversidade no grânulo formado. A presença de diferentes famílias, AOB, NOB, DNB, GAOs e PAOs explicam os mecanismos de elevada remoção de matéria orgânica e acúmulo de NO_x no efluente, o que possivelmente prejudicou a remoção de fósforo.

PALAVRAS-CHAVE: Lodo granular aeróbio, RBS volume constante, microbiologia.

INTRODUÇÃO

A granulação aeróbia é um processo de automobilização de microrganismos (especialmente bactérias) influenciado por pressões de seleção, como curto período de sedimentação e elevada intensidade de aeração (ROLLEMBERG et al., 2018). Os grânulos formados usualmente possuem uma estrutura microbiana forte e compacta e boa capacidade de sedimentação, e o sistema consegue garantir uma elevada retenção de biomassa, assim como uma capacidade de lidar com taxas elevadas de carga orgânica e remover simultaneamente carbono, nitrogênio e fósforo (ADAV et al., 2008; ADAV; LEE; LAI, 2009). Além disso, quando comparado aos sistemas de lodo ativado convencional, a tecnologia de lodo granular aeróbio apresenta menores custos de operação (20-25%) e gastos com energia elétrica (23-40%), além de requerer menor demanda de área (50-75%) (ADAV et al., 2008; Bengtsson et al., 2018; Nereda, 2017).

Geralmente, essa técnica é aplicada em regime de batelada sequencial (RBS) e operada em reatores com o volume variável, em que o sobrenadante é descarregado a partir do nível médio do reator. No entanto, essa configuração é pouco utilizada em escala real devido apresentar maiores custos e problemas operacionais. Assim, normalmente são utilizados sistemas com regime de alimentação/descarte simultâneos (com volume constante), em que o afluente é inserido na parte inferior do reator enquanto o efluente é descarregado na parte superior (DERLON *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018).

Um fator que interfere na utilização desse tipo de sistema é a dificuldade de imprimir elevadas velocidades ascensionais na etapa de alimentação/descarte. Além disso, o desempenho dos processos do LGA depende muito da comunidade microbiana, e, atrelado a essa temática, o mecanismo de granulação a nível de comunidade microbiana não é ainda completamente compreendido nos RBS de volume constante.

Portanto, este trabalho visa avaliar a dinâmica das populações de microrganismos presentes em um reator em batelada sequencial, operando em regime de alimentação e descarte simultâneos, bem como estudar de que maneira isso pode afetar nas propriedades de sedimentabilidade, remoção de carbono e nutrientes e morfologia dos grânulos, comparando a diversidade microbiana no início (lodo ativado convencional como inóculo) e no final (lodo granular aeróbio) do experimento.

METODOLOGIA UTILIZADA

Foi utilizado um RBS cilíndrico, feito em acrílico, com 100 mm de diâmetro, 1 m de altura, 7,2 L de volume útil e uma relação altura/diâmetro (A/D) de 10. O tempo de detenção hidráulica (TDH) foi de 12 h. Na sua base, foi posicionado um aerador, o qual proporcionou uma taxa de aeração de 10 L min⁻¹, resultando em uma velocidade ascensional de ar de 2,12 cm s⁻¹ e concentração de 50% da saturação de oxigênio no início da aeração (6-7 mg L⁻¹). Foram utilizados cerca de 4 L de inóculo, o qual apresentava concentração inicial de sólidos suspensos totais de aproximadamente 2 g L⁻¹ e era proveniente de um sistema de lodo ativado do tipo carrossel, projetado na modalidade de aeração prolongada, o qual se destinava ao tratamento de esgoto doméstico de uma indústria têxtil.

O reator foi operado em regime de alimentação e descarte simultâneos (WANG *et al.*, 2018), com auxílio de uma bomba peristáltica Masterflex modelo BTG 2344, a qual bombeava a solução de alimentação pela parte inferior do reator, produzindo uma troca volumétrica de 50% e impunha uma velocidade ascensional de aproximadamente 1 m h⁻¹, enquanto o efluente tratado era descartado simultaneamente pelo topo do reator. O afluente sintético utilizado foi mantido armazenado em um refrigerador, a temperatura de 4° C, com o objetivo de impedir sua degradação. A referida solução continha: etanol como fonte de carbono solúvel (800 mg DQO L⁻¹), amônio como fonte de nitrogênio (100 mg N-NH₄⁺ L⁻¹), provido por cloreto de amônio (NH₄Cl), fosfato como fonte de fósforo (10 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹), provido por fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), bicarbonato de sódio, NaHCO₃ (700 mg CaCO₃ L⁻¹), como fonte de alcalinidade e uma solução de micronutrientes (DOS SANTOS, 2005), adicionada com uma relação de 1 mL L⁻¹ de solução de meio basal, a qual continha (em mg L⁻¹): H₃BO₃ (50), ZnCl₂ (50), CuCl₂ (30), MnSO₄·H₂O (50), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (50), AlCl₃ (50), CoCl₂·6H₂O (50) e NiCl₂ (50).

O processo de granulação foi dividido em quatro etapas, todas com ciclos de 6 h de duração. A princípio, os ciclos foram divididos da seguinte forma: 30 min de alimentação e descarte simultâneos, 90 min de período anaeróbio/anóxico, 210 min de aeração e 30 min de sedimentação. Nas etapas seguintes, os tempos de sedimentação foram diminuídos de 30 para 15, 10 e 5 min. Cada etapa foi mantida por aproximadamente 6 semanas. Com o intuito de manter o tempo total do ciclo sempre constante, os minutos que eram retirados do período de sedimentação eram, pois, adicionados à etapa de aeração.

Para avaliação das eficiências de remoção de matéria orgânica e nutrientes, foram determinados os seguintes parâmetros: Demanda Química de Oxigênio (DQO), nitrogênio na forma de amônia (N-NH₄⁺), nitrito (N-NO₂) e nitrato (N-NO₃⁻); e o fósforo na forma de fosfato (P-PO₄³⁻). Como parâmetros de operação foram monitorados o pH, OD, temperatura e alcalinidade. As análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), em uma frequência de duas vezes por semana.

A avaliação da capacidade de sedimentação foi feita pelo uso do Índice Volumétrico de Lodo (IVL) dinâmico, uma versão modificada do IVL (SCHWARZENBECK *et al.*, 2004) para os tempos de 5 (IVL₅), 10 (IVL₁₀) e 30 min (IVL₃₀), com frequência também de duas vezes por semana.

A análise de resistência física (teste de cisalhamento) dos grânulos seguiu a metodologia descrita por Nor-Anuar *et al.* (2012). Assim, amostras dos grânulos (> 0,2 mm) foram submetidos a uma força de cisalhamento causada por um agitador a aproximadamente 200 rpm durante 10 min. A fração fragmentada foi expressa em termos de um coeficiente de estabilidade (S), obtido pela razão entre a quantidade de sólidos totais após e antes da agitação da amostra de lodo. Esse coeficiente foi classificado em três categorias: muito resistente ($S < 5\%$), resistente ($5\% \leq S \leq 20\%$) e não resistente ($S > 20\%$). Portanto, quanto menor é o valor de S, maior é a resistência dos grânulos aeróbios ao cisalhamento.

Para caracterização morfológica, utilizou-se Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo Inspect S50 – FEI, com resolução nominal de 3 nm para a realização de análise em alto e baixo vácuo. A preparação para tais análises de microscopia foi realizada seguindo a metodologia proposta por Motteran, Pereira e Campos (2013). As análises foram realizadas na Central Analítica de Microscopia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

As substâncias poliméricas extracelulares (SPE) também foram quantificadas. Para isso, inicialmente era coletado um volume de 5 mL do licor misto, de onde era extraído o SPE a partir de aplicação de condições alcalinas (pH > 10, com a adição de 5 mL de NaOH 1 mol L⁻¹, seguido por um banho-maria a 80°C por 30 min e sonicação a 55 kHz por 5 min) (TAY *et al.*, 2001). Em seguida, as amostras obtidas eram filtradas com papel de filtro (porosidade 0,45 µm) e diluídas 2 vezes. Uma modificação do método de Lowry foi usada para calcular o conteúdo de proteína (PN), e o método fenol-ácido sulfúrico (LONG *et al.*, 2014) foi usado para determinar a fração de polissacarídeos (PS). A quantificação total de SPE era dada por meio da soma entre as frações de PN e PS.

O sequenciamento de DNA do gene 16S rRNA foi realizado a partir da extração de 0,5 g (peso úmido total) das amostras de lodo coletadas ao final do período de aeração de um ciclo da Etapa IV, usando o Kit PowerSoil® MOBIO. A extração de DNA foi realizada em triplicata para cada amostra de lodo (de inóculo e LGA). A qualidade e concentração do DNA extraído foi estimada usando um Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Para o perfil taxonômico das comunidades bacterianas, a biblioteca amplicon da região V4 do gene 16S rRNA foi preparada como descrito anteriormente (ILLUMINA, 2013), usando os iniciadores específicos da região (515F / 806R) (CAPORASO *et al.*, 2011). Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados com ferramentas de bioinformática. As análises de biologia molecular foram realizadas na Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC.

RESULTADOS OBTIDOS

A sedimentabilidade do lodo representa a capacidade de separação entre o sólido e o líquido, procedimento fundamental para a produção de um efluente de boa qualidade, especialmente em termos de sólidos em suspensão. Assim, foi observado que, após 55 dias de operação, o lodo apresentava valores de IVL₅ três vezes menores que os do lodo de inóculo, demonstrando que a sedimentabilidade da biomassa melhorou com o passar do tempo, sendo um comportamento característico da transformação do lodo floculento em lodo granular. No final do processo de granulação (operado com 5 min de sedimentação), foram obtidos valores médios de IVL₅ de 96,1±11,8 mL g⁻¹, IVL₁₀ de 83,6±11,5 mL g⁻¹ e IVL₃₀ de 60,2±9,1 mL g⁻¹, com 90% dos grânulos maiores que 1 mm, e apenas 2% menores que 0,2 mm, valor limite reportado pela literatura para consideração de grânulo aeróbio.

Esses resultados demonstram que apesar da baixa velocidade ascensional de alimentação/descarte, configurando uma pequena pressão de seleção, foram formados grânulos com boas características físicas. No entanto, quando comparado com outras experiências que utilizaram RBS com volume variável, o período de formação foi prolongado (HE *et al.*, 2016; LONG *et al.*, 2014).

Com relação às concentrações de sólidos suspensos voláteis no licor misto, as quais são relativos indicadores da quantidade de biomassa (microrganismos) presentes no lodo, pôde-se observar que houve um aumento com a

diminuição do tempo de sedimentação, atingindo valores próximos de 8 g SSV.L⁻¹. O valor observado é compatível com aqueles reportados na literatura para lodo granular aeróbio cultivado em reatores em bateladas sequenciais convencionais (LI et al., 2009; ZHANG et al., 2017). Nenhuma diminuição significativa na concentração de SSV foi observada durante as Etapas I e II. Esse comportamento não é usual para RBSs convencionais, nos quais um decréscimo no tempo de sedimentação normalmente ocasiona uma lavagem do lodo, justamente por selecionar aqueles grupos de microrganismos de maior velocidade de sedimentação. Esse comportamento do RBS a volume constante pode ser explicado pelo fato de que, nesse tipo de reator, o tempo de sedimentação tem uma baixa influência na eliminação do lodo com má sedimentabilidade. Nesses reatores, a velocidade ascensional de líquido tem um papel maior nesse processo.

Conforme mostra a Tabela 1, a remoção de matéria orgânica se mostrou estável durante a seleção, agregação e redução da sedimentabilidade da biomassa, assim como na estabilização das condições dos grânulos, com eficiência superior a 93% durante todo o experimento. Em termos de nutrientes, o nitrogênio na forma de NH₄⁺ foi nitrificado e concentrações próximas a 10 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ foram encontradas no efluente, apresentando 80% de remoção de amônia, no entanto, foram encontrados acúmulos das formas oxidadas de nitrogênio (NO_x): nitrito e nitrato no efluente. Em relação aos grânulos maduros (Etapas III e IV), foi observada uma eficiência de desnitrificação em torno de 40%.

Não foi observada uma relação clara entre o processo de granulação e a remoção de fósforo, com baixas eficiências de remoção quando comparado a outras pesquisas (Tabela 1). O modo de operação em ciclos anaeróbios/aeróbios normalmente favorece o crescimento de organismos acumuladores de fósforo (PAOs), com a liberação de fosfato na fase anaeróbia e sua subsequente absorção na fase aeróbia (DE KREUK, 2007). Entretanto, a presença de nitrito e nitrato na fase anaeróbia gera um ambiente de competição por substrato entre PAOs e os microrganismos heterotróficos desnitrificantes, em que estes últimos geralmente possuem vantagem por razões cinéticas, interferindo nas eficiências de remoção de fósforo (CHUANG et al., 1996).

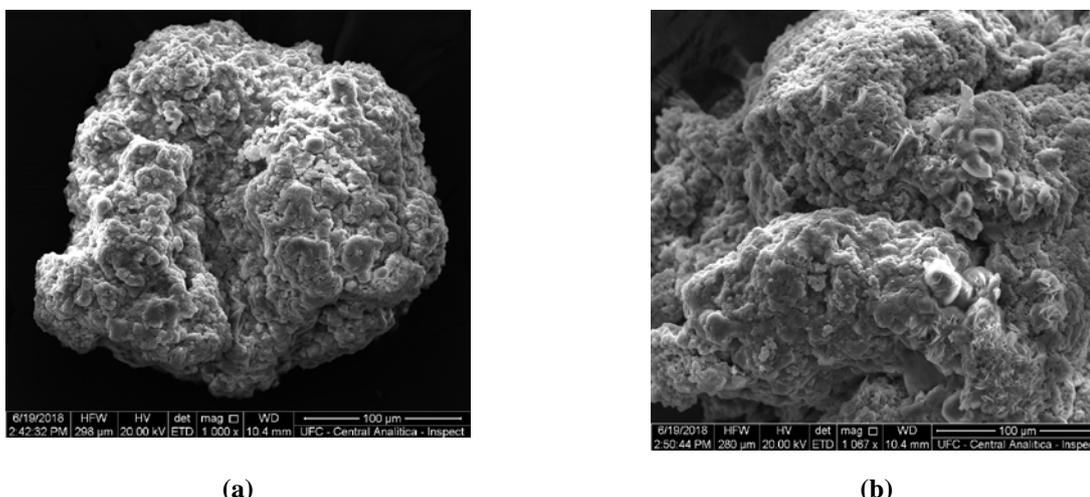
Tabela 1: Performance operacional do LGA cultivado em RBS em regime de alimentação/descarte simultâneo

Etapa		I	II	III	IV
Duração (dias)		39	60	49	63
Tempo de Sedimentação (min)		30	15	10	5
DQO	Afluente (mg·L ⁻¹)	985 (123)	776 (107)	694 (86)	694 (149)
	Efluente (mg·L ⁻¹)	31 (24)	54 (38)	21 (17)	28 (15)
	Eficiência (%)	94 (2)	93 (5)	97 (2)	96 (3)
Frações Nitrogenadas	NH ₄ ⁺ - Afluente (mg N-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	114.2 (15.5)	96.5 (8.0)	90.7 (6.2)	92.3 (7.6)
	NH ₄ ⁺ - Efluente (mg N-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	3.7 (2.5)	14.9 (6.6)	10.3 (6.4)	10.2 (6.3)
	NO ₂ ⁻ - Efluente (mg N-NO ₂ ⁻ .L ⁻¹)	8.7 (1.4)	8.4 (3.8)	13.1 (5.4)	4.2 (3.6)
	NO ₃ ⁻ - Efluente (mg N-NO ₃ ⁻ .L ⁻¹)	45.1 (15.4)	26.4 (12.2)	25.4 (7.4)	23.7 (6.8)
	Eficiência de Nitrificação (%)	96.7 (9.6)	81.9 (10.4)	80.4 (7.6)	83.2 (6.4)
	Eficiência de Desnitrificação (%)	34.8 (8.9)	40.9 (12.3)	26.9 (10.4)	48.5 (10.1)
pH	Afluente	7.4 (0.5)	7.5 (0.3)	7 (0.5)	7.5 (0.2)
	Efluente	7.8 (0.4)	8.0 (0.2)	7.6 (0.3)	7.5 (1)
Alcalinidade Total	Afluente (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	694 (204)	783 (130)	631 (130)	723 (68)
	Efluente (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	275 (172)	457 (157)	312 (116)	367 (165)
Fósforo	Afluente (mg P-PO ₄ ³⁻ .L ⁻¹)	7.5 (0.7)	7.6 (1)	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)
	Eficiência (%)	39.1 (10.2)	56.5 (14)	37.9 (14)	22.6 (8.5)

O desvio padrão é mostrado entre parênteses.

A abundância de NO_x pode, também, ter favorecido o metabolismo dos organismos desnitrificantes acumuladores de fósforo (DPAOs) sobre os PAOs. Contudo, como os DPAOs degradam substratos anaerobicamente, elas ainda estariam competindo com os microrganismos heterotróficos desnitrificantes e, geralmente, perdendo a competição. Adicionalmente, PAOs competem diretamente com microrganismos acumuladores de glicogênio (GAOs), os quais se mostraram mais abundantes, conforme demonstrado adiante nas análises de microbiologia molecular.

A morfologia dos grânulos (Figura 1) foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a partir de coletas realizadas ao final da Etapa IV. Percebe-se que a superfície dos grânulos possuía uma estrutura bastante consistente, sem grandes espaços vazios, e bem delineada (Figura 1a). Verifica-se a presença frequente de colônias de bactérias com morfologia de bacilos e cocos na matriz de sustentação dos grânulos, assim como não foram encontrados filamentos no lodo estudado, indicando que eram formados predominantemente por microrganismos esféricos e densos (Figura 1b). Essas observações foram fundamentais para a identificação da estrutura dos grânulos, com a evidência da coesão destes devido à ausência de cristais inorgânicos e material orgânico diferenciado do material amorfo que envolvia toda a superfície dos grânulos.



(a)

(b)

Figura 1: Morfologia dos grânulos formados em RBS volume constante. (a) Visão geral do grânulo obtida por MEV. (b) Especificação de colônias de bactérias com estruturas esféricas

Com relação à resistência, os valores do coeficiente de estabilidade (S) foram de $27 \pm 5\%$. A resistência física é um parâmetro chave para descrever as características dos grânulos, já que representa a capacidade de manter-se íntegro quando submetido a uma situação de estresse com grande tensão de cisalhamento. De acordo com a metodologia citada por Nor-Anuar et al. (2012), pode-se observar que os grânulos foram classificados como não resistentes.

Outro parâmetro essencial para a caracterização dos grânulos é a estrutura do SPE. As concentrações de polissacarídeos (PS) e proteínas (PN) ao final da etapa IV são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros relacionados ao SPE no lodo granular aeróbio (Etapa IV)

PARÂMETRO	CONCENTRAÇÃO	UNIDADE
PS	93 ± 8	mg PS g^{-1} SSV
PN	44 ± 5	mg PN g^{-1} SSV
PS/PN	2,1	-

A análise do metagenoma para detecção das comunidades microbianas foi realizada ao final do processo de granulação, assim como no lodo de inóculo, levando-se em consideração a abundância relativa superior a 10%. Foram encontradas 26505 sequências no lodo de inóculo e 47276 no lodo granular, refletidas em 1731 e 2736 unidades taxonômicas operacionais (OTUs), respectivamente. Com relação ao índice de cobertura de Good,

que avalia a representatividade do conjunto de resultados obtidos e o quanto reproduzem a comunidade observada, o inóculo apresentou 99,24%, e os grânulos 98,51%, mostrando excelente cobertura.

Os valores de riqueza de espécies e indicadores de diversidade (mostrados na Tabela 3) são consideravelmente maiores no lodo granular existente ao final do experimento, em comparação ao lodo de inóculo, revelando que não houve uma forte seleção de espécies ao usar o regime de alimentação/descarte simultâneos no RBS. Quando são comparadas as diversidades das amostras, os lodos estudados tiveram valores divergentes em termos de espécies dominantes (parâmetro Inverso de Simpson), e do Índice de Shannon, que reflete a variedade e a complexidade de espécies de uma comunidade. Assim, foram encontrados valores de 22,3 e 23,4 para o parâmetro Inverso de Simpson, comparando-se o lodo de inóculo e granular, respectivamente; e 5,1 e 5,0, respectivamente, para o parâmetro Índice de Shannon. Os índices Chao1 e ACE, que avaliam a abundância numérica baseada no número de OTU de uma comunidade, foram significativamente mais elevados no lodo granular gerado quando comparado ao lodo de inóculo, sugerindo que houve aumento da riqueza da biomassa cultivada.

Tabela 3: Riqueza de espécies e indicadores de diversidade de populações de microrganismos no LGA

AMOSTRA	COBERTURA (%)	INVERSO DE SIMPSON	ÍNDICE DE SHANNON	CHAO1	ACE
LODO DE INÓCULO	99,2	22,3	5,1	1762	1838
LODO GRANULAR	98,5	23,4	5,0	3024	3275

Dependendo da estratégia, é possível produzir grânulos com composição biológica mais variada e mais limitada. Tao et al. (2017), avaliando o efeito de carvão granular ativado nas comunidades microbiológicas em grânulos aeróbios, observaram que menores índices de riquezas e diversidades foram encontrados, mesmo no sistema controle, com ciclos de 4,8 h com parcela anaeróbia de 34%, aeróbia de 60% e curto período de sedimentação (5 min). He et al. (2016), operando o sistema com ciclos de ambientes anaeróbio (37%), aeróbio (37%) e anóxico (29%), obtiveram grânulos mais ricos e diversos que o lodo de inóculo.

Considerando a abundância relativa da comunidade microbiana no nível de filo, Proteobacteria, Planctomycete, Chloroflexi, Chlorobi, Bacteroidete e Acidobacteria foram dominantes no lodo de inóculo e no lodo granular (Figura 2a). A composição das comunidades bacterianas no lodo de inóculo e nos grânulos são apresentados na Figura 2. De fato, muitos estudos têm demonstrado que estes são os filos mais comuns a serem observados em sistemas de lodo granular aeróbio (FAN et al., 2018; OU et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

As classes Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria, que pertencem ao filo Proteobacteria, representam uma variedade de famílias relacionadas à produção de SPE (RAMOS et al., 2015), tendo apresentado abundâncias de 22% e 20% no lodo granular, respectivamente, conforme mostra a Figura 2b.

A afiliação taxonômica a nível de família foi utilizada para inferir os grupos funcionais relacionados à remoção de C, N e P. As famílias foram divididas em: AOB, bactérias desnitrificantes (DNB), organismos acumuladores de glicogênio (GAOs), NOB e PAOs. A abundância de AOB no reator foi próxima da alcançada pelas NOB. Isso sugere que a oxidação de amônia e nitrito teriam ocorrido em níveis similares. Entretanto, comparando as Etapas IV e I, uma maior acumulação de amônia foi encontrada na Etapa IV (Tabela 1), com uma menor concentração de nitrito no efluente. Isso pode ser explicado pelo fato de que a taxa de conversão de amônia em nitrito é geralmente lenta, enquanto o nitrito é usualmente convertido em nitrato quase que imediatamente (EKAMA e WENTZEL, 2008).

Hyphomonadaceae, Comamonadaceae, Dermabacteraceae, Planctomycetaceae e Sinobacteraceae foram as famílias de DNB mais observadas na análise. O LGA apresentou maior presença de DNB quando comparado ao lodo de inóculo. O gênero *Thauera* cresceu abundantemente, apresentando percentuais de 3% no lodo de inóculo e de 15% no LGA, e é característico de indivíduos que reduzem NO_x com a presença de etanol (Zhou et al., 2015).



O crescimento da abundância de DNBs no lodo granular parece contradizer os baixos níveis de desnitrificação obtidos (Tabela 1). Uma possível explicação é que no começo de cada ciclo havia abundância de substrato (etanol), ausência de oxigênio e muito nitrogênio nas formas oxidadas (devido à acumulação do ciclo anterior), resultando em um crescimento das DNB. É provável que as DNB consumiriam a maior parte do nitrito e nitrato disponíveis antes da fase aeróbia. Quando o oxigênio retornasse ao processo novamente, o substrato restante seria consumido aerobiamente por bactérias heterotróficas ordinárias, após as quais as AOB e NOB poderiam usar o oxigênio restante para a nitrificação, aumentando a concentração de NO_x . No entanto, a desnitrificação não pôde ocorrer devido à falta de substrato e presença de oxigênio dissolvido. Portanto, o NO_x acumula-se no sistema e a eficiência de desnitrificação é baixa, mesmo quando as DNB estão em abundância.

Em relação aos microrganismos GAOs e PAOs, a abundância e diversidade dos primeiros foi consideravelmente maior, o que corrobora a hipótese de que durante a fase anaeróbia a fonte de carbono e a presença de NO_x favoreceram as DNB e os GAOs sobre os PAOs. Além disso, como as abundâncias de DNB e PAOs são similares, é possível que a competição entre esses dois microrganismos tenha sido menos relevante quando comparada à competição entre GAOs e PAOs.

Candidatus Alysiosphaera também estava presente no LGA (0,63%). Esses microrganismos são responsáveis pela degradação de aminoácidos e muitos açúcares, especialmente o etanol, sendo consumidores de polihidroxialcanoatos (PHA) em ambientes anóxicos (DPAOs) (KRAGELUND et al., 2006). Sua menor abundância indica que os DPAOs não poderiam prevalecer sobre os GAOs ou DNB na competição por substrato, que também contribuiu para as baixas eficiências de desnitrificação e remoção de fósforo encontradas no sistema.

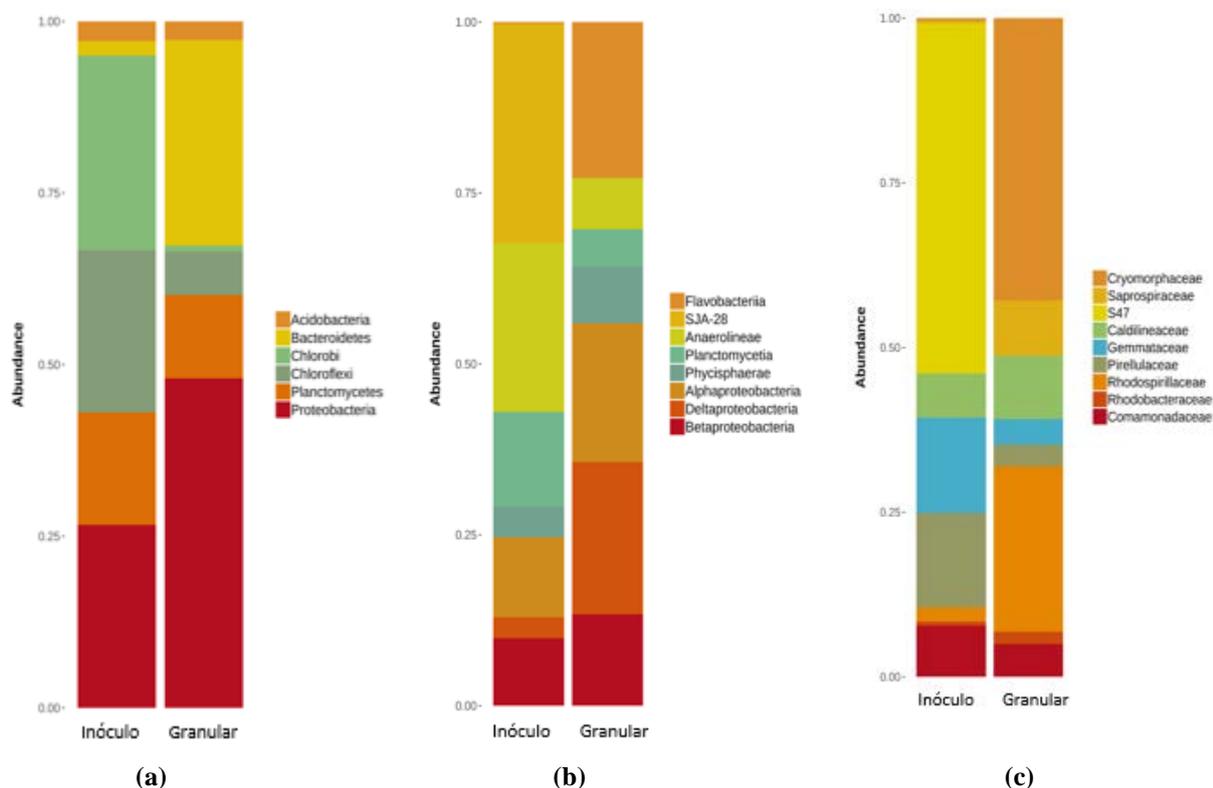


Figura 2: Comunidade microbiana nos níveis de Filo (a), Classe (b) e Família (c) do LGA cultivado em RBS em regime de alimentação/descarte simultâneo

CONCLUSÕES/RECOMENDAÇÕES

A formação de grânulos a partir de sistemas RBS com alimentação/descarte simultâneos foi alcançada, obtendo-se grânulos com boa sedimentabilidade. Estes se mostraram bem consistentes, com predominância de microrganismos esféricos, conferindo boa sedimentabilidade, porém, baixa resistência ao cisalhamento. Nota-se

que ao longo do processo de maturação dos grânulos, mesmo com a transformação do lodo ativado em lodo granular aeróbio, as eficiências de remoção de nutrientes e DQO não tiveram alterações notórias. A maior diversidade microbiana no LGA, em comparação ao lodo de inóculo, permite concluir que o regime de alimentação/descarte simultâneo não impõe uma elevada pressão de seleção, favorecendo a maior riqueza e diversidade no grânulo formado. A presença de diferentes famílias, AOB, NOB, DNB, GAOs e PAOs explica os mecanismos de elevada remoção de matéria orgânica e acúmulo NO_x no efluente, que possivelmente prejudicou a remoção de fósforo do sistema.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAV, S. S.; LEE, D.J.; LAI, J.Y., Treating Chemical Industries Influent Using Aerobic Granular Sludge: Recent Development, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 40, p. 333–336, 2009.
2. ADAV, S.S. et al. Aerobic granular sludge: recent advances, *Biotechnol. Adv.* v.26, p. 411–423, 2008.
3. BENGTTSSON, S. et al. A comparison of aerobic granular sludge with conventional and compact biological treatment technologies. *Environ. Technol.* 13, 1479–1487, 2018..
4. CHUANG, S.H.; OUYANG, C.F.; WANG, Y.B. Kinetic competition between phosphorus release and denitrification on sludge under anoxic condition. *Water Res.* 30, 2961–2968, 1996.
5. DE KREUK, M.K., KISHIDA, N., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Aerobic granular sludge - State of the art. *Water Sci. Technol.* 55, 75–81, 2007.
6. ROLLEMBERG, S. L. S et al. Aerobic granular sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms. *Bioresource Technology*, 270, 678–688, 2018.
7. 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.
8. EKAMA, G.A., Wentzel, M.C. Nitrogen Removal, in: Henze, M., Loosdrecht, M.C.M. van, Ekama, G.A., Brdjanovic, D. (Eds.), *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing, p. 528, 2008..
9. FAN, X.Y. et al. Shifts in bacterial community composition and abundance of nitrifiers during aerobic granulation in two nitrifying sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* 251, 99–107, 2018.
10. HE, Qiulai et al. Microbial population dynamics during sludge granulation in an A/O/A sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 214, 1–8, 2016.
11. 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*, 263, 214–222, 2018.
12. KRAGELUND, C. et al. Ecophysiology of different filamentous Alphaproteobacteria in industrial wastewater treatment plants. *Microbiology* 152, 3003–3012., 2006.
13. LI, X.M. et al. Enhanced aerobic sludge granulation in sequencing batch reactor by Mg^{2+} augmentation. *Bioresour. Technol.* 100, 64–67, 2009.
14. LONG, Bei et al. Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 166, 657–653, 2014.
15. NEREDA, 2017. Aerobic Granular Sludge Demonstration. BACWA, Netherlands.
16. NG, Kok Kwang et al. Pyrosequencing reveals microbial community profile in anaerobic bio-entrapped membrane reactor for pharmaceutical wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 200, 1076–1079, 2016.
17. Nor-Anuar, A. et al. Strength characteristics of aerobic granular sludge. *Water Sci. Technol.* 65, 309–316, 2012..
18. OU, D. et al. Salt-tolerance aerobic granular sludge: Formation and microbial community characteristics. *Bioresour. Technol.* 249, 132–138, 2018.



19. 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. *Bioresour. Technol.* 198, 844–851, 2015.
20. 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.
21. TAY, J.H., LIU, Q.S., LIU, Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 222–226, 2001.
22. 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.
23. ZHANG, D. et al. Aerobic granulation accelerated by biochar for the treatment of refractory wastewater. *Chem. Eng. J.* 314, 88–97, 2017.
24. ZHOU, Z. et al. Microbial community structure of anoxic-oxic-settling-anaerobic sludge reduction process revealed by 454-pyrosequencing. *Chem. Eng. J.* 266, 249–257. 2015.