



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

TALITA JÉSSICA TAVARES MARINHO

CULTIVO DE CONSÓRCIO GRANULAR ALGAL-BACTERIANO EM
FOTOBIOREADORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS VISANDO À REMOÇÃO DE
NUTRIENTES E MATÉRIA ORGÂNICA

Recife

2020

TALITA JÉSSICA TAVARES MARINHO

**CULTIVO DE CONSÓRCIO GRANULAR ALGAL-BACTERIANO EM
FOTOBIOREADORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS VISANDO À REMOÇÃO DE
NUTRIENTES E MATÉRIA ORGÂNICA**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção de título de Mestre em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florêncio dos Santos

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

M338c

Marinho, Talita Jéssica Tavares.

Cultivo de consórcio granular algal-bacteriano em fotobioreatores em bateladas sequenciais visando à remoção de nutrientes e matéria orgânica / Talita Jéssica Tavares Marinho – Recife, 2020.

96 f.: figs., tabs., abrev. e siglas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Florêncio dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Engenharia civil. 2. Tratamento de efluente de baixa carga orgânica. 3. Simbiose alga-bactéria. 4. Fotobioreatores em bateladas sequenciais. 5. Fotogrânulo aeróbio. I. Santos, Maria de Lourdes Florêncio dos (Orientadora). II. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG / 2020-158

TALITA JÉSSICA TAVARES MARINHO

**CULTIVO DE CONSÓRCIO GRANULAR ALGAL-BACTERIANO EM
FOTOBIOREATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS VISANDO À REMOÇÃO DE
NUTRIENTES E MATÉRIA ORGÂNICA**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção de título de Mestre em Engenharia Civil.

Aprovada em: 17/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos - UFPE
(orientadora)

Prof.^a Dr.^a Rejane Helena Ribeiro da Costa - UFSC
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Bruna Scandolaro Magnus – UFPE
(examinadora interna)

Aos meus pais por sempre terem incentivado na minha formação acadêmica e por acreditarem em mim, meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por estar sempre comigo, me guiando e fornecendo discernimento nos momentos bons e ruins.

Aos meus pais, Enauto Tavares e Iêda Tavares, por todo apoio, amor e carinho durante toda minha vida. Muito obrigada por todos ensinamentos nesses 26 anos. Um cuidando do outro sempre. À minha avó Lêda, por ter ajudado na minha educação. Serás sempre lembrada por nós. À minha sobrinha, Maria Eduarda, e minha irmã, Camylla Tavares, por todos os momentos de distração.

À minha orientadora, que tanto admiro, Dr^a. Lourdinha Florêncio, por sempre acreditar em seus alunos e proporcionar grandes aprendizados. Ao meu professor, Dr. Mario Kato, por ter levantado este laboratório tão incrível. Ao professor, Dr. Wanderli Leite, por ter sugerido este tema fascinante e ter sempre ajudado nas discussões de resultados e na análise estatística. Ao professor, Dr. Fabricio Motteran e Dra. Bruna Magnus, pela disponibilidade e disposição em ajudar a todos do laboratório. Aos técnicos por estarem sempre conosco: Ronaldo Fonseca, Danúbia e Iago.

Ao meu namorado, Getulio Lira, por ter me ajudado tanto durante o experimento. Por ter montado toda parte elétrica do sistema; ter vindo quase todos os finais de semana para ver meus filhos; por me incentivar nos concursos; e por ter auxiliado nas coletas a noite. Sem você teria sido muito mais difícil. À minha nova família, por sempre serem tão maravilhosos comigo.

Ao grupo consórcio alga-bacteriano, Marcos Sales, Ana Alice e Matheus Cavalcante, muito obrigada terem me ajudado bastante, em especial Ana Alice por ter sido uma amiga companheira. Você merece o mundo! Às minhas amigas do grupo grânulos aeróbios, Ouci e Ju, por sempre esclarecem todas minhas dúvidas sobre o sistema de LGA e sobre o aparato experimental. Além destes, todos os demais por terem me ajudado de certa forma: Nathy, Amandinha, Paulinho, Celinha, Marcos R., Toinho, BK, Ida, Duda, Bianca, Lu, Henrique, Lila, Babi, Julia, Belle, Luis, e Marcus Vinícius, por ter auxiliado na extração do DNA, tirado as dúvidas sobre o experimento e por ter feito o incrível aparato experimental dos meus reatores.

À COMPESA e BRK Ambiental, Fibra Técnica Ltda, FINEP, FACEPE, CAPES e INCT-ETEs Sustentáveis por todo apoio a todos que fazem parte do LSA. Em especial à CNPq, que me contemplou com a bolsa de pesquisa, muito obrigada.

RESUMO

Com a necessidade de obter sistemas de tratamento com bom desempenho na remoção de nutrientes e matéria orgânica carbonácea, a aplicação do consórcio de grânulos aeróbios e microalgas vem sendo extensivamente estudada. Por ser uma tecnologia recém desenvolvida, este estudo teve como objetivo aplicar diferentes condições operacionais no desenvolvimento de fotogrânulos aeróbios, visando à remoção simultânea de nutrientes e matéria orgânica carbonácea. Dois fotobioreatores de escala de bancada ($V_u=3,5L$) foram operados em bateladas sequenciais (FRBS) com ciclos operacionais de 4hrs, durante 180 dias. Os FRBS foram submetidos à três fases distintas (FI, FII e FIII). FI (70 dias): influência do modo de alimentação na formação granular (R1: 40 min de alimentação anaeróbia/anóxica; R2: 60 min de alimentação anaeróbia/anóxica e C:N=4:1); FII (70 dias): avaliação do efeito da relação C:N (ambos reatores C:N=8:1) na performance dos FRBS; FIII (42 dias): investigar o efeito da carga orgânica aplicada (R1: 1,7 kgDQO/m³.d) e da taxa de aeração (R2: Var: 0,3 cm/s) na eficiência de desnitrificação. Ambos FRBS trataram esgoto sintético (DQO= 400mg/L) sob temperatura de clima tropical ($29\pm 2^\circ C$). Os resultados revelaram que a fotogranulação foi observada na FI em ambos reatores, porém mais rapidamente em R2 (40 dias), ao passo que em R1 foi observada somente 55 dias de operação, indicando que o modo de alimentação influencia na formação fotogranular. Durante a FI, ambos reatores apresentaram baixas eficiências de remoção de nutrientes e matéria orgânica, na ordem de $59\pm 15\%$, $18\pm 6\%$ e $73\pm 10\%$ para R1 e $58\pm 17\%$, $19\pm 10\%$ e $73\pm 10\%$ para R2, para N-NH₄⁺, PT e DQO, respectivamente. Na FII, o aumento da relação C:N de 4:1 para 8:1 favoreceu a remoção simultânea de nitrogênio (>93%) e matéria orgânica (>95%) além disto, apresentou eficiência de desnitrificação de 42% para R1 e 51% para R2, indicando que a duração da fase anaeróbia de 60 min favoreceu a etapa de desnitrificação, porém as remoções de fósforo permaneceram baixas. Durante a FIII, R1 obteve maior eficiência de desnitrificação (67%), quando comparado com R2. Além disso, foi observado desintegração granular no R2, devido ao surgimento de microrganismos filamentosos, porém as remoções de nitrogênio e matéria orgânica permaneceram altas ($95\pm 5\%$ e $94\pm 5\%$ para N-NH₄⁺ e DQO, respectivamente). Assim, neste estudo a interação alga-bactéria no grânulo aeróbio foi uma associação harmônica, apresentando resultados promissores no tratamento de esgoto doméstico de baixa carga orgânica.

Palavras-chave: Tratamento de efluente de baixa carga orgânica. Simbiose alga-bactéria. Fotobioreatores em bateladas sequenciais. Fotogrânulo aeróbio.

ABSTRACT

To obtain a treatment system with an excellent performance of nutrients and organic matter removal, the application of the aerobic granules and microalgae consortium has been extensively studied. As a newly developed technology, this study aimed to apply different operational conditions in the development of aerobic photogranules, aiming the simultaneous removal of nutrients and organic matter. Two bench scale sequencing batch photobioreactors (SBPR) ($V_u = 3.5$ L) and operational cycles of 4hrs for 180 days. The SBPR were submitted to three distinct phases (FI, FII and FIII). FI (70 days): influence of the feeding mode on the photogranular formation (R1: 40 min of anaerobic/anoxic feeding; R2: 60 min of anaerobic/anoxic feeding and C: N = 4:1); FII (70 days): evaluation of the effect of the C: N ratio (C: N = 8:1 for both reactors) on SBPR's performance; FIII (42 days): to investigate the effect of applied organic load (R1: 1.7 kgDQO / m³.d) and aeration rate (R2: V_{air} : 0.3 cm/s) on denitrification efficiency. Both SBPR treated synthetic sewage (COD = 400mg/L) under a tropical climate temperature ($29 \pm 2^\circ\text{C}$). The results revealed that the photogranulation process was observed in both reactors during FI, however faster in R2 (40 days), and R1 was observed only after 55 operational days, indicating that the duration of 60 minutes of anaerobic phase favored the formation of the photogranule. During FI, both reactors showed low efficiency of nutrients and organic matter, in order of $59 \pm 15\%$, $18 \pm 6\%$ and $73 \pm 10\%$ for R1 and $58 \pm 17\%$, $19 \pm 10\%$ and $74 \pm 10\%$ for R2, for N-NH₄⁺, TP and COD, respectively. The increase of the C:N ratio from 4:1 to 8:1, favored the simultaneous nitrogen (>93%) and organic matter (>95%) removal, besides improved the denitrification efficiency to 42% for R1 and 51% for R2, indicating that the duration of the anaerobic phase of 60 min affected the nitrogen forms, possibly producing a greater fraction of N₂. On the other hand, the removal of phosphorus remained low. During FIII, R1 achieved better denitrification efficiency (67%), when compared to R2. Besides, granular disintegration was observed in R2 due to appearance of filamentous microorganisms, however nitrogen and organic matter removals remained high ($95 \pm 5\%$ and $94 \pm 5\%$ for N-NH₄⁺ and COD, respectively). Thus, this study, was understood that the alga-bacteria interaction in the aerobic granule was a harmonic association, presenting promising results on wastewater treatment of a low organic load sewage.

Keywords: Wastewater treatment of low organic load. Symbiosis algal-bacterial. Sequential batch photobioreactors. Aerobic photogranule.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação gráfica da distribuição dos microrganismos no interior do lodo granular aeróbio	21
Figura 2-	Sistema de (a) lagoas de alta taxa para produção de biomassa algal e (b) biogrânulos a partir do consórcio algal-bacteriano	27
Figura 3-	Esquemática da formação do consórcio algal-bacteriano.....	29
Figura 4-	Demonstração da interação de microalga com bactérias na formação do biofilme granular	30
Figura 5-	Fixação do carbono pelas células microalgais	33
Figura 6-	Mecanismos de nitrificação e desnitrificação simultânea no interior da biomassa granular	35
Figura 7-	Resumo esquemático das principais etapas metodológicas do trabalho de pesquisa	37
Figura 8-	Procedimento do cultivo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em sala fria.....	38
Figura 9-	Esquema de repicagem das cepas de microalgas.....	38
Figura 10-	Procedimento de contagem celular algal utilizando a câmara de Bruker. Exemplo de contagem da microalga utilizada neste estudo.....	40
Figura 11-	Fotobioreatores em operação.....	41
Figura 12-	Layout do esquema operacional dos fotobioreatores.....	42
Figura 13-	Detalhamento dos ciclos operacionais dos fotobioreatores em cada condição operacional. Alimentação anaeróbia/anóxica (■), fase aeróbia (■), Sedimentação (■) e Descarte do efluente ()	47
Figura 14-	Distribuição granulométrica da biomassa dos fotobioreatores durante as três condições operacionais	57
Figura 15-	Variação da concentração de IVL ₅ e IVL ₃₀ dos fotobioreatores durante as três condições operacionais	59
Figura 16-	Inóculo do sistema observado no microscópio com ampliação de 100x do lodo aeróbio (a esquerda) e da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> (a direita)	60

Figura 17-	Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do R1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x (Barra 0,2 mm)	62
Figura 18-	Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do R2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x (Barra 0,2 mm).....	63
Figura 19-	Aspecto da biomassa após (a) 50 dias de operação (b) 70 dias de operação, (c) 120 dias operação. (d) Biomassa granular e flocos de microalgas filamentosas aos 110 dias de operação. (e) Biomassa granular do R1 no dia 180. (f) Biomassa desintegrada do R2 no dia 180	65
Figura 20-	Acompanhamento do aparecimento de microalgas no R1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 400x. (Barra de 0,4 μ m).....	67
Figura 21-	Acompanhamento do aparecimento de microalgas no R2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 400x. (Barra de 0,4 μ m).....	68
Figura 22-	Aparecimento de (a) floco de cianobactérias no 100 dia de operação em ambos reatores no dia 130 (b) Ampliação de 100x no microscópio	69
Figura 23-	Fotografias tiradas no microscópio de microrganismos encontrados no dia 150. (a) Vorticella com ampliação de 400x, (b) Vorticella com ampliação de 100x, (c) Zooglea com ampliação de 100x (d) Bactérias filamentosas na ampliação de 100x (Barra de 0,1 mm)	70
Figura 24-	Variação das concentrações de clorofila-a durante as três condições operacionais.....	71
Figura 25-	Variação das concentrações de PN, PS e relação PN/PS durante as três estratégias operacionais.....	73
Figura 26-	Biofilme formado por microalgas (a) aderidas na parede do R2 no dia 130 (b) Biofilme com ampliação de 100x (Barra de 0,2 mm) (c) Biofilme com ampliação de 400x (Barra de 0,2 μ m).....	74
Figura 27-	Comportamento das concentrações de biomassa nos FRBS e no efluente durante as três estratégias operacionais.....	76
Figura 28-	Variações nas concentrações de DQO no efluente, afluente e eficiência de remoção durante as três condições operacionais.....	79

Figura 29-	Variações nas concentrações de N-NO ₂ - e N-NO ₃ - no efluente e N-NH ₄ ⁺ afluente e eficiência de remoção de N-NH ₄ ⁺ durante as três estratégias operacionais	81
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Resumo de estudos com consórcio granular algal-bactéria tratando esgoto sintético	32
Tabela 2-	Composição do meio comercial Provasoli® com vitaminas do complexoB.....	39
Tabela 3-	Solução de macro e micronutrientes utilizados no esgoto sintético.....	43
Tabela 4-	Resumo das condições operacionais dos reatores durante a FI.....	44
Tabela 5-	Resumo das condições operacionais do reator durante a Fase III.	46
Tabela 6-	Síntese das condições estratégicas e objetivos adotados.....	46
Tabela 7-	Parâmetros físico-químicos monitorados no afluente (AF), após alimentação a anaeróbia (AN), efluente final (EF), Licor misto (LM).....	48
Tabela 8-	Características do esgoto sintético.....	53
Tabela 9-	Síntese dos resultados obtidos a cerca da caracterização da biomassa abordando as três condições operacionais.....	54
Tabela 10-	Síntese do desempenho dos reatores no tratamento de esgoto abordando as três condições operacionais.....	55
Tabela 11-	Média das concentrações de EPS total e frações de PS e PN para R1 e R2.....	73

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
Cl-a	Clorofila a
DQO	Demanda química de oxigênio
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i> (Substâncias poliméricas extracelulares)
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FRBS	Fotobioreator em batelada sequencial
GAO	<i>Glycogen accumulating organisms</i> (organismos acumuladores de glicogênio)
IVL	Índice volumétrico de lodo
LA	Lodos ativados
LAT	Lagoa de alta taxa
LGA	Lodo granular aeróbio
OD	Oxigênio dissolvido
PAO	<i>Polyphosphate-accumulating organisms</i> (organismos acumuladores de polifosfato)
PN	Proteína
PS	Polissacarídeo
RBS	Reator em batelada sequencial
RuBisCO	<i>Ribulose Biphosphate Carboxylase/Oxygenase</i>
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS GERAL E ESPÉCIFICOS.....	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA).....	20
2.2	TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES POR MICROALGAS.....	22
2.3	INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS AMBIENTAIS NO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS.....	24
2.4	INTERAÇÃO ALGA-BACTÉRIA	26
2.5	FORMAÇÃO FOTOGRÂNULOS AERÓBIOS.....	29
2.6	REMOÇÃO BIOLÓGICA DE MATÉRIA ORGÂNICA E NUTRIENTES.....	31
3	METODOLOGIA.....	37
3.1	CULTIVO DA MICROALGA – <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	38
3.2	SISTEMA EXPERIMENTAL.....	40
3.3	CONDIÇÕES OPERACIONAIS DOS REATORES.....	44
3.4	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	47
3.5	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	48
3.5.1	Índice volumétrico do lodo (IVL)	49
3.5.2	Granulometria por peneiramento.....	49
3.5.3	Substâncias poliméricas específicas (EPS).....	49
3.5.4	Clorofila-a	50
3.5.5	Microscopia.....	50
3.6	CÁLCULOS REALIZADOS.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO AFLUENTE.....	53

4.2	SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS FRBS ABORDANDO AS DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS....	54
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	56
4.3.1	Distribuição granulométrica da biomassa	56
4.3.2	Característica de sedimentabilidade (IVL).....	58
4.3.3	Formação dos fotogrânulos aeróbios.....	60
4.3.4	Surgimento das microalgas.....	65
4.3.5	Clorofila-a.....	71
4.3.6	EPS.....	72
4.3.7	Desenvolvimento de biofilme na parede do reatores.....	73
4.3.8	Comportamento do crescimento da biomassa.....	75
4.4	PERFORMANCE DOS REATORES.....	78
4.4.1	Remoção da matéria orgânica carbonácea.....	78
4.4.2	Remoção do material nitrogenado.....	80
4.4.3	Remoção de fósforo total.....	83
5	CONCLUSÕES.....	86
6	RECOMENDAÇÕES.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXO A – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	96

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a intensificação industrial e urbana tem gerado efluentes líquidos cada vez mais difícil de gerenciar, causando a poluição. O lançamento desses efluentes sem tratamento caracteriza um tipo muito frequente de poluição hídrica, a eutrofização. Este processo ocasionado pelo enriquecimento das águas com nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Dentre suas consequências, pode-se destacar a floração de algas, propagação de plantas aquáticas, perda de espécies, e depleção do oxigênio dissolvido no meio, resultando numa completa degradação hídrica (Branco, 1978). Visto isso, evidencia-se a necessidade do tratamento de esgoto antes de sua destinação final.

Dentre os diferentes tipos de tratamento utilizados, a aplicação da microalga visa, além da absorção de nutrientes, a produção de bioenergia a partir da biomassa algal (Gonçalves *et al.*, 2017). Porém, devido ao seu tamanho pequeno e baixa sedimentabilidade, é estimado que cerca de 20-30% do custo total do tratamento com microalga esteja relacionado a métodos de separação destas do efluente tratado, como centrifugação, coagulação, floculação, flotação, dentre outros (Cai *et al.*, 2019).

Visto isso, recentemente, estão sendo desenvolvidas pesquisas voltadas para a imobilização das microalgas no próprio efluente. O lodo granular aeróbio (LGA) está sendo bastante utilizado, pois serve como adesão celular, em que há a formação de biofilme na superfície sólida, devido à sua excelente sedimentabilidade, alta concentração de biomassa, e formação de uma estrutura densa de microrganismos (Tang *et al.*, 2016). Esses grânulos têm agregados grandes, limitando a difusão das moléculas de oxigênio, promovendo a formação de ambientes anóxicos e anaeróbios, além dos ambientes aeróbios, que promove o processo de remoção simultânea de nutrientes (Wang *et al.*, 2019).

A presença de microrganismos fotossintetizantes na superfície granular diminui a necessidade de inserção de oxigênio artificial na etapa de aeração, uma vez que as microalgas produzem oxigênio fotossintético que é utilizado pelas bactérias aeróbias heterotróficas no processo de degradação de poluentes orgânicos. Essas, por sua vez, liberam CO₂ durante o processo de respiração, necessário para a atividade fotossintética das algas (Hoh, Watson, e Kan 2016). A aeração fotossintética reduz a taxa de aeração artificial, apresentando uma vantagem no tratamento de compostos biodegradados aerobiamente e que, possivelmente, seriam volatilizados durante o

mecanismo de aeração, além de reduzir os custos operacionais (Ji *et al.*, 2018). Altas concentrações de oxigênio dissolvido podem gerar dano foto-oxidativo nas células das microalgas, diminuindo a eficiência de tratamento. Felizmente, no consórcio alga-bactérias, a saturação do oxigênio dissolvido não apresenta um problema no tratamento, devido ao consumo contínuo deste pelas bactérias heterotróficas (Muñoz e Guieysse 2006). Além disso, pode melhorar a performance do sistema na remoção de nutrientes, uma vez que as microalgas são capazes de absorver os nutrientes do meio para seu crescimento.

A partir desta vertente, Li *et al.* (2015) evidenciaram que, mesmo sem a inoculação de microalgas, foi observado o aparecimento destas na superfície granular em fotobioreatores em bateladas sequenciais, comprovando o sucesso da formação do consórcio granular aeróbio algal-bacteriano. Mais a frente, Liu *et al.* (2018) obtiveram excelentes resultados, principalmente na remoção de nitrogênio e fósforo com 50,2% e 34,7%, respectivamente, quando cultivaram microalgas *Chorella sp.* e *Scenedesmus sp.* para atuar no consórcio com LGA. García *et al.* (2018) inocularam *Chlorella sp.*, *Acutodesmus obliquus* e *Oscillatoria sp.* no tratamento do efluente de suinocultura em fotobiorreatores, e constataram remoção de nitrogênio e fósforo superior a 82% e 90%, respectivamente. Li *et al.* (2018) cultivaram *Coelastrella sp.* para intensificar na remoção de nutrientes do efluente de um digestor anaeróbio de suinocultura, e a média da eficiência de remoção de fósforo total e nitrogênio amoniacal, foi de 79% e 80%, respectivamente.

O grupo de Saneamento Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) tem avançado significativamente nos estudos sobre LGA, desenvolvendo pesquisas desde 2013 com reatores em bateladas sequenciais de escala piloto tratando esgoto doméstico real de baixa carga orgânica. Ao longo dos 7 anos de estudo, diferentes condições operacionais foram testadas para avaliar a formação granular (troca volumétrica, velocidades ascensionais do ar, duração da fase anóxica/anaeróbia) (Araújo, 2016; Alves, 2017; Silva, 2017; Sales, 2018; Dantas, 2018). Entretanto, este estudo é o pioneiro do grupo de Saneamento Ambiental a desenvolver o consórcio granular algal-bacteriano, denominado fotogrânulo aeróbio.

A proposta deste estudo é desenvolver uma tecnologia de tratamento de esgoto para as condições reais do Brasil, que sustente uma condição de mitigação de gases de efeito estufa e a diminuição dos custos de aeração artificial, além da produzir uma biomassa biológica capaz de produzir bioenergia. Nesse contexto, teve como objetivo avaliar as características e a performance do consórcio granular alga-bactéria, inoculando a mistura de lodos ativados com a microalga alvo

(*Chlorella vulgaris*). Para tanto, o experimento foi planejados em três etapas, sendo elas: (i) cultivo da microalga *Chorella Vulgaris* isoladamente em meio de cultura Provasoli, (ii) aclimação do lodo coletado na Estação de Tratamento de Esgoto Janga – PE, com o efluente sintético utilizado no presente estudo, (iii) cultivo do fotogrânulo aeróbio em fotobiorreatores em bateladas sequenciais com ciclos de 4hrs, aplicando três condições operacionais para viabilizar a remoção de nutrientes e matéria orgânica.

1.1 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

O objetivo geral deste estudo foi estabelecer condições operacionais para o desenvolvimento de fotogrânulos aeróbios em fotobioreatores em bateladas sequenciais em escala de bancada, visando à remoção de nutrientes e matéria orgânica tratando esgoto sintético de baixa carga orgânica.

Como objetivos específicos, relacionam-se:

- Acompanhar o aparecimento das espécies de microalgas, e associá-las à formação dos fotogrânulos aeróbios;
- Avaliar a influência do tempo de alimentação anaeróbia/anóxica na formação do consórcio granular aeróbio;
- Investigar o efeito da relação C:N na remoção de nitrogênio e matéria orgânica;
- Analisar o impacto da variação da carga orgânica e da concentração de oxigênio dissolvido na remoção de nitrogênio.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Atualmente, existe uma grande variedade de tecnologia que pode ser aplicada no tratamento de águas residuárias, com intuito de obter eficientes remoções de nutrientes e matéria orgânica. Estas podem ser divididas em sistemas anaeróbios e aeróbios. O tratamento anaeróbio é muito comum no Brasil, e consiste na conversão do carbono orgânico em compostos energéticos, como biogás, permitindo a recuperação de energia elétrica. Apesar disto, não há remoção eficientemente de nutrientes, necessitando de outros processos de pós tratamento.

A remoção de nutrientes pode ser feita tanto por processos biológicos, associando ambientes aeróbios com ambientes anaeróbios/anóxicos, para auxiliar no processo de nitrificação e desnitrificação; como por processos químicos, principalmente por precipitação com sais de alumínio ou férrico. Uma desvantagem do processo químico é a produção de lodo carregado com altas concentrações de produtos químicos (Gonçalves *et al.*, 2017).

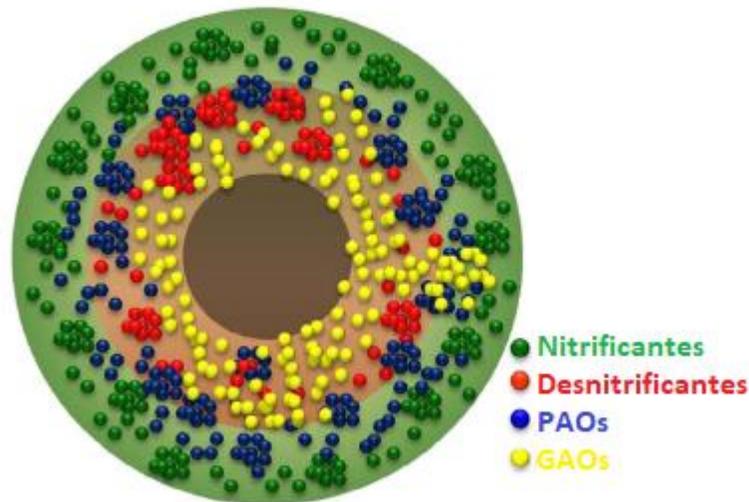
O tratamento biológico por via aeróbia, por sua vez, possibilita a obtenção de altas remoções de matéria orgânica e nutrientes. Um dos tratamentos mais bem conhecidos é o sistema de lodos ativados, que é composto por um tanque de sedimentação primário, um reator aeróbio e um tanque de sedimentação secundário. A eficiência de remoção de nitrogênio nesse sistema é alta, devido à oscilação dos ambientes aeróbios, anaeróbios e anóxicos, porém requer muita área para sua instalação e grande disponibilidade de energia, resultando num maior custo operacional. Além disso, este sistema não apresenta boa performance na remoção de fósforo. Para tanto, há necessidade de investimento na busca de otimização dos processos, como redução da área para construção e do consumo energético, além de exibir excelente performance na remoção de nutrientes e matéria orgânica.

2.1 LODO GRANULAR AERÓBIO (LGA)

Visto a necessidade de implantação de estruturas mais compactas, surgiu a tecnologia do LGA, que promove o tratamento de esgoto e separação da biomassa do efluente tratado em um único compartimento, reduzindo em 70% da área requerida para implantação, quando comparada com o sistema de lodos ativados (Franca *et al.*, 2018). Há algumas décadas, os grânulos aeróbios foram primeiro vistos num biorreator aeróbio de manta de lodo ascendente (Mishima e Nakamura,

1991), conhecidos como auto-agregado sob condições aeróbias, formados por microrganismos, sem a necessidade de adição de um material suporte (Franca *et al.*, 2018), com presença de microzonas aeróbias, anóxicas e anaeróbias, além de permitir o desenvolvimento de organismos acumuladores de fósforo (PAO) e acumuladores de glicogênio (GAO), como mostra a Figura 1. Desta forma, é possível a remoção simultânea de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica (de Kreuk *et al.*, 2006). Geralmente, os grânulos aeróbios são cultivados em reatores em bateladas sequenciais (RBS), que acomodam todos as etapas do sistema de lodos ativados em um único compartimento (Gao *et al.*, 2011).

Figura 1 - Representação gráfica da distribuição dos microrganismos no interior do lodo granular aeróbio



Fonte: Nancharaiah e Kiran Kumar Reddy, (2018)

A formação do grânulo aeróbio é influenciada por várias condições operacionais e hidráulicas, como composição do substrato, carga orgânica aplicada, força de tensão de cisalhamento, tempo de sedimentação. Além disso, foi observado que o cisalhamento hidrodinâmico influencia na produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que auxiliam na interação microbiana, induzindo o início do processo de granulação. Essas substâncias formam uma película composta por polissacarídeos e proteínas.

O cultivo dos grânulos aeróbios pode ser realizado com sucesso sob aplicação de diferentes substratos, como glicose, acetato, etanol, fenol (Rollemberg *et al.*, 2019). Esses autores afirmam que os grânulos aeróbicos alimentados com glicose exibem uma estrutura filamentosa, enquanto

os grânulos aeróbicos alimentados com acetato apresentam uma estrutura bacteriana não filamentosa e compacta na qual uma espécie semelhante a uma haste predomina. Além disso, sabe-se que os grânulos aeróbicos podem ser cultivados sob diferentes taxas de carga orgânica (2,5-15 kg DQO/ m³.d) (Liu e Tay 2004). Porém, as pesquisas desenvolvidas sobre LGA, pelo grupo de Saneamento Ambiental, cultivaram grânulos aeróbios operando RBSs tratando esgoto doméstico real de carga orgânica variando entre 0,8-1,8 kg DQO/m³.dia, sob clima tropical (29±2°C) (Araújo, 2016; Alves, 2017; Silva, 2017; Sales, 2018).

Uma das vantagens do LGA é a excelente capacidade de sedimentação. Devido à formação granular bacteriana, a biomassa apresenta excelente capacidade de separação do líquido, produzindo um efluente livre de sólidos. Outra vantagem é a economia energética, quando comparado com o sistema de lodos ativados. Na busca de maior eficiência energética, muitos cientistas estão aplicando aeração intermitente na etapa de reação do RBS, em que é diminuído o consumo energético sem prejudicar a eficiência do sistema (Mosquera-corrall *et al.*, 2005). Além disso, a interação de microrganismos autotróficos com bactérias heterotróficas vem emergindo de forma a diminuir a necessidade de aeração artificial (Tang *et al.* 2016).

2.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES POR MICROALGAS

A utilização de microalgas no tratamento de esgoto é uma abordagem promissora para a implementação de uma tecnologia sustentável, no ponto de vista econômico, ecológico e social (Wilson *et al.*, 2014). Uma das primeiras aplicações destas como tratamento terciário ocorreu na década de 70 por McGriff & McKinney (1972), porém devido à excelente performance no tratamento do esgoto, podem ser eficientemente utilizadas no tratamento secundário.

Além da excelente performance na assimilação de nutrientes, a biomassa algal possui alto teor lipídico intracelular, possibilitando a geração de produtos de valor agregado (Du *et al.*, 2019). Porém, devido ao pequeno tamanho e baixa sedimentabilidade das microalgas, é muito difícil promover a separação destas do efluente tratado sem a introdução de métodos de colheita, adsorção, centrifugação, filtração com membranas, flotação, aprisionamento celular dentro de uma matriz polimérica (normalmente alginato), dentre outros (Tao *et al.*, 2017). O uso destes já demonstrou aumento das produtividades de biomassa e pigmento e lipídios contido (Christenson e Sims 2011). No entanto, os custos onerosos associados à etapa de colheita podem ser um fator limitante

quando o objetivo é a utilização da biomassa algal na produção de produtos de valor agregado. Por este motivo, atualmente está sendo extensivamente aplicada a biofloculação das microalgas, e consiste na aderência das algas à superfície de lodo floculento (Li *et al.*, 2011) ou granular (Chandra *et al.*, 2019; Ummalyima *et al.*, 2017), formando agregados, sem a necessidade da adição de produtos químicos (Abinandan e Shanthakumar 2015).

Dentre as espécies de microalgas utilizadas no tratamento de esgoto doméstico, vêm mostrando melhor desempenho as microalgas verdes (*Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*), devido à maior capacidade simultânea de absorção de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica carbonácea, além de atingirem maiores taxas de crescimento (Hoh, Watson e Kan, 2016).

Porém, além do florescimento de microalgas verdes, as cianobactérias tendem a se desenvolverem excessivamente em ambientes com excesso de nutrientes sob iluminação. Este aparecimento é causado por uma interação complexa de altas concentrações de nutrientes, luz solar, temperatura quente, turbidez, pH, condutividade, salinidade, disponibilidade de carbono e água de fluxo lento ou estagnada. cianobactérias em água doce ou salobra resultam em odor e sabor desagradáveis e perda de valor recriador e de pesca. As cianobactérias são bactérias Gram-negativas capazes de produzir uma ampla gama de toxinas, denominadas cianotoxinas (Arias *et al.*, 2019), podendo ser ou não tóxicas em mamíferos, incluindo humanos. Essas cianotoxinas incluem peptídeos cíclicos e álcoois. Devido a inúmeras espécies de cianobactérias existentes, sabe-se que possuem microorganismos produtores ou não de cianotoxinas (Santos, 2014). E os principais microorganismos responsáveis pela produção de cianotoxinas são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Oscillatoria (Planktothrix)* (Carmichael e Carmichael 2012). Geralmente, as toxinas são liberadas para o meio ambiente através da lise celular, assim, as cianobactérias, em situações de lise celular, liberam quantidades excessivas de toxinas que podem ser difíceis de remover por tratamento de água potável (Apeldoorn *et al.*, 2007).

Independentemente da espécie de alga desenvolvida no sistema, alguns requisitos são essenciais em suas taxas de crescimento, como: (i) iluminação, em que esta fonte de energia é usada para converter carbono inorgânico em carbono orgânico, (ii) nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo), e (iii) disponibilidade de CO₂.

2.3 INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS AMBIENTAIS NO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Um ambiente eutrofizado é repleto de microalgas, pois devido à inserção repetida de elevadas concentrações de N e P, os microrganismos fotoautotróficos assimilam esses nutrientes para seu crescimento. Os elementos essenciais para o crescimento de microalgas são carbono, nitrogênio e fósforo, além de alguns oligoelementos, incluindo enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, alumínio, sílica, ferro, cobre e zinco, que também são essenciais, mas raramente afetam na taxa de crescimento destas (Liu *et al.* 2018).

A quantidade de nitrogênio e fósforo (baseado no peso seco) numa célula algal em um sistema de biofilme varia em 2,9% - 7,5% de N, e 0,3% - 2% de P (Kesaano e Sims, 2014). As microalgas verdes preferem a forma de amônio, seguida de nitrato. Por sua vez, as algas verdes-azuladas, as cianobactérias, preferem assimilar nitrato, seguido de amônio (Arias *et al.*, 2019). O fósforo é outro nutriente importante para as algas, como uma forma inorgânica de fosfato ($H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}). A absorção é iniciada por hidrólise com a ação das enzimas fosfoesterase ou fosfatase. A quantidade de fósforo inorgânico requerida pelas algas varia entre as espécies. Por isto, sob a presença de luz, as microalgas são capazes de se desenvolverem nas águas residuárias absorvendo nutrientes e outros compostos orgânicos, no qual tornam-se constituintes celular, como lipídio e carboidrato (Wang *et al.*, 2019).

A taxa de crescimento de microalgas é influenciada por fatores físicos, como luz e temperatura; químicos, como nutrientes, dióxido de carbono, pH; biológicos, como competição entre espécies, pastoreio de animais, infecções por vírus; e operacionais, como o design do biorreator, mistura e taxa de diluição.

As espécies de microalgas são fotoautotróficas, ou seja, a energia das células é obtida através da luz, e convertida em energia química na fotossíntese. Porém, algumas microalgas podem utilizar carbono orgânico no crescimento celular, denominadas fotoheterotróficas ou mixotróficas (Lee *et al.*, 2016). O crescimento mixotrófico é uma variante do regime de crescimento heterotrófico, em que CO_2 e carbono orgânico são assimilados e o metabolismo respiratório e fotossintético operam simultaneamente (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2017). A relação entre intensidade da luz e crescimento celular fotoautotrófico é bastante complexa.

Ainda não se sabe a intensidade luminosa ideal para a taxa de crescimento da biomassa microalgal. Muñoz e Guieysse (2006) relataram que a atividade algal aumenta com a intensidade da luz de até 200–400 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Além disso, a ausência de luz ou baixa intensidade luminosa também pode diminuir a eficiência da fotossíntese e levar à condição de anaerobiose no sistema (Muñoz e Guieysse, 2006). Meng *et al.* (2019) reportaram que a máxima produção de biomassa algal foi sob intensidade luminosa de 250 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$. Atta *et al.* (2013) atribuíram a maior produção de biomassa algal e teor lipídico ao reator sob intensidade luminosa de 200 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$, e o contrário aconteceu nos reatores sob iluminação de 100 e 300 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$, indicando que um excesso de luz pode levar à fotoinibição.

A temperatura é diretamente relacionada com a intensidade luminosa. Muñoz e Guieysse (2006) relataram que a temperatura excessiva pode ocorrer em altas intensidades de luz e altas concentrações de biomassa, pelo fato das microalgas converterem uma grande fração da luz solar em calor. Porém, por ser um tratamento ainda complexo, ainda não sabe se existe uma temperatura ideal que favoreça a taxa de crescimento das microalgas. Mesmo assim, foi observado que o aumento da temperatura é diretamente proporcional à taxa de crescimento dos microorganismos autotróficos (Mata, Martins, e Caetano 2010).

Outro parâmetro fundamental no controle das atividades microalgais é o pH, já que pode afetar na taxa de crescimento de microalgas e na composição das espécies. A assimilação fotossintética (captação de CO_2 pelas algas) podem aumentar o pH a 10-11 (Jia e Yuan, 2017). Para tanto, os efeitos da alteração do pH influencia na atividade microbiana, como modificações no $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ e $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. Além disso, o pH também influencia a remoção de nitrogênio e fósforo, via volatilização do amônio ou precipitação do fósforo em altos valores de pH (9–11) (Muñoz e Guieysse 2006).

O processo de fotossíntese é o principal mecanismo de produção de oxigênio dissolvido nos sistemas de tratamento com microalgas. A concentração de OD depende da concentração das microalgas, intensidade da luz e da temperatura. Em sistemas com iluminação natural, como é o caso das lagoas de alta taxa, a concentração de OD atinge um valor máximo durante o meio dia e depois diminui à medida que a luz e a temperatura diminuem (Arcila Buitron, 2017). Já para os sistemas com iluminação artificial, a concentração de OD varia com o período claro e período escuro adotado no sistema, geralmente 12 h claro: 12h escuro (Lee *et al.*, 2015).

2.4 INTERAÇÃO ALGA-BACTÉRIA

O consórcio alga-bactéria está sendo cada vez mais discutido, uma vez que o agregado algal-microbiano apresenta peso suficiente para a sedimentação simultânea de ambos microrganismos (Christenson e Sims, 2011). As interações de microrganismos fotoautotróficos e bacterianos, no processo de tratamento de águas residuárias, podem ser uma relação simbiótica. As microalgas fornecem o O_2 necessário para as bactérias heterotróficas degradarem poluentes orgânicos, enquanto as bactérias, pela ação da enzima *Carbonic anhydras* (CA), liberam CO_2 proveniente do processo de respiração, em que são assimilados na forma de HCO_3^- pelas microalgas (Kampschreur *et al.*, 2009). Assim, a interação alga-bactéria sustenta uma condição de mitigação de gases de efeito estufa e a eliminação dos custos de aeração, além da produção da biomassa algal que pode ser utilizada na produção de bioenergia e produtos de alto valor agregado (Kwon *et al.*, 2014). O consórcio de bactérias e microalgas pode ser desenvolvido em diferentes tipos de sistemas, como lagoas de algas de alta taxa (Arcila e Buitrón 2017), sistemas de fluxo contínuo (Ji *et al.*, 2018) e fotobiorreatores fechados (Liu, L *et al.*, 2017).

Lagoas de alta taxa (LAT)

William J. Oswald desenvolveu em 1991 um sistema de Lagoas de Alta Taxa, afim de maximizar a produtividade da biomassa algal. Este sistema assemelha-se ao tratamento por lagoas de estabilização (Picot *et al.*, 1991), e consiste em um sistema aberto com introdução de iluminação natural, operadas com rotores para dar movimento a massa líquida (Figura 2(a)). Além disto, as LAT podem ser consideradas fotobiorreatores abertos que combinam o tratamento de esgoto e produtividade de microalgas (García *et al.* 2006).

Figura 2 - Sistema de (a) lagoas de alta taxa para produção de biomassa algal e (b) biogrânulos a partir do consórcio alga-bacteriano



Fonte: Sutherland *et al.*, 2020; Arcila e Buitrón, 2017

Além da produção de biomassa algal, o crescimento de bactérias heterotróficas também ocorre nas LAT, promovendo interação entre biomassa floclulenta com microalgas. Além disso, Arcila e Buitrón (2017) inocularam lodos ativados na LAT, e desenvolveram biogrânulos, com $\phi > 5,0$ mm (Figura 2 (b)).

Reatores de Fluxo Contínuo (RFC)

Os reatores de fluxo contínuo possuem menor custo de instalação, quando comparados com os fotobioreatores em bateladas sequenciais, e operação, além de apresentarem uma operação mais simples (Ahmad *et al.*, 2017). Contudo, a etapa de colheita da microalga é realizada no tanque de sedimentação introduzido como pós-tratamento de um RFC (Tiron *et al.* 2018). Visto isso, tem-se que um fator fundamental no funcionamento de RFC é o tempo de detenção hidráulica (TDH). Altos TDHs resultam em maiores custos, o que pode ser resultado de baixa concentração de biomassa em suspensão no sistema. Ahmad *et al.* (2017) introduziram uma tela para reter a biomassa que seria lavada pelo RFC, favorecendo o desenvolvimento de fotogrânulos aeróbios, provenientes de inóculo de lodo granular com microalga.

Neste sistema, é necessário maior controle, afim de garantir a integridade estrutural da biomassa em sua forma estratificada (Corsino *et al.*, 2016). Outro aspecto importante nos RFC é a concentração de OD injetado no sistema, por permitir o desenvolvimento de bactérias heterotróficas, propiciando a ocorrência de processos biológicos aeróbios.

Fotobioreatores em bateladas sequenciais (FRBS)

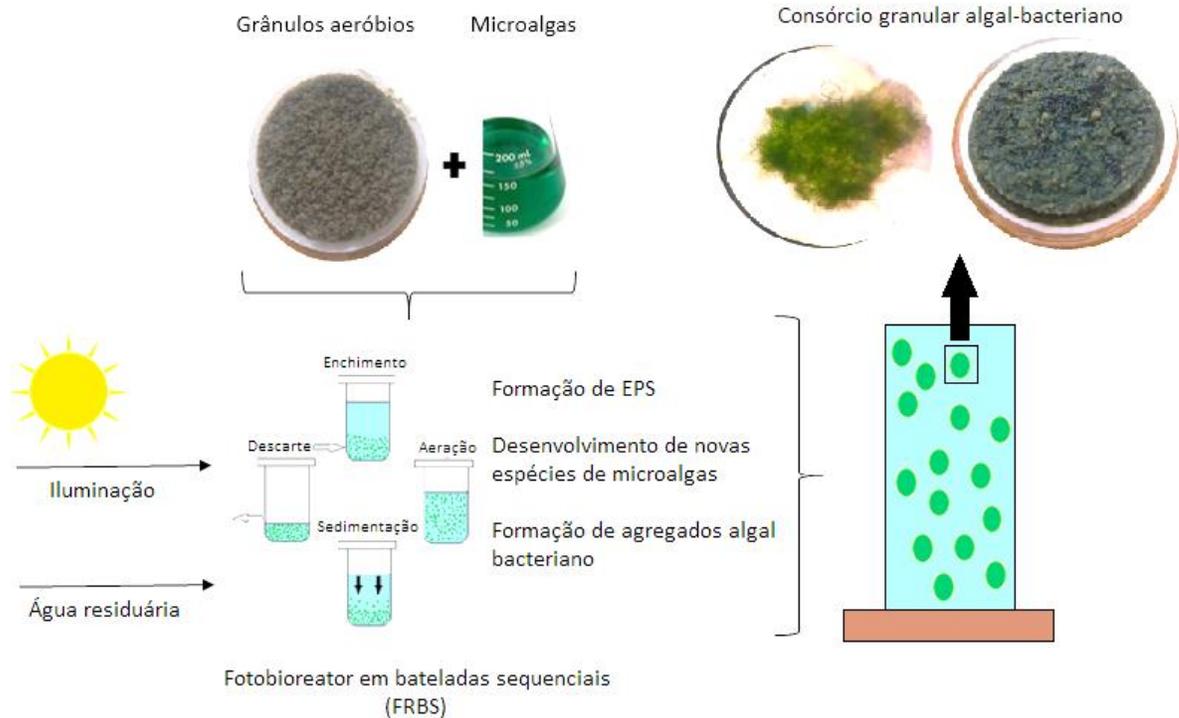
Para tanto, estudos têm focado no desenvolvimento de agregados de lodo granular aeróbio e microalga cultivados em fotobioreatores em bateladas sequenciais (FRBS) (Gao *et al.*, 2011), denominados fotogrânulos aeróbios. Os FRBS utilizam ciclos de enchimento, reação, sedimentação e esvaziamento de efluente, ainda podendo ser adicionadas fases anaeróbias e anóxica (Ji *et al.*, 2018), igualmente aos reatores em bateladas sequenciais (RBS), porém necessitam estar expostos à iluminação.

A fase de enchimento, consiste na entrada do esgoto bruto no sistema por bombeamento ou gravidade. Esta etapa pode ser realizada de forma ascendente ou descendente. A inclusão da fase anaeróbia/anóxica durante a alimentação do reator com o afluente apresentou resultados satisfatórios na desnitrificação e remoção de fósforo (Pronk *et al.*, 2015). Nesta etapa ocorre o processo de desnitrificação, devido à remanescência do nitrito/nitrato do ciclo anterior.

A fase de aeração no cultivo de LGA ocorre unicamente por meio da inserção de oxigênio artificial, para que ocorram os processos biológicos aeróbios. Porém, muitos sistemas com consórcio algal-bacteriano utilizam o oxigênio produzido pelas microalgas durante a fotossíntese para a realização dos processos aeróbios (Butler *et al.*, 2016). Devido à concentração significativa de microrganismos fotossintéticos, o consórcio alga-bactéria pode produzir fotossinteticamente O₂ necessário para a oxidação da matéria orgânica e a nitrificação. A ocorrência desses processos em sistemas compostos unicamente por lodo granular é tida exclusivamente pelo fornecimento de aeração, resultando num maior uso de energia (Milferstedt *et al.*, 2017). Enquanto, estudos com aeração fotossintética apresentaram excelentes resultados de remoções de nitrogênio amoniacal e fósforo acima de 90% (Abouhend *et al.*, 2018).

A fase de sedimentação consiste na separação da biomassa do efluente previamente tratado, enquanto a biomassa mais leve e de pior sedimentabilidade permanece em suspensão. Semelhantemente ao sistema com lodo granular, a biomassa do consórcio granular apresenta excelente capacidade de sedimentação, produzindo um efluente livre de sólidos suspensos (Ahmad *et al.*, 2017; Liu *et al.* 2018). Na etapa de descarte, o efluente tratado é descartado, carreando a biomassa de menor peso que permaneceu em suspensão naquele ciclo (Gao *et al.*, 2011). A Figura 3 resume a formação do fotogrânulo em um FRBS, a partir do inóculo de lodo granular com microalgas.

Figura 3 - Esquemática da formação do consórcio algal-bacteriano



Fonte: A autora, 2020

2.5 FORMAÇÃO DE FOTOGRÂNULOS AERÓBIOS

A formação de fotogrânulos aeróbios foi observada por Park e Dolan (2015) em frascos selados e não agitados expostos à luz natural. Os frascos foram inoculados com lodos ativados, que após várias semanas foram transformados em fotogrânulos. A diferença entre o grânulo aeróbio e o fotogrânulo aeróbio é a presença de microalgas na camada externa e interna desses agregados. Porém, também foi observado o aparecimento de microalgas na camada superior dos grânulos aeróbios cultivados em FRBS (Li *et al.*, 2015).

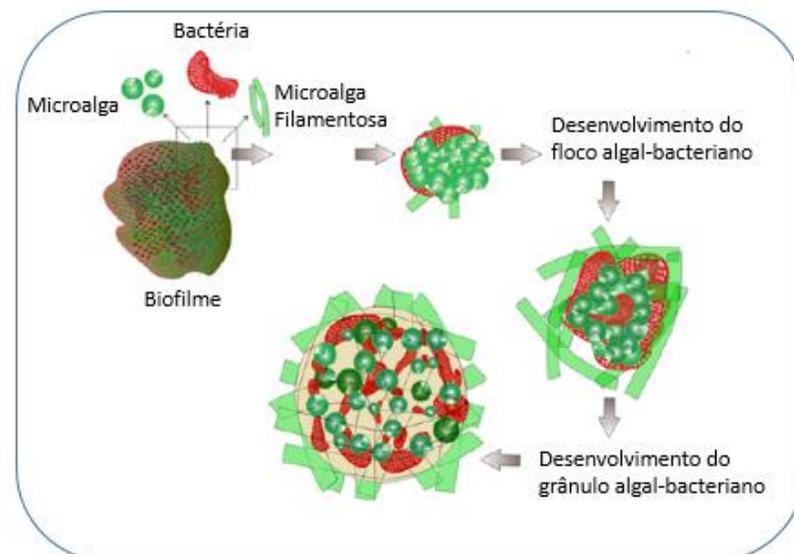
A característica principal do LGA é a capacidade de remover simultaneamente nutrientes e matéria orgânica, porém o sucesso operacional deve-se às condições operacionais aplicadas, como o tipo de alimentação, duração do ciclo operacional, carga orgânica aplicada, tensão de cisalhamento, dentre outros (Liu, J. *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2018). O processo de fotogranulação, além destes fatores, depende das espécies de microalgas que são desenvolvidas e aderidas à biomassa. O desenvolvimento do consórcio pode ocorrer a partir da mistura de espécies puras de microalgas com a biomassa de lodos ativados (Zhang *et al.*, 2018a); promovendo o crescimento

natural das microalgas no sistema (Syafri *et al.*, 2019); avaliando o desenvolvimento em lagoas de alta taxa (Arcila e Buitrón 2017), dentre outros. Li *et al.* (2015) associam o desenvolvimento de autoagregado algal-bacteriano a um processo dinâmico dividido em quatro estágios:

Estágio I: As algas são aderidas à superfície do lodo flocculento pela produção de EPS ou pela aderência de bactérias filamentosas. He *et al.* (2018) indicam que a presença de bactérias filamentosas agem como pontes e fornecem espaço suficiente para a formação e aderência das microalgas nos grânulos aeróbios.

Estágio II: Novas bactérias são aderidas às algas, ao passo que novas espécies de microalgas vão surgindo (Figura 4). Abouhend *et al.* (2018) reportam que o crescimento excessivo da microalga filamentosa, *Stigeoclonium sp.*, promove desintegração mais rápida dos fotogrânulos, ao passo que, a ocorrência de cianobactérias consiste em grânulos mais estáveis e menos passíveis à desintegração. Meng *et al.* (2019) relacionam o efeito da luminosidade com a presença de microalgas filamentosas na superfície com granular, auxiliando na perda da estabilidade, formando grânulos menos estáveis e mais propensos à desintegração. Para tanto, foi evidenciado por Cai *et al.* (2019) que a presença das microalgas filamentosas desempenham papel fundamental no processo de granulação.

Figura 4 - Demonstração da interação de microalgas com bactérias na formação do biofilme granular.



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

Estágio III: O agregado algal-bacteriano continua a tomar forma e ficar maior e mais robusto, além da maior produção de EPS. Assim como no LGA, na formação do fotogrânulo aeróbio é

observada a formação de uma matriz de polímeros na região mais externa do grânulo, denominada substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (Beun *et al.*, 1999). O EPS é considerado elemento chave para o entendimento da estabilidade do fotogrânulo aeróbio, pois as variações nas concentrações de proteína (PN) e polissacarídeos (PS) alteram as características físico-químicas da superfície celular, como carga, hidrofobicidade e outras propriedades (Ji *et al.*, 2018). Syafri *et al.* (2019) associam a maior produção de biomassa com a assimilação do CO₂ na forma de HCO₃, depositando-o como uma reserva na forma de EPS. Por este motivo, há uma maior produção deste (Wang *et al.*, 2019), mais especificamente na parcela de proteína (PN), quando comparados a sistemas de grânulos aeróbios, podendo ser o fator responsável pela diminuição da carga negativa da superfície da célula algal (Zhao *et al.*, 2018).

Estágio IV: Alcança-se a estabilidade granular. Com fotogrânulos maduros, Meng *et al.*, (2019) observaram em seu estudo, que a relação simbiótica entre alga e bactéria não acontece somente na superfície granular, mas também nas camadas internas dos grânulos. Dada a imensa diversidade de microalgas e bactérias, as interações entre esses microorganismos ainda são um campo aberto para futuras pesquisas.

2.6 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE MATÉRIA ORGÂNICA E NUTRIENTES

Além da melhora na capacidade de sedimentação dos microrganismos fotossintetizantes, o consórcio granular algal-bacteriano pode influenciar na qualidade final do efluente, devido à junção da ocorrência dos processos de remoção simultânea de nutrientes e matéria orgânica nos grânulos aeróbios e da absorção de nutrientes para o crescimento celular das microalgas. Visto isso, a Tabela 1 sintetiza vários estudos que cultivaram fotogrânulos aeróbios, realssando os resultados obtidos sobre a remoção de nutrientes no tratamento de águas residuárias. Li *et al.* (2015) e Huang *et al.* (2015) perceberam o desenvolvimento de microalgas na superfície granular operando FRBS expostos à iluminação natural. Esses agregados foram capazes de remover mais de 45% e 95% do nitrogênio total e matéria orgânica carbonácea do sistema. Zhao *et al.* (2018) alcançaram 100% de nitrificação total com consórcio granular com formação natural de microalgas. Deste modo, tem-se que o consórcio entre microalgas e bactérias favorece a remoção de nutrientes e matéria orgânica, além das microalgas apresentarem um papel fundamental na formação do fotogrânulo aeróbio.

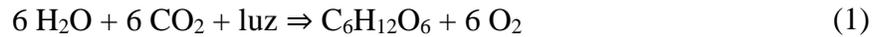
Tabela 1 - Resumo de estudos com consórcio granular alga-bactéria tratando esgoto sintético.

Espécie de microalga no sistema	Água residuária / substrato	Sistema e modo operacional	Tempo de operação (dias)	Nitrogênio		Fósforo		DQO		Ref.
				Ci (mg/L)	%R	Ci (mg/L)	%R	Ci (mg/L)	%R	
Formação natural: <i>Trebouxiophyceae, Bacillariophyceae e Chlorophyceae</i>	Esgoto doméstico sintético / acetato de sódio	Reator em batelada fotosequencial. V=1,4 L	120	200	NA: 99,0	16	89,9	1200	96,7	Zhang <i>et al.</i> 2018a
Formação natural (N.I.)	Esgoto doméstico sintético / glicose e acetato de sódio	Reator em batelada fotosequencial. Com adição de TiO ₂ . V=1,4 L	100	100	NT: 46,0	23	45,7	600	96,0	Li <i>et al.</i> 2015
Formação natural (N.I.)	Esgoto doméstico sintético / glicose e acetato de sódio	Reator em batelada fotosequencial. V= 1,4 L	100	100	NT: 40,7 - 45,4	10	Inibição dos PAOs pela presença de ácido nitroso livre. Cf de PT > 5,6 mg/L	600	95,2	Huang <i>et al.</i> 2015
Formação natural: <i>Diatomea, Chlorophyceae, Chrysophyceae, Trebouxiophyceae</i>	Esgoto doméstico sintético / acetato de sódio	Reator em batelada fotosequencial. V= 3,6 L	7	20	-	5	-	200	-	He <i>et al.</i> 2018
Formação natural: <i>Phormidium sp.</i>	Esgoto doméstico sintético / acetato de sódio	Reator de fluxo contínuo. V=1,0 L	120	100	NT> 76,0	10	50%	300	96,0	Ahmad <i>et al.</i> 2017
Formação natural (N.I.)	Esgoto doméstico sintético / acetato de sódio	Reator em batelada fotosequencial. V= 3,6 L	55	50	Nitratação e Nitratação: 100,0	10	-	400	96	Zhao <i>et al.</i> 2018

Fonte: A autora, 2020. NI= Não indentificado; Ci= Concentração inicial; R= Eficiência de remoção; Ref.=Referências bibliográficas. Cf=concentração final

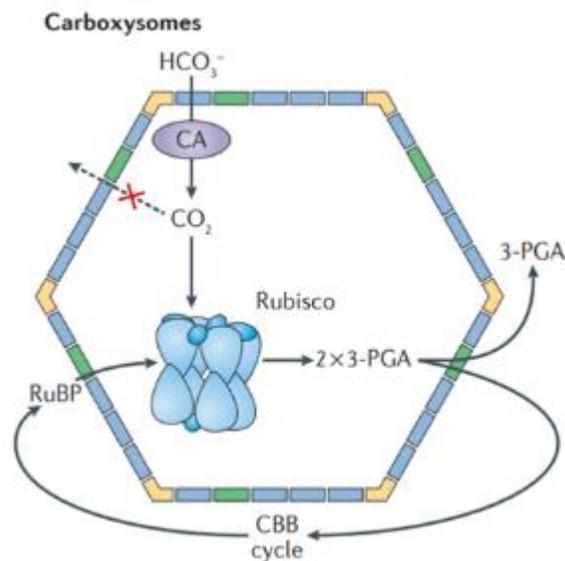
Carbono

As microalgas assimilam carbono inorgânico na fotossíntese. A energia solar é convertida em energia química tendo oxigênio (O₂) como subproduto e, numa segunda etapa, a energia química é usada para assimilar dióxido de carbono (CO₂) e convertê-lo em açúcares (Equação 1).



Além disso, o pH influencia as formas de carbono fixadas pelas microalgas em valores baixos de pH (5,0-7,0), a fixação ocorre por difusão, enquanto para valores mais elevados de pH, o HCO₃⁻ (bicarbonato) promove o transporte ativo para as células microalgais. Este processo é o mais comum em sistemas de tratamento de esgoto. Uma vez dentro das células, o HCO₃⁻ é convertido a CO₂ que pode ser fixado através do rubisco (*Ribulose Bifosfato Carboxilase Oxigenase*), produzindo duas moléculas de um composto de 3 carbonos (3-fosfoglicerato) (Cameron *et al.* 2013; Kerfeld *et al.*, 2018). A Figura 5 demonstra o processo de fixação do carbono pelas células microalgais.

Figura 5 - Fixação do carbono pelas células microalgais.

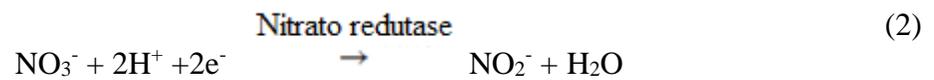


Fonte: Kerfeld *et al.* (2018).

Embora as microalgas sejam principalmente autotróficas, algumas são heterotróficas, usando apenas carbono orgânico (acetato, glicose, glicerol ou etanol) como fonte de carbono, enquanto outras são mixotróficas, podendo usar carbono orgânico, além de CO₂, assim tanto o mecanismo respiratório quanto o fotossintético podem ocorrer (Razzak *et al.*, 2013).

Nitrogênio

A associação das microalgas com o nitrogênio é a assimilação deste utilizado no crescimento algal, seja nitrogênio orgânico ou inorgânico. Para assimilar o nitrogênio inorgânico, os íons NO^{-2} e NO^{-3} devem ser reduzidos a amônio pela *Nitrato Redutase* (NR) e *Nitrito Redutase* (NiR), respectivamente. Na primeira etapa (Equação 2), NR catalisa a redução de N-NO_3^- em N-NO_2^- usando *Nicotinamida Fosfato De Dinucleotídeo De Adenina* (NADPH) como agente redutor. Uma redução adicional no N-NH_4 é catalisada pelo NiR (Equação 3):



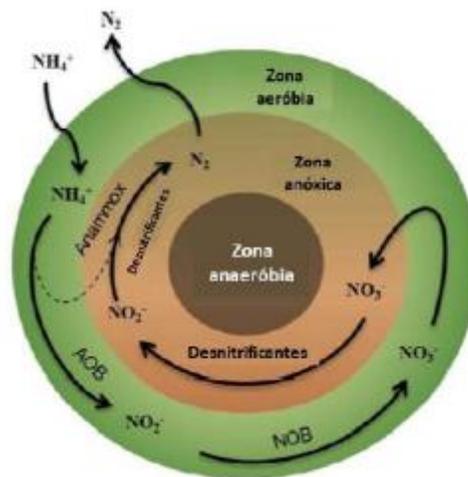
O N-NH_4^+ , resultante da redução de N-NO_3^- e N-NO_2^- , é incorporado nas células microalgais e convertido em aminoácidos, a partir de glutamato e *Trifosfato de Adenosina* (ATP) (Equação 4). Contudo, a assimilação do amônio não requer a reação redox, ele consome menos energia que a assimilação de nitrito e nitrato (Jia e Yuan, 2017), portanto, o amônio é uma das formas mais preferida de nitrogênio inorgânico para assimilação das algas (Zhou, 2014).

Nos sistemas com Lodo Ganular Aeróbio, a remoção do nitrogênio requer dois grupos de microrganismos: as bactérias nitrificantes e as desnitrificantes. As bactérias nitrificantes não precisam de uma fonte de carbono orgânico, porém há a necessidade de alta concentração de oxigênio. O processo de nitrificação ocorre em duas etapas: nitritação, que é a oxidação de amônia em nitrito por Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA) (Equação 4) e a nitratação, que é a oxidação de nitrito as nitrato por Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON) (Equação 5) (Metcalf e Eddy, 2016).



As BOA encontradas em sistemas de tratamento de esgoto pertencem aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, e as principais BON fazem parte do gênero *Nitrobacter* e *Nitrospira* (Metcalf e Eddy, 2016). A Figura 6 esquematiza os processos de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS) realizados no interior da biomassa granular aeróbia. Todos os processos de remoção de nitrogênio ocorrem dentro da estrutura granular, devido à formação de microzonas aeróbias, anaeróbias e anóxicas (Gao *et al.*, 2011). Porém, devido as condições operacionais aplicadas, a nitrificação pode não ocorrer completamente, denominada nitrificação parcial, em que ocorre somente a etapa de oxidação da amônia a nitrito. Quando favorecido este processo, é possível reduzir em até 40% o consumo de oxigênio dissolvido no meio (Eldyasti e Soliman, 2016). Além disso, a taxa de crescimento celular das bactérias nitrificantes é baixa, sendo necessária elevado tempo de retenção celular ($TRC > 4$ dias) (Bassin, 2012).

Figura 6 - Mecanismos de nitrificação e desnitrificação simultânea no interior da biomassa granular.



Fonte: Nancharaiiah e Reddy (2018).

No processo de desnitrificação, o nitrato é reduzido a N_2 , por bactérias desnitrificantes, porém pode ser que a redução alcance somente intermediários gasosos como o óxido nítrico (NO) ou óxido nitroso (N_2O) (Equação 6). A fonte de carbono é utilizada como doadora de elétron a etapa de desnitrificação (LU *et al.*, 2014). Além disso, a desnitrificação ocorre em ambientes anóxicos, com baixa concentração de OD (1 mg/L ou ainda inferiores). Ressalta-se que a desnitrificação também pode ocorrer parcialmente, com a redução de nitrito a N_2 (Equação 7) (Eldyasti e Soliman, 2016).



Fósforo

O fósforo é outro macro-nutriente essencial para a crescimento, que é absorvido pelas algas como ortofosfato inorgânico (PO_4^{-3}). A transferência de energia e a síntese de ácidos nucleicos é causada por este nutriente, que entra nas células microalgais através do transporte ativo nas formas de H_2PO_4^- e HPO_4^{-2} , ao passo que a assimilação destes compostos orgânicos é realizado através dos seguintes processos: (i) fosforilação ao nível do substrato; (ii) oxidativo fosforilação; e (iii) fotofosforilação. Nestes processos o ATP é produzido a partir de *Adenosina Difosfato* (ADP) e uma energia entrada (Equação 8) (Gonçalves *et al.*, 2017).



A remoção de fósforo é realizada através do *processo Enhanced Biological Phosphorus Removal* (EBPR), que consiste na utilização de PAO (organismos acumuladores de polifosfato, do inglês, *polyphosphate accumulating organisms*). Esses organismos capturam fosfato do meio sob a alternância de condições anaeróbias e aeróbias.

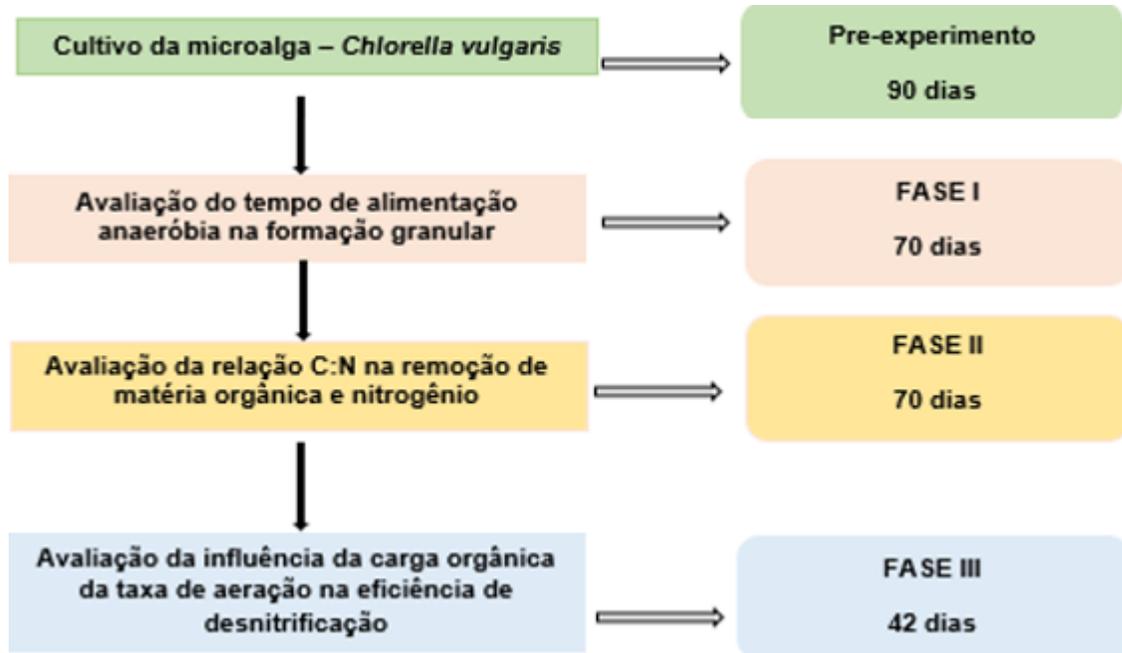
Sob condição de anaerobiose, os PAO são capazes de absorver ácidos graxos voláteis (AGV) e armazená-los intracelularmente na forma de polihidroxialcanoatos (PHA). O potencial de redução requerido para a formação de PHA provém da glicólise do glicogênio armazenado. A inserção de períodos de anaerobiose durante o início dos ciclos operacionais nos RBS estimula o crescimento dos PAO, melhorando a remoção de fósforo.

Como etapa subsequente, durante a reação aeróbia, os PAO utilizam o PHA anteriormente armazenado como fonte de energia para seu crescimento celular (OEHMEN *et al.*, 2007). Desse modo, o fósforo é removido das águas residuárias através de sua incorporação à biomassa.

3 METODOLOGIA

O sistema experimental foi conduzido no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), localizado no Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE durante 180 dias (Maio a Novembro de 2019). A Figura 7 mostra o delinhamento operacional do experimento dividido no pré-experimento e nas três fases. O pré-experimento durou 90 dias (Fevereiro - Maio de 2019) que promoveu o cultivo da microalga (*Chlorella vulgaris*). A Fase I durou 70 dias (Maio – Agosto de 2019) que consistiu no desenvolvimento dos fotogrânulos aeróbios, com relação C:N de 4:1, sob diferentes modos de alimentação; a Fase II durou 70 dias (Agosto - Outubro de 2019) e avaliou a performance do fotogrânulo aeróbio na remoção de nutrientes e matéria orgânica com relação C:N de 8:1, e a Fase III durou 42 dias (Outubro – Novembro de 2019), investigou o efeito da carga orgânica (1,7 kg/m³.dia) e da taxa de aeração (Vas: 0,3 cm/s) na eficiência de desnitrificação.

Figura 7 - Resumo esquemático das principais etapas metodológicas do trabalho de pesquisa.



Fonte: A autora, 2020.

3.1 CULTIVO DA MICROALGA – *CHLORELLA VULGARIS*

O cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* foi feito no próprio Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA-UFPE), sob temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminação artificial (fita LED) com intensidade luminosa de $20\pm 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (Figura 8).

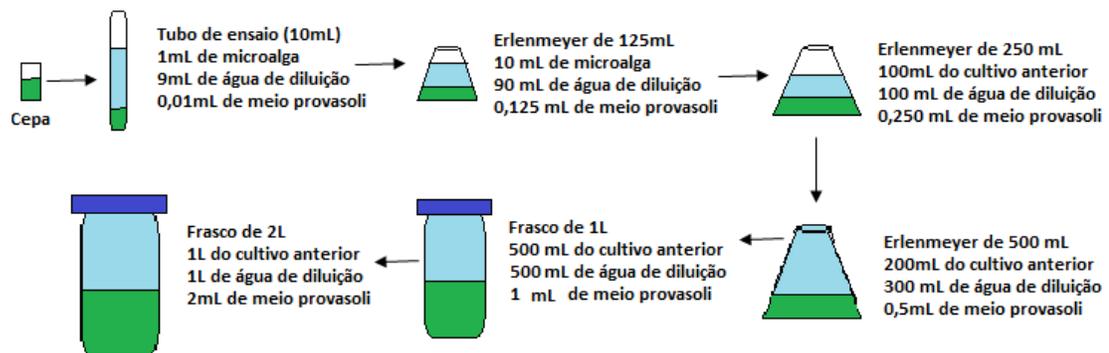
Figura 8 – Procedimento do cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em sala fria.



Fonte: A autora, 2020.

A espécie cultivada para o presente estudo foi a *Chlorella vulgaris*, do grupo *Chlorophyta*, de habitat dulciaquícola, cuja cepa utilizada foi do banco de cepas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), localizado no Departamento de Engenharia de Pesca e Aquicultura (DEPAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). A cepa foi mantida em incubadora (Caltech mod. El-08F1-AF), sob temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e iluminação constante. As cepas eram replicadas com água autoclavada mensalmente para sua preservação (Figura 9).

Figura 9 - Esquema de replicagem das cepas de microalgas



Fonte: A autora, 2020.

Para o experimento foi requerido 2L do meio cultivado da espécie pura da microalga. O cultivo durou 3 meses (Janeiro – Março de 2019). A água de diluição utilizada era a água destilada previamente autoclavada. O meio de cultura utilizado foi o Provasoli (Tabela 2), sendo necessário adicionar 1 mL do meio para cada 1L de cultivo (1:1000). Todas as vidrarias foram autoclavadas antes de entrar em contato com as microalgas, juntamente com a água de diluição. A sala de cultivo era regularmente higienizada com álcool 70% e hipoclorito de sódio.

Tabela 2 - Composição do meio comercial Provasoli® com vitaminas do complexo B

Composição	Concentração
H ₃ BO ₃	1,93 g/L
FeCl ₃	0,053 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	0,273 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0367 g/L
COSO ₄ .7H ₂ O	0,008 g/L
Solução de EDTA 0,5 M	11,4 mL
Solução de vitaminas do complexo B	
Biotina (B7)	0,01 mL/L
Cianocobalamina (B12)	0,01 mL/L

Fonte: Adaptado de Provasoli (1958).

O monitoramento da taxa de crescimento das microalgas serve para indicar o quão adaptado às condições do sistema elas estão. A contagem das células foi feita um dia antes do início do experimento, para quantificar o inóculo. Foi utilizando a câmera de Bruker, pois é uma medida eficiente para entender a taxa de crescimento algal. Utilizou-se a lente 400x para visualizar as microalgas, e a contagem foi feita conforme a Figura 10.

Figura 10 - Procedimento de contagem celular algal utilizando a câmera de Bruker. Exemplo de contagem da microalga utilizada neste estudo.



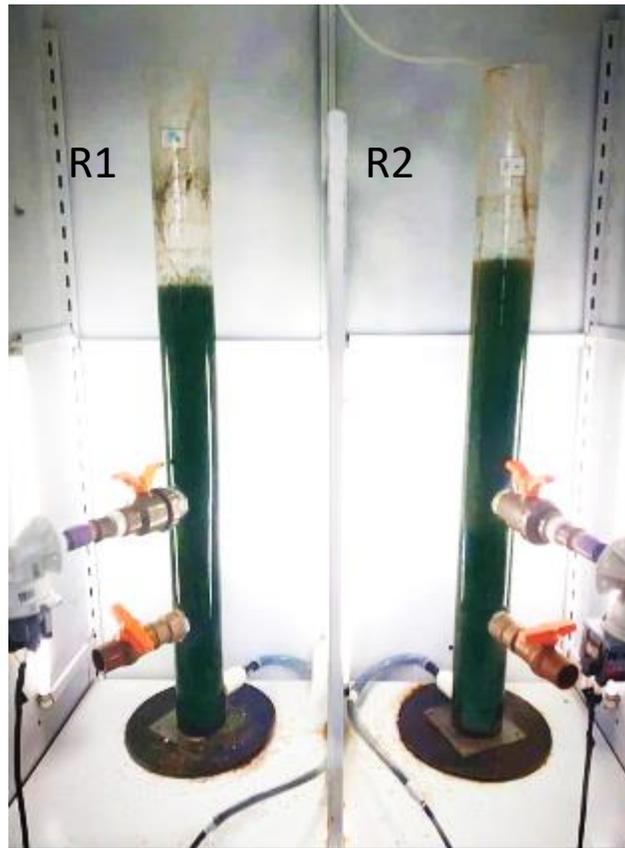
Fonte: Svaldenis (2014).

3.2 SISTEMA EXPERIMENTAL

Foram utilizados dois fotobioreatores em bateladas sequenciais de escala de bancada, R1 e R2, confeccionados em acrílico transparente. As dimensões de cada reator foram: 74 mm de diâmetro interno, 3 mm de espessura da parede e 1000mm de altura total com um volume de 5,0 L, e volume útil de 3,5 L. Para a realização da troca volumétrica do sistema foram feitas duas saídas, a primeira está situada a 20 cm da base do reator e a segunda a 40 cm, para maior e menor troca volumétrica, respectivamente.

Os fotobioreatores foram mantidos sob iluminação artificial (lâmpada fluorescente) com intensidade luminosa de $140 \pm 20 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, dentro de um armário coberto de lona para evitar a influência da iluminação externa, sob condição de fotoperíodo de 12h luz ligada / 12h luz desligada. As lâmpadas fluorescentes foram fixadas no armário a 10 cm da parede do reator e a intensidade luminosa foi medida dentro do armário por um luxímetro (Akrom Kr852). A condição adotada da iluminação foi baseada nos resultados encontrados por Lee *et al.* (2015), que ao investigarem os de três condições de fotoperíodos diferentes (12h:12h, 36h:12h, e 60h:12h ciclo escuro:claro) na remoção de nutrientes e matéria orgânica, ficou evidente que as eficiências de remoções de nutrientes foram maiores quando o experimento ficou mais tempo exposto à iluminação (12h:12h-claro:escuro). A Figura 11 mostra os fotobioreatores em operação na condição de fotoperíodo claro.

Figura 11 - Fotobioreatores em operação

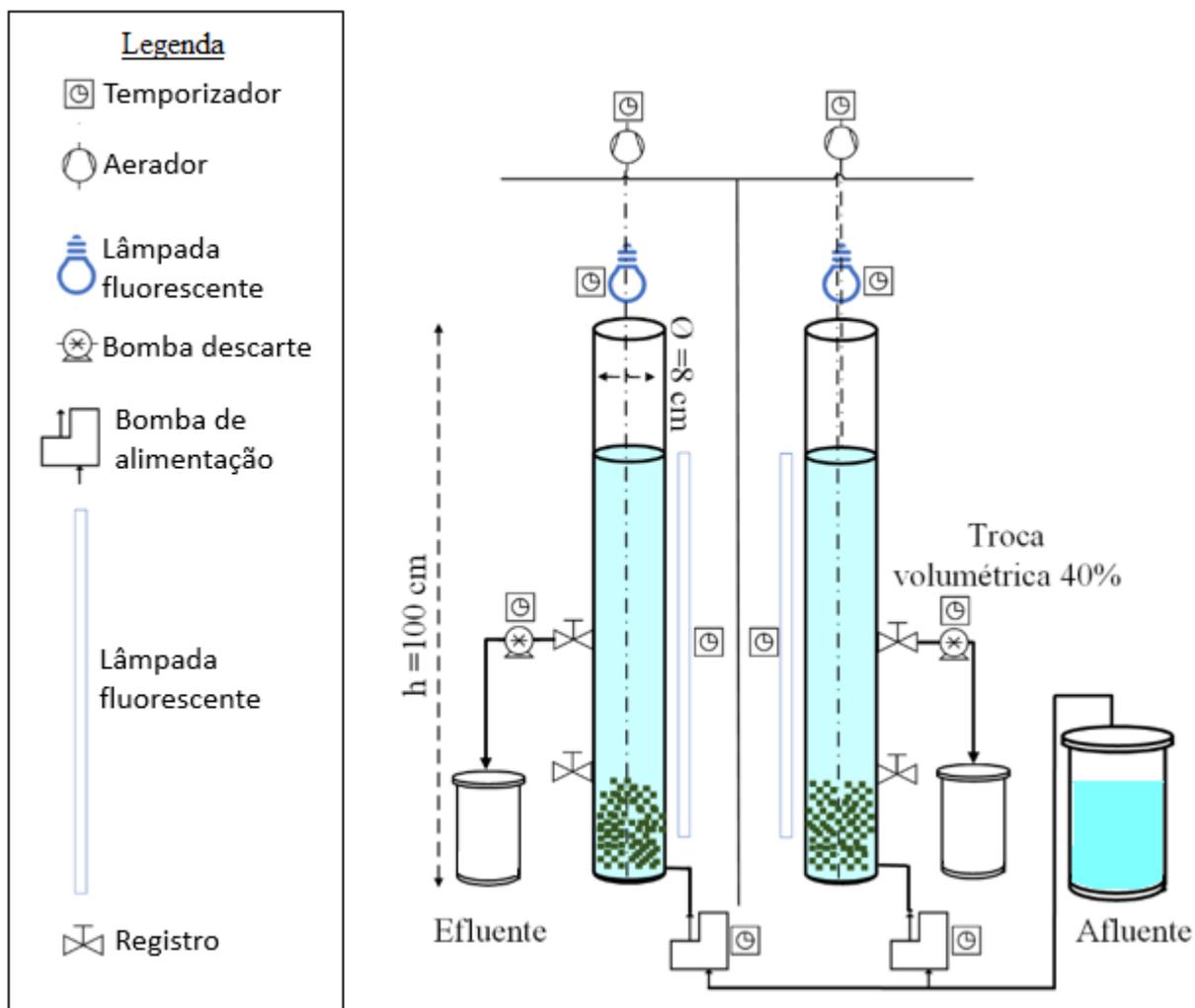


Fonte: A autora, 2020.

Os reatores foram operados sob temperatura de clima tropical ($29 \pm 2^\circ\text{C}$). O sistema operacional era composto por recipiente de armazenamento de afluente e efluente, reator em escala de bancada, temporizadores, bombas de alimentação, bombas de descarte e bombas de aeração. Para dar início ao ciclo operacional, o efluente doméstico sintético ($\text{DQO}=400\text{mg/L}$) era bombeado por meio de bomba dosadora (HANNA®, modelo BL Black Stone) com alimentação lenta, caracterizando a fase anaeróbia/anóxica do sistema. A alimentação foi do tipo ascendente, assim, o afluente entrava em contato com a biomassa ao entrar no sistema. Após esta etapa, bombas de aeração (Boyu SC-7500) forneceram oxigênio ao sistema, caracterizando a fase aeróbia, para a ocorrência dos processos biológicos aeróbios. A distribuição de ar foi feita por duas pedras porosas redondas ($\varnothing=3\text{cm}$), evitando o acúmulo da biomassa na base do reator. Após a fase de aeração, os aeradores eram desligados para favorecer a separação do efluente tratado da biomassa e o descarte do efluente era feito por meio de uma eletrobomba de drenagem (CONSUL). O esgoto sintético era mantido na geladeira a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ e, constantemente, misturado por bomba submersa (Boyu SP-

500), mantendo-o homogenizado. O sistema foi automatizado por temporizadores, e o esquema operacional dos FRBS é mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Layout do esquema operacional dos fotobioreatores



Fonte: A autora, 2020.

O consórcio do inóculo foi obtido pela mistura de lodo aeróbio proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto Janga, localizada em Pernambuco, de lodos ativados por aeração prolongada (biomassa floculenta, $SSVLM=4600\text{mg/L}$, com $IVL_5= 224\text{ mL/g}$) e *Chlorella vulgaris*. A relação da concentração de SST de alga:lodo do inóculo foi de 1:5. A escolha da microalga foi baseada no experimento de Álvarez-díaz *et al.* (2017), que obtiveram melhores resultados no tratamento de esgoto de produção de biomassa algal nos sistemas com inóculo de *Chlorella vulgaris*. Diferentemente de alguns autores que inocularam maiores concentrações de densidade celular e

Clorofila-a (Li *et al.* 2015; Tang *et al.* 2018), este estudo teve como propósito avaliar a capacidade de desenvolvimento das microalgas no sistema inoculadas sob baixas concentrações no inóculo.

A DQO permaneceu igual para todas as fases (400mg/L). Para a FI, foi utilizada uma concentração de 100mg/L de NH_4Cl no afluente (relação C:N de 4:1), e na FII e FIII, foi utilizado 50mg/L de NH_4Cl (relação C:N de 8:1). Foi adicionado diariamente carbonato de sódio para controle do pH, em que se manteve entre 7,2 – 7,6. Os reagentes utilizados na composição do esgoto sintético estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Solução de macro e micronutrientes utilizados no esgoto sintético.

Solução	Reagente	Concentração (mg\L)
Macronutrientes	NH_4Cl	100 – fase I e 50 – fase II e faseIII
	KH_2PO_4	10
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
	CaCl_2	10
	Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	400
Micronutrientes (1ml de micronutrientes – 1L de solução)	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2
	ZnCl_2	0,050
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,500
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,142
	$\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,164
	H_3BO_3	0,050
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,038
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2
	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,090
	$(\text{NH}_4)_6 \cdot \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,050
	EDTA	1
	Resazurina	0,200
	HCl	1

Fonte: Huang *et al.* (2015).

3.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DOS REATORES

Como mencionado anteriormente, os fotobioreatores foram operados em regime de bateladas sequenciais, com fase de alimentação anaeróbia/anóxica, reação aeróbia, sedimentação e descarte. O experimento durou 180 dias e foi dividido em três condições operacionais (FI, FII e FIII), como detalhada a seguir.

Condição Operacional I (FI):

A FI foi iniciada no dia 29 de Maio de 2019 e foi finalizada no dia 08 de Agosto de 2019, totalizando em 70 dias de operação. O objetivo desta condição operacional foi investigar o efeito da duração da fase de alimentação anaeróbia/anóxica na formação granular utilizando esgoto sintético, bem como avaliar a predominância das microalgas na superfície da biomassa.

Durante todo o experimento os reatores foram operados em sucessivos ciclos de 4 horas. Nesta condição operacional, os ciclos operacionais do R1 foram divididos em: 40 min. de alimentação anaeróbia/anóxica, 196 min. de reação aeróbia, 3 min. de sedimentação e 1 min. de descarte. Já para R2 os ciclos foram divididos em: 60 min. de alimentação anaeróbia/anóxica, 176 min. de reação aeróbia, 3 min. de sedimentação e 1 min. de descarte (Figura 13). A troca volumétrica inicial foi fixada em 40%.

A relação C:N, carga orgânica e velocidade ascensional foram mantidos iguais para ambos reatores. O resumo desta condição operacional está apresentado na Tabela 4. A velocidade ascensional do ar (Var) adotada foi de 0,5cm/s, resultando numa concentração de OD na ordem de 6,0-7,0 mg/L. A escolha de adotar essa Var, foi seguida por Zhao *et al.* (2019) que obtiveram excelentes resultados ao utilizar a Var= 0,55cm/s.

Tabela 4 - Resumo das condições operacionais dos reatores durante a FI.

Parâmetros	R1	R2
Alimentação anaeróbia (min)	40	60
Relação C:N (Fonte de carbono)	4:1 (Glicose)	4:1 (Glicose)
Carga orgânica volumétrica (kgDQO/m ³ .d)	1,0	1,0
Velocidade superficial ascensional do ar (cm/s)	0,5	0,5

Fonte: A autora, 2020.

A utilização de uma alimentação lenta anaeróbia de 60 minutos foi reportada por Yuan *et al.* (2019), afim de promover a formação de microzonas anóxicas no interior do grânulo. Além disso, foi reportado que a alternância de condições anaeróbia e aeróbia favorecem o crescimento de microrganismos de crescimento lento, tais como nitrificantes e organismos acumuladores de fosfato, considerados benéficos ao processo de granulação por ter positiva influência na densidade e estabilidade granular (De Kreuk e Van Loosdrecht, 2004).

Condição Operacional II (FII):

A FII foi iniciada no dia 08 Agosto de 2019 e foi finalizada no dia 18 de Outubro de 2019, totalizando em 70 dias de operação. O objetivo desta condição operacional foi avaliar o efeito da relação C:N na remoção de nitrogênio e matéria orgânica, bem como acompanhar o efeito do desenvolvimento das microalgas na estabilidade granular.

Durante a FII, ambos reatores operaram sob o mesmo ciclo operacional da FI. A mudança foi realizada na composição do esgoto sintético, alterando a relação C:N de 4:1 para 8:1. A escolha da avaliação do efeito da relação C:N foi baseada no estudo feito por Zhao *et al.*, (2018a). Esses autores averiguaram o efeito de diferentes relações C:N (8:1,4:1,2:1 e 1:1), e obtiveram excelentes resultados quando submeteram os fotobioreatores a relação C:N de 8:1 e 4:1, porém foi constatado que é possível manter a estabilidade fotogranular mesmo com baixa relação C:N.

Condição Operacional III (FIII):

A FIII foi iniciada no dia 18 de Agosto de 2019 e foi finalizada no dia 29 de Novembro de 2019, totalizando em 42 dias de operação. O objetivo desta condição operacional foi avaliar o efeito do aumento da carga orgânica volumétrica aplicada e a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido no sistema e na eficiência de desnitrificação. Ressalta-se que os ciclos foram iguais, e consistiam em: 60 min. de alimentação anaeróbia/anóxica, 176 min. de reação aeróbia, 3 min. de sedimentação e 1 min. de descarte (Figura 13).

A composição do afluente continuou igual da FII, com DQO de 400mg/L e NH₄Cl de 50mg/L. No R1 foi aumentada a troca volumétrica de 40 para 70%, resultando numa carga orgânica volumétrica de 1,7 kgDQO/m³.d. A escolha da troca volumétrica seguiu Liu *et al.* (2017), sendo

inicialmente fixada em 40% (FI e FII) e aumentada para 70% na FIII. A troca de 40% foi adotada inicialmente devido à baixa capacidade de sedimentação das microalgas. Por outro lado, a troca volumétrica foi aumentada para 70% pois o sistema era constituído por biomassa com excelente capacidade de sedimentação.

Além disso, foi diminuída a velocidade superficial do ar do R2 para 0,3 cm/s, resultando em 4,0-5,0 mg/L a concentração de OD no sistema. Esta alteração objetivou avaliar o desempenho do reator operando com baixa concentração de oxigênio dissolvido. O resumo das condições operacionais adotadas está na Tabela 5.

Tabela 5 - Resumo das condições operacionais do reator durante a Fase III.

Parâmetros	R1	R2
Alimentação anaeróbia (min)	60	60
Relação C:N (Fonte de carbono)	4:1 (Glicose)	4:1 (Glicose)
Carga orgânica volumétrica (kgDQO/m ³ .d)	1,7	1,0
Velocidade superficial ascensional do ar (cm/s)	0,5	0,3

Fonte: A autora, 2020.

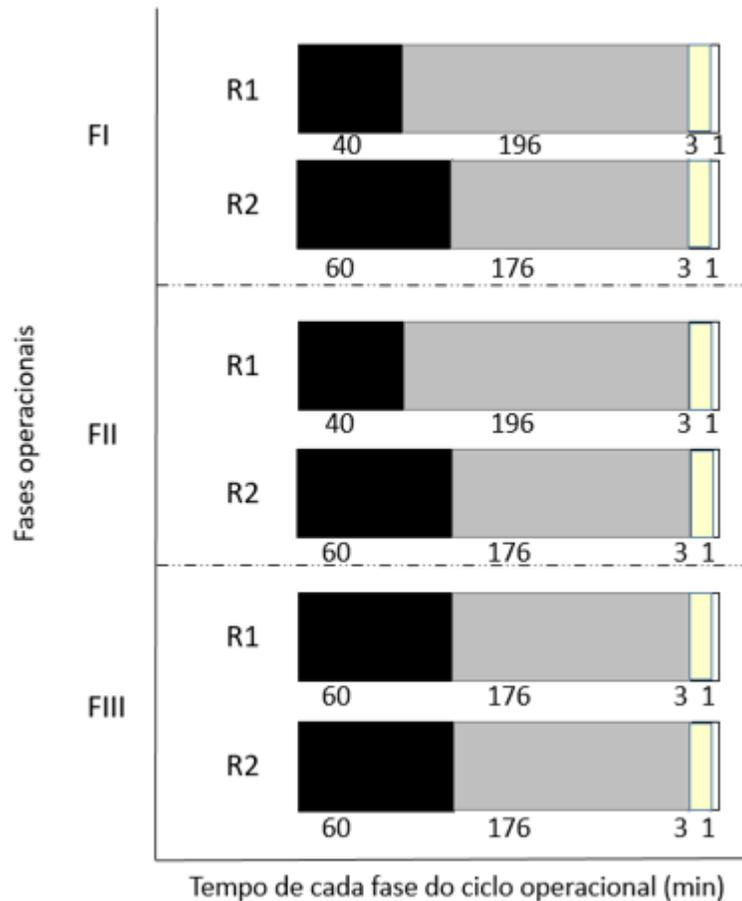
Visto isso, foi discutido que foram abordadas três condições operacionais (FI, FII e FIII), afim de compreender melhor a formação do fotogrânulo aeróbio e seu desempenho no tratamento de esgoto. A Tabela 6 sintetiza as condições adotadas com os objetivos adotados. A Figura 13 resume os ciclos operacionais de cada reator em cada condição operacional.

Tabela 6 – Síntese das condições estratégicas e objetivos adotados

	FI	FII	FIII
Objetivo	Efeito do modo de operação no processo de fotogranulação	Efeito da relação C:N no processo de remoção de N	Efeito da taxa de aeração e da carga orgânica aplicada na eficiência de desnitrificação
Outcome	<i>Start-up</i> : fotogranulação aeróbia e qualidade do efluente	Características físicas da biomassa e qualidade do efluente	Características físicas da biomassa e qualidade do efluente
Variáveis controlada	C:N, Taxa de aeração, carga orgânica aplicada	Taxa de aeração, carga orgânica aplicada	C/N, modo de operação
Variáveis independentes	Modo de operação (Tempo de alimentação anaeróbia)	C:N, Modo de operação (Tempo de alimentação anaeróbia)	Taxa de aeração e carga orgânica aplicada

Fonte: A autora, 2020.

Figura 13 - Detalhamento dos ciclos operacionais dos fotobioreatores em cada condição operacional. Alimentação anaeróbia/anóxica (■), fase aeróbia (■), Sedimentação (■) e Descarte do efluente (□)



Fonte: A autora, 2020.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

A fim de monitorar o desempenho dos reatores, foram realizadas coletas duas vezes por semana do afluente bruto (início do ciclo) e efluente tratado (finalização do ciclo), e uma vez por semana eram coletadas amostras do afluente bruto, após alimentação anaeróbia, para verificar o consumo do substrato, e do efluente tratado. As análises físico-químicas eram realizadas no mesmo dia da coleta, no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) e as análises de cromatografia eram enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologia Ambiental (LABIOTA), localizado no LITPEG, na UFPE. As análises de nitrato e nitrito foram realizados em Cromatografia de íons, no equipamento: ICS-2100 da Dionex; coluna analítica : IonPac AS23

2x250mm. Com pré-coluna; e com fase móvel: carbonato de sódio 4,5mM e bicarbonato de sódio 0,8mM. A Tabela 7 identifica os parâmetros físico-químicos analisados, as amostras e a frequência de análise ao longo do experimento.

O teste t foi o método estatístico utilizado neste estudo. O teste foi utilizado para verificar a influência do modo de alimentação na remoção de carbono orgânico, na remoção de $N-NH_4^+$, e na eficiência de desnitrificação. Também foi aplicado para avaliar o efeito da carga orgânica e da taxa de aeração na eficiência de desnitrificação. Todos os testes foram realizados sob um nível de significância de 95% ($p < 0,05$) e um número mínimo de amostras de $n=8$ para cada variável analisada. A análise estatística foi realizada no software EXCEL, adicionando o suplemento “Análise de Dados”.

Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos monitorados no afluente (AF), após alimentação anaeróbia (AN), efluente final (EF), Licor misto (LM).

Parâmetros	Métodos de análise	Amostras	Frequência
OD e pH	Sonda Multi-parâmetro	LM	1x/semana
Temperatura da sala	Termômetro	Ambiente	Diário
Demanda Química de Oxigênio	Colorimétrico	AF, EF, AN	2x/semana
Nitrito (N-NO₂⁻)	Cromatografia de íons	AF, EF, AN	2x/semana
Nitrato (N-NO₃⁻)	Cromatografia de íons	AF, EF, AN	2x/semana
Nitrogênio Amoniacal (N-NH₄⁺)	Destilação/ Titulométrico	AF, EF, AN	2x/semana
Fósforo Total	Colorimétrico	AF, EF, AN	2x/semana
Alcalinidade total e parcial	Titulométrico	AF, EF	2x/semana
Série de Sólidos	Gravimétrico	LM	1x/semana

Fonte: APHA, 2002.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A seguir serão apresentados os métodos utilizados para investigar as características físicas da biomassa fotogranular formada nos FRBS.

3.5.1 Índice volumétrico de lodo (IVL)

O Índice volumétrico de lodo (IVL) foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Schwarzenbeck et al. (2004). As leituras foram realizadas aos 3 e 30 minutos a partir de 1L do licor misto. O IVL foi calculado de acordo com a Equação 9:

$$IVLt = \frac{VLs * 1000}{SST} \quad (9)$$

Onde:

IVLt é o índice volumétrico de lodo sedimentado no tempo t;

VLs é o Volume de Lodo Sedimentado (mL/L);

SST é a concentração de sólidos suspensos totais do licor misto;

t é o tempo de sedimentação (min).

3.5.2 Granulometria por peneiramento

Para a realização desta análise, foi coletada quinzenalmente 200 mL do licor misto de cada reator. Foi utilizado um conjunto de peneiras confeccionadas em aço inoxidável com abertura de malhas de 0,2, 0,4, 0,6 e 1,0 mm. As peneiras foram empilhadas da menor para maior abertura das malhas, além de posicionar um recipiente, também de aço, para recolher a biomassa floclulenta ($\phi < 0,2$ mm). Após isto, a amostra era disposta por esse conjunto de peneira e determinado o SST de cada parcela de biomassa retida em cada peneira.

3.5.3 Substâncias Poliméricas Específicas (EPS)

O valor obtido no EPS é a soma das frações PN (Proteínas) e PS (polissacarídeos). A extração do EPS seguiu a metodologia descrita por Arellano-Badillo *et al.* (2014). E as frações de PN e PS foram extraídas pelo método descrito por Lowry *et al.* (1951) e Dubois *et al.* (1956), respectivamente.

3.5.4 Clorofila-a

Clorofila- a é uma medida utilizada que determina se há presença de microalga no sistema, havendo ou não sucesso na simbiose. Para determinação deste parâmetro, seguiu-se a metodologia proposta por Tang et al. (2016), em que foi coletado 20 mL do licor misto, centrifugado a 4000rpm por 10 min. Em seguida foi descartado o sobrenadante e adicionado 20 mL de acetona a 90% e 0,05 g de CaCO₃. Agitou-se a amostra no vortex mixer durante 1 min. Após isto, a suspensão formada foi armazenada em 4° C por 24 horas no escuro e a suspensão centrifugada em 4000 rpm por 10 min, e então o sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de Clorofila-a no meio. A concentração de Cl-a foi medida em quatro comprimentos de onda: 750 nm, 663 nm, 645 nm e 630 nm utilizando o espectrofotômetro ultravioleta (Equação 10). Solução de acetona a 90% foi ser utilizada como branco.

$$Cl_a = \frac{[(11,64 * (OD663 - OD750) - 2,16 * (OD645 - OD750) + 0,10 * (OD630 - OD750)] * V1}{V * \sigma} \quad (10)$$

Onde:

Cl-a (mg/L) é a concentração de clorofila-a;

V= volume em litros da amostra coletada;

V1= volume em mL de acetona 90% usada para extração;

OD630 = leitura da densidade óptica no comprimento de onda 630nm;

OD663 = leitura da densidade óptica no comprimento de onda 663nm;

OD645 = leitura da densidade óptica no comprimento de onda 645nm;

OD750 = leitura da densidade óptica no comprimento de onda 750nm;

σ = é o caminho óptico da cuvette (cm).

3.5.5 Microscopia

Imagens com ampliação de 100x e 400x foram obtidas através da câmera BEL view 7.1 photonics acoplada ao microscópio óptico (marca Leica®, modelo MDE) e através da câmera do celular XIAOMI S2 no mesmo microscópio.

3.6 CÁLCULOS REALIZADOS

Eficiência de Remoção

$$Ef = \frac{(Caf - Cef)}{Caf} * 100 \quad (11)$$

Onde:

Ef= Eficiência de remoção (%)

Ci= é a concentração do afluente (mg/L);

Cf:= é a concentração do efluente tratado (mg/L).

Eficiência de desnitrificação

$$Edes = \frac{NH4af - (NH4ef - NO2ef - NO3ef)}{NH4af} * 100 \quad (12)$$

Onde:

Edes= Eficiência de desnitrificação (%)

NH₄af= é a concentração de nitrogênio amoniacal do afluente (mg/L);

NH₄ef= é a concentração de nitrogênio amoniacal do efluente (mg/L);

NO₂af= é a concentração de nitrito do efluente(mg/L);

NO₃af= é a concentração de nitrato do efluente(mg/L).

Velocidade Superficial Ascecional do ar (Var)

$$Var = \frac{Qar}{Ab} * 100 \quad (13)$$

Onde:

Var= Velocidade superficial ascecional do ar (cm/s)

Qar= Vazão do ar, obtida no rotâmetro (m³/s);

Ab= Área da base do reator (m²).

Carga Volumétrica Aplicada (CV)

$$CV = \frac{Co * Qd}{Vu * 10^3} \quad (14)$$

Onde:

CV= Carga Volumétrica aplicada de DQO (kgDQO/m³·dia), Nitrogênio (kgN-NH₄⁺/m³·dia) ou Fósforo (kgP/m³·dia) por dia;

Co= Concentração de DQO, N-NH₄⁺, P ao afluyente (mg/L);

Qd= Vazão diária de afluyente tratado (m³/d);

Vu=Volume útil do reator (m³).

Vazão Diária de Esgoto (Qd)

$$Qd = Nc * Ve \quad (15)$$

Onde:

Qd= Vazão diária de esgoto (m³/dia);

Nc= número de ciclos realidos por dia;

Ve= Volume de enchimento a cada ciclo do reator (L).

Tempo de Retenção Hidráulica

$$TRH = \frac{Vu}{Qd} \quad (16)$$

Onde:

TRH= Tempo de retenção hidráulica de esgoto (dias);

Vu= Volume útil do reator (m³);

Qd= Vazão diária de esgoto (m³/d).

Taxa de crescimento da biomassa

$$Y = \frac{S * C \frac{dqo}{biomassa} * V}{(DQOaf - DQOef) * Q} * 100\% \quad (17)$$

Onde:

S= Coeficiente de inclinação da reta (g.SSV/L.dia);

Cdqo/biomassa= 1,42g.DQO/g.SSV é o coeficiente estequiométrico da DQO na biomassa (Chuang e Ouyang, 2000);

V= Volume útil do reator (L);

DQOaf= Concentração de DQO no afluyente (mg/L);

DQOef= Concentração de DQO no efluyente (mg/L);

Q= Vazão diária de afluyente no reator (L/dia).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão apresentados os resultados obtidos neste estudo e as pertinentes discussões. Neste estudo, duas estratégias foram utilizadas para cultivar AAGS. A primeira estratégia foi operar FRBS com 40 min de alimentação anaeróbia e a segunda estratégia foi operar FRBS com 60 min de alimentação anaeróbia (Fase I). Ambas estratégias foram bem sucedidas no desenvolvimento de AAGS com fração de biomassa granular > 90% e boa capacidade de sedimentação com valores baixos de IVL30. Entretanto, foi observada formação de fotogranulos aeróbios mais rapidamente o reator com fase de alimentação anaeróbia mais extensa (R2- 60min de alimentação anaeróbia), além de AAGS com estrutura mais compactas, maior tamanho, menor IVL30 e maior concentração de biomassa.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO AFLUENTE SINTÉTICO

As características do afluente sintético utilizado neste estudo estão descritas na Tabela 8. De acordo com Metclaf e Eddy (2016), neste estudo, foi utilizado esgoto sintético com características de intermediária e baixa concentração. Porém, devido ao funcionamento de batelada sequencial, o esgoto tornava-se diluído, apresentando baixa carga orgânica (1,0 - 1,7 kgDQO/m³.dia). Durante cada ciclo operacional, os FRBS foram alimentados com relação C:N= 4:1 (FI), e C:N= 8:1 (FII e FIII), com cargas carbonácea, nitrogenada e fosforada de 1,0 – 1,7 kgDQO/m³.dia, 0,3 – 0,1 kgN-NH₄⁺/m³.dia e 0,001 kgP-PO₄⁻³/m³.dia, respectivamente.

Tabela 8 - Características do esgoto sintético

Parâmetros (unidade)	Fase I	Fase II	Fase III
DQO (mg/L)	400±3	400±5	400±3
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	100±10	50±5	50±4
P-PO ₄ ⁻³ (mg/L)	10±1	10±2	10±1
Alcalinidade parcial (mg/L)	241±23	217±115	248±43
Alcalinidade total (mg/L)	69±4	68±11	91±3

Média ± desvio padrão

Fonte: A autora, 2020.

4.2 SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS FRBS ABORDANDO AS DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS

No item 4.2 serão sintetizados os resultados obtidos abordando as três condições operacionais, ao longo dos 180 dias de operação. Na Tabela 9 encontra-se o resumo das características físicas da biomassa. Observa-se que foi possível formar fotogrânulos aeróbios em ambos reatores na FI, porém apresentaram pequeno tamanho (0,45 - 0,6 mm), que pode estar associado à baixa carga orgânica aplicada (Cai *et al.*, 2019) e baixa concentração de clorofila-a durante a FI. Além do aumento do tamanho do agregado, o consórcio algal-bacteriano desenvolvido demonstrou melhoria na capacidade de sedimentação durante a FI, devido aos baixos valores de IVL₅ e IVL₃₀ obtidos. Em relação a concentração de clorofila-a, pode-se observar que houve um aumento significativo ao longo do experimento, indicando que foi desenvolvido com sucesso a simbiose entre as bactérias heterotróficas e os microrganismos fotoautotróficos.

Tabela 9 - Síntese dos resultados obtidos a cerca da caracterização da biomassa abordando as três condições operacionais.

Variáveis	FI (70 dias)		FII (70 dias)		FIII (40 dias)	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
SSV (mg/L)	2,2±0,2	3,0±0,7	4,9±1,0	6,4±0,9	3,9±0,1	4,6±0,8
IVL5(mL/g)	140±60	114±74	34±9	27±8	32±3	48±18
IVL30/IVL5	≈0,6	≈0,7	≈0,9	≈0,9	≈0,9	≈0,7
Cl-a (mg/L)	2,2±2,1	2,3±0,7	5,3±1,3	5,18±2,0	3,9±0,3	3,29±0,6
Tamanho granulos (mm)	≈0,45	≈0,6	0,6-1,0	0,6-1,0	0,6-1,0	0,2-0,4

Média ± desvio padrão

Fonte A autora, 2020.

As eficiências de remoção de DQO, N-NH₄⁺, P-PO₄⁻³ podem ser observadas na Tabela 10. Pode-se verificar que as eficiências de DQO no início do experimento (FI) eram superiores a 70% com concentração média de 106,0 mg/L de concentração no efluente. Com o aumento da relação C:N para 8:1 (FII), a remoção de matéria orgânica tornou-se superior a 90%, durante todo o experimento (FIII). Sabe-se que não há um valor definitivo para a concentração final de fósforo no

efluente tratado, porém observa-se que durante todo o experimento as eficiências de remoção de fósforo total foram baixas. Durante a FII e FIII, as remoções de $N-NH_4^+$ atenderam o limite de lançamento de esgoto presente na Legislação Federal – Resolução CONAMA N°430/2011, que dispõe que a concentração de $N-NH_4^+$ no efluente deve ser no máximo de 20 mg/L.

A alcalinidade total reflete a ocorrência ou não dos processos de nitrificação e desnitrificação. Durante a FI, a alcalinidade do efluente dos reatores era relativamente baixa, quando comparada com a alcalinidade do afluente, indicando a ocorrência do processo de nitrificação, porém não havendo o processo de desnitrificação. Por outro lado, a alcalinidade das FII e FIII é relativamente maior, já que houve a ocorrência dos processos de nitrificação e desnitrificação simultânea.

Tabela 10 - Síntese do desempenho dos reatores no tratamento de esgoto abordando as três condições operacionais.

Variáveis	FI (70 dias)		FII (70 dias)		FIII (40 dias)	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
DQOef(mg/L)	106,0±40,0	106,0±40,0	29,4±18,2	29,4±18,0	26,0±15,0	27,0±13,0
EfDQO (%)	73±10	73±10	93±5	93±4	93±4	93±3
N-NH ₄ ⁺ ef (mg/L)	40,7±15,8	42±17,7	3,3±1,3	4,0±1,9	3,0±0,8	3,0±0,9
EF N-NH ₄ ⁺ (%)	59±15	58±17	93,3±2,7	93±3,0	94,0±1,6	94±12,0
Nitrato (mg/L)	21,3±7,9	20±11,3	1,3±1,8	2,0±4,0	0,8±2,0	1,0±1,35
Nitrito (mg/L)	12,6±9,2	2,0±1,6	25,0±8,7	19,0±10,6	13,2±10,7	15,0±15,5
Fósforo (mg/L)	8,1±0,6	8,0±1,1	7,0±1,6	7,2±0,7	7,3±1,8	7,4±1,5
EF fósforo (%)	18,1±5,7	19,4±10,6	29,5±15,0	27,7±8,0	33,4±23,4	29,9±21,8
Alcalinidade total (mg/L)	22,2±7,0	16,4±6,0	101,3±51,9	89,9±52,9	160,7±87,4	160,3±115,5
Alcalinidade parcial (mg/L)	9,3±6,4	6,2±2,6	74,4±45,7	66,0±4,1	130,0±72,8	131,1±94,6

Média ± desvio padrão

Fonte: A autora, 2020.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

O item 4.3 traz resultados e discussões das características físicas da biomassa fotogranular desenvolvidas nos FRBS durante os 180 dias de operação.

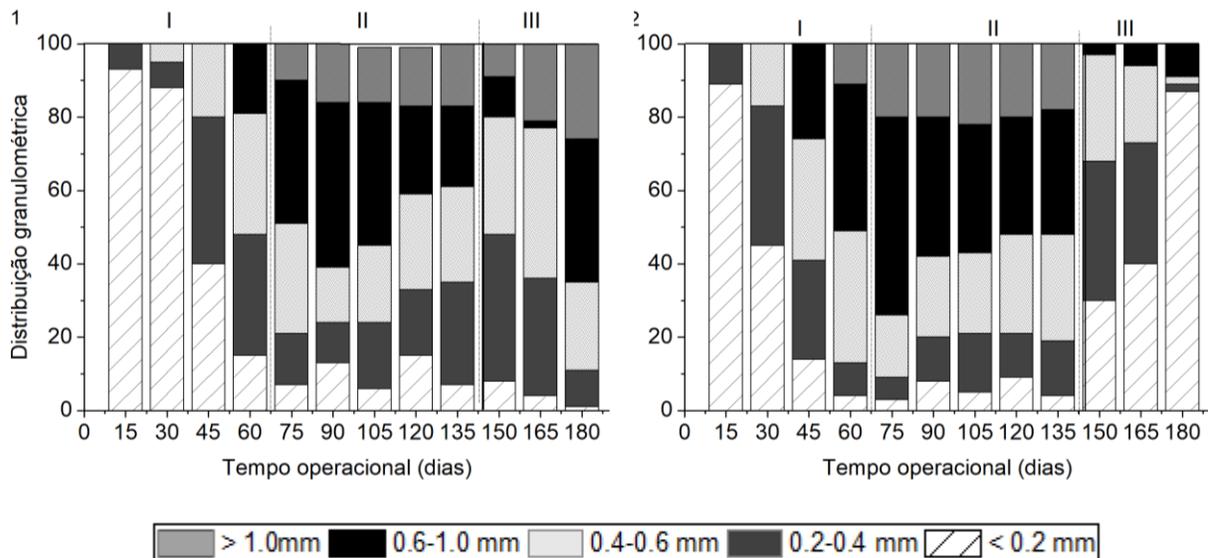
4.3.1 Distribuição granulométrica da biomassa

No tópico 4.3.1 será discutido o desenvolvimento da biomassa com base na distribuição granulométrica do lodo, que está disposta na Figura 14. Ambos reatores foram inoculados com a mistura de lodos ativados e microalgas esféricas, *Chlorella vulgaris*. O inóculo apresentava biomassa floculenta com partículas de diâmetro inferior a 0,2 mm (Dia 0).

Sabe-se que um reator com predominância granular é aquele que apresenta 50% das partículas com diâmetro superior a 0,2 mm, já o reator com granulação completa deve ser constituído por 80% das partículas da biomassa com diâmetro superior a 0,2 mm (de Kreuk *et al.*, 2005). Portanto, pode-se observar no R1 que após 40 dias de operação, deu-se início o processo de granulação, desenvolvendo grânulos com granulometria entre 0,2 e 0,4 mm, porém a granulação completa foi constatada somente a partir do dia 55, com grânulos com granulometria entre 0,2 e 0,6 mm. Por outro lado, no dia 30, o R2, que operava com 60 min de fase anaeróbia, constatou predominância granular, com grânulos de diâmetro variando entre 0,2 e 0,6 mm. A granulação completa foi tida com 40 dias de operação, promovendo grânulos com diâmetro variando entre 0,2 e 1,0 mm. Assim, os resultados revelaram que a duração de 60 min de fase de alimentação anaeróbia/anóxica promoveu a granulação mais rápida, com grânulos maiores e mais compactos, corroborando com Yuan *et al.* (2019), que desenvolveram grânulos com estrutura mais compacta e menos propensos à desintegração com diâmetro variando entre 1,0 e 1,5 mm.

Além disso, foi observado que o desenvolvimento granular no R2, deu-se num período de tempo menor que reportado por Rollemberg *et al.* (2019). Os autores alcançaram a granulação após 70 dias de operação em RBS tratando esgoto doméstico com glicose em sua composição. Para tanto, sugere-se que a presença das microalgas no grânulo favoreceu o processo de formação granular. O mesmo foi reportado por Zhang *et al.* (2018)b, que atribuíram que a granulação foi observada mais rapidamente em FRBS devido à aderência das microalgas na superfície granular.

Figura 14 - Distribuição granulométrica da biomassa dos fotobioreatores durante as três condições operacionais



Fonte: A autora, 2020.

Durante a FII, ambos reatores eram constituídos por grânulos de granulometria média de 0,6 - >1,0 mm. Foi observado que não houve o desenvolvimento de fotogrânulos com diâmetro superior a 1,5 mm. Cai *et al.* (2019) operando FRBS tratando esgoto doméstico de baixa carga orgânica, desenvolveram fotogrânulos de pequena dimensão, com diâmetro médio de 0,61 mm. Wang *et al.* (2019), por sua vez, desenvolveram grânulos aeróbios com diâmetros variando de 2,0 a 3,0 mm, submetidos no tratamento de esgoto de alta carga orgânica aplicada. Porém, devido à grande dimensão granular e extensa presença de microzonas anaeróbias, o sistema apresentou indícios de desintegração. Zhang *et al.* (2018)b ao operarem FRBS com carga orgânica de 2,4 kgDQO/m³.dia, cultivaram fotogrânulos aeróbios com diâmetro superior a 2,4 mm. Ademais, na literatura é reportado que a carga orgânica aplicada do sistema influencia na dimensão do agregado.

Seguindo essa vertente, observa-se que durante a FIII, R1 permaneceu com a biomassa granular estável, com fotogrânulos com diâmetro variando entre 0,8 - >1,0 mm. Além disso, o aumento da troca volumétrica (40% para 70%) proporcionou a seleção de partículas de maior diâmetro e somente 6% do agregado provia de $\phi < 0,2$ mm. Por outro lado, no 158^o dia de operação, foi observado, no R2, maior parcela de biomassa floculenta, com flocos de diâmetro <0,2 mm, além disso, posteriormente será discutido que foi constatado o aumento dos valores de IVL₅ e a redução na concentração de sólidos em suspensão voláteis (SSV), indicando sinais de

desintegração granular. Após 180 dias de operação, cerca de 90% da biomassa no R2 era formada por flocos microbianos com diâmetro $<0,2\text{mm}$.

4.3.2 Índice volumétrico de lodo (IVL)

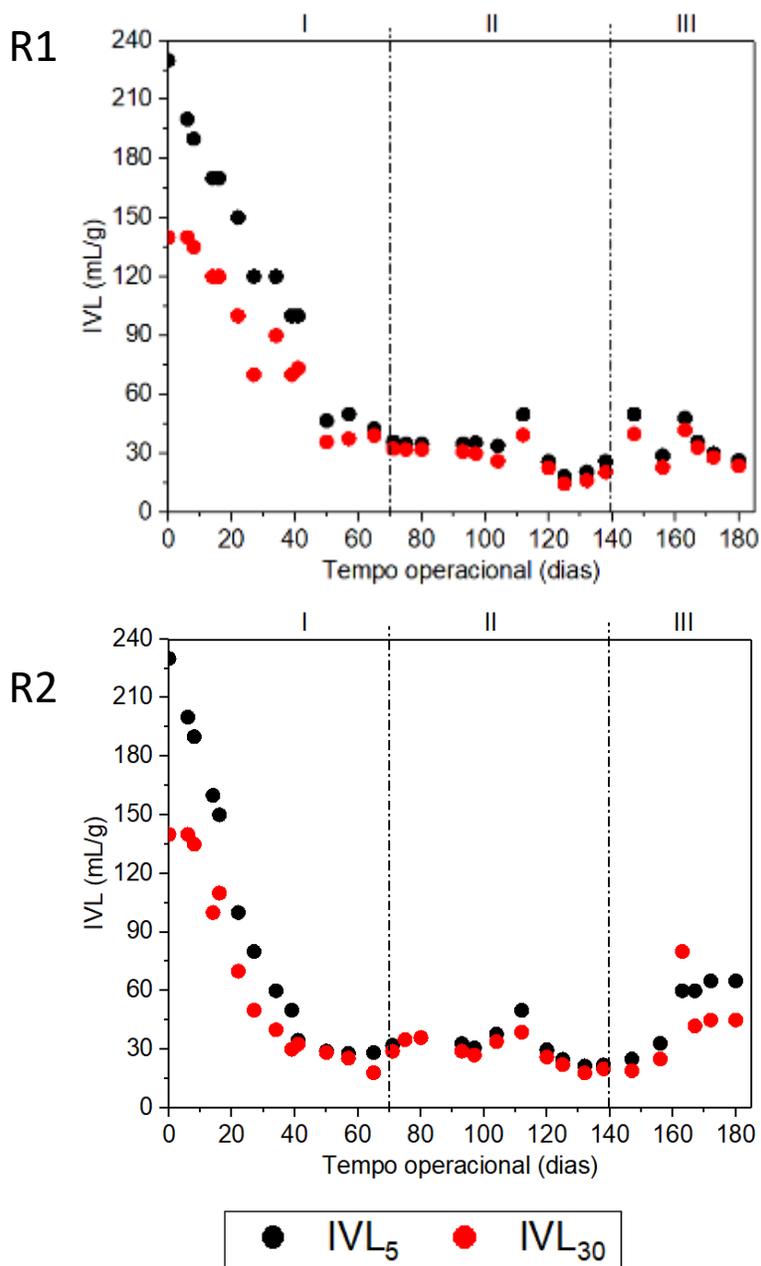
No tópico 4.3.2 será discutido a capacidade de sedimentação da biomassa dos reatores, em termos de Índice volumétrico do lodo (IVL).

O inóculo era composto por biomassa flocculenta e apresentava baixa sedimentabilidade ($\text{IVL}_{30} = 224 \text{ mL/g}$). Ambos reatores foram submetidos a tempo de sedimentação curto (3 min), com intuito de selecionar biomassa de melhor sedimentabilidade, descartando os flocos de menores tamanhos e menos densos. Com isso, aos poucos os reatores formaram agregados microbianos de peso suficiente para melhorar a capacidade de sedimentação, e o IVL_5 foi diminuindo ao longo do experimento. No 40º dia de operação, ou seja, no início do processo de granulação, o R1 apresentava $\text{IVL}_5 = 100 \text{ mL/g}$. Ao passo que no 40º dia de operação, R2 apresentava $\text{IVL}_5 = 60 \text{ mL/g}$. Salienta-se que, coincidentemente, durante a FI, após 30º e 55º dia de operação para R1 e R2, respectivamente, houve predominância de diatomáceas, *Navícula sp*, mais especificamente. Este fato, além do processo de granulação, pode ter auxiliado nos menores valores de IVL_5 observados nos reatores a partir deste período. Arcila e Buitrón (2016) reportaram que a presença de diatomáceas no sistema favorece a capacidade de sedimentação da biomassa, uma vez que a parede celular destas é formada por sílica, tornando-as mais pesada que outras microalgas. Ao final da FI, ambos reatores possuíam biomassa com boa sedimentabilidade, apresentando IVL_5 de 50 e 23mL/g para R1 e R2, respectivamente (Figura 15).

Durante a FII, os reatores apresentaram comportamento bastante semelhante quanto a capacidade de sedimentação do lodo, já que neste período granular, os fotogrânulos permaneciam estáveis, maduros e compactos com IVL_5 de 26 e 22 mL/g para R1 e R2, respectivamente, ao 130º dia de operação. Durante a FIII, R1 permaneceu com a biomassa granular com excelente sedimentabilidade, e ao aumentar a troca volumétrica para 70%, não foi percebida alteração dos valores de IVL do sistema. Ao 180º dia de operação, o R1 contava com $\text{IVL}_5 = 20 \text{ mL/g}$, por outro lado, foi constatado aumento nos valores de IVL no R2, indicando sinal de desintegração. No dia 150, o IVL_5 do R2 aumentou de 22 mL/g para 45 mL/g. Wang, L. *et al.* (2016) obtiveram valores de $\text{IVL}_5 = 76,8, 57,14$ e $42,55 \text{ mL/g}$ para o sistema composto por lodos ativados, *Chlorella sp.*, e

consórcio de lodos ativados com *Chlorella sp.*, respectivamente. Liu *et al.* (2018) operaram FRBS tratando esgoto sintético e obtiveram fotogrânulos aeróbios provenientes do consórcio alga-bactéria com $IVL_5 = 21,8-29,6$ mL/g.

Figura 15 - Variação da concentração de IVL_5 e IVL_{30} dos fotobioreatores durante as três condições operacionais



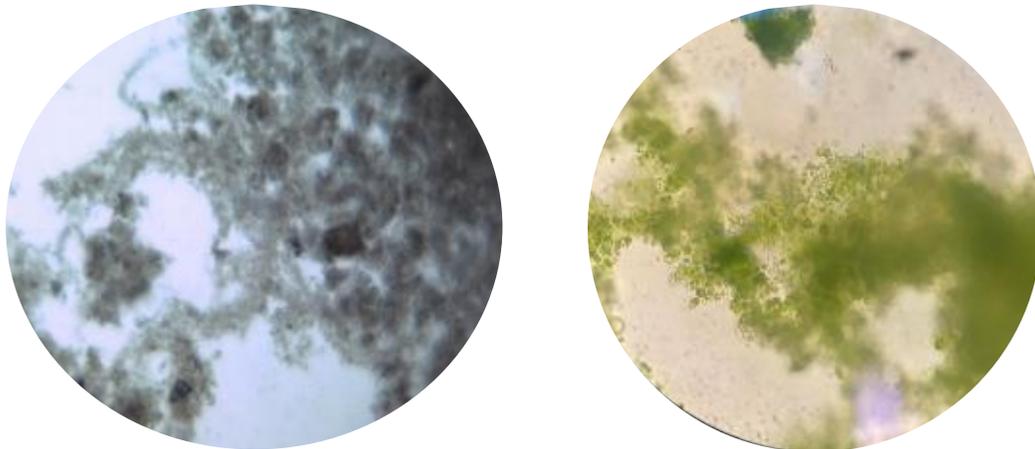
Fonte: A autora, 2020.

Para tanto, os resultados obtidos neste estudo, constataram que a bioaglutimação da microalga com lodos ativados, auxilia na separação destas do efluente tratado através da sedimentação, contornando a necessidade de aplicação de técnicas de colheita, como floculação, filtração ou centrifugação.

4.3.3 Formação dos fotogrânulos aeróbios

No tópico 4.3.3 será discutido o desenvolvimento dos fotogrânulos aeróbios ao longo do experimento, através de observações visuais e microscópicas. O inóculo de ambos reatores era constituído por biomassa floculenta e microalga esférica, e pode ser visto na Figura 16.

Figura 16 - Inóculo do sistema observado no microscópio com ampliação de 100x do lodo aeróbio (a esquerda) e da microalga *Chlorella vulgaris* (a direita).



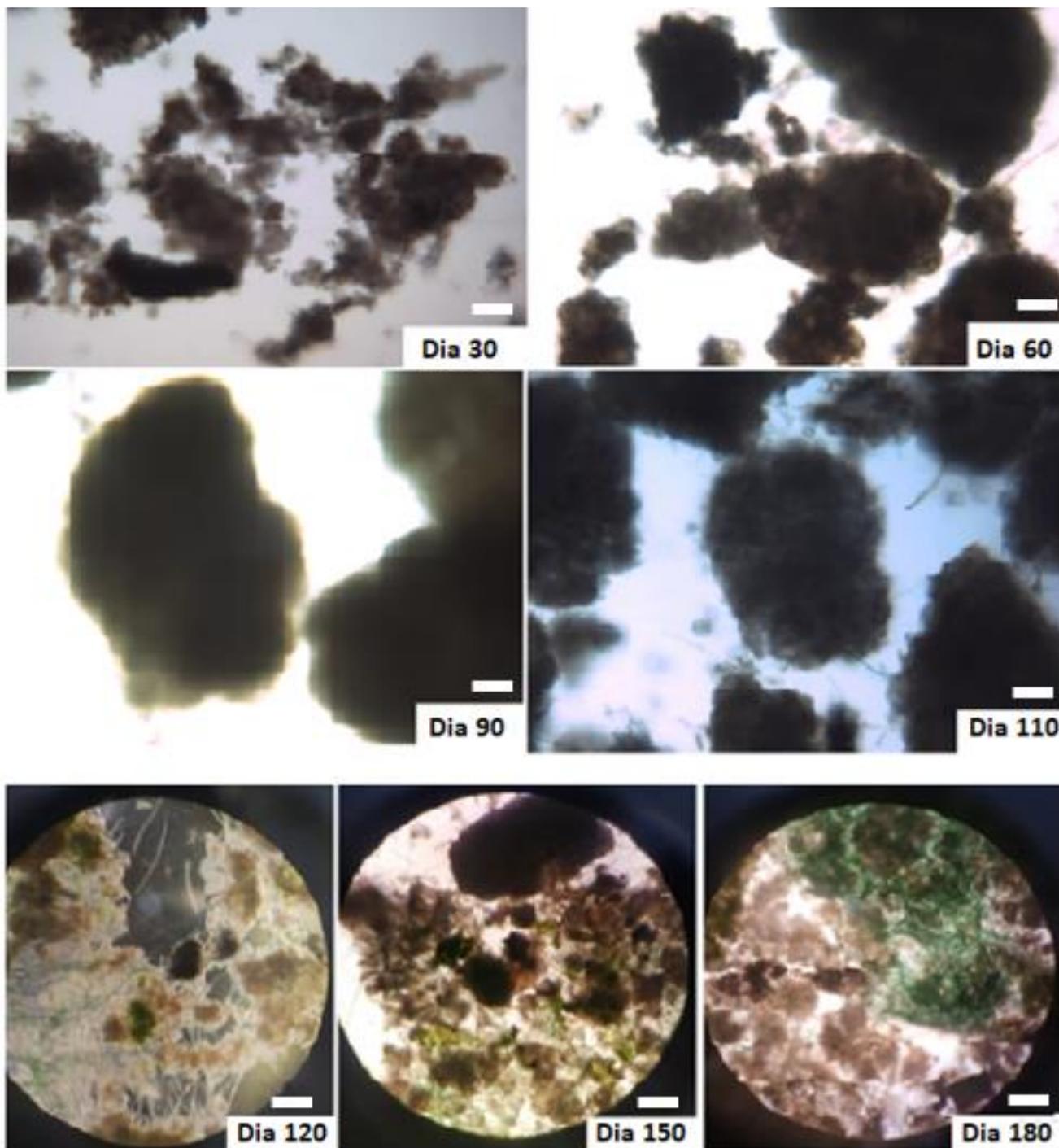
Fonte: A autora, 2020.

Nas Figuras 17 e Figura 18 contêm imagens microscópicas com ampliação de 100x do desenvolvimento da biomassa granular ao longo do experimento. Observando a Figura 17, tem-se que no 30° dia de operação, a biomassa do R1 era predominantemente floculenta, e somente após o dia 45 foram observados grânulos aeróbios de pequeno tamanho, apesar do sistema ainda apresentar flocos espalhados e amorfos. Por sua vez, ao 30° dia de operação, R2 continha grânulos pequenos, porém ainda com presença de flocos microbianos (Figura 18). No 70° dia de operação, ambos reatores apresentavam biomassa com formato esférico e compacto, de coloração marrom escuro, através de observações visuais e microscópicas (Figura 19 (a) e (c)). Assim, durante a FI,

foi possível desenvolver os fotogrânulos aeróbios, alcançando a estabilidade granular com grânulos maduros, porém de pequeno tamanho.

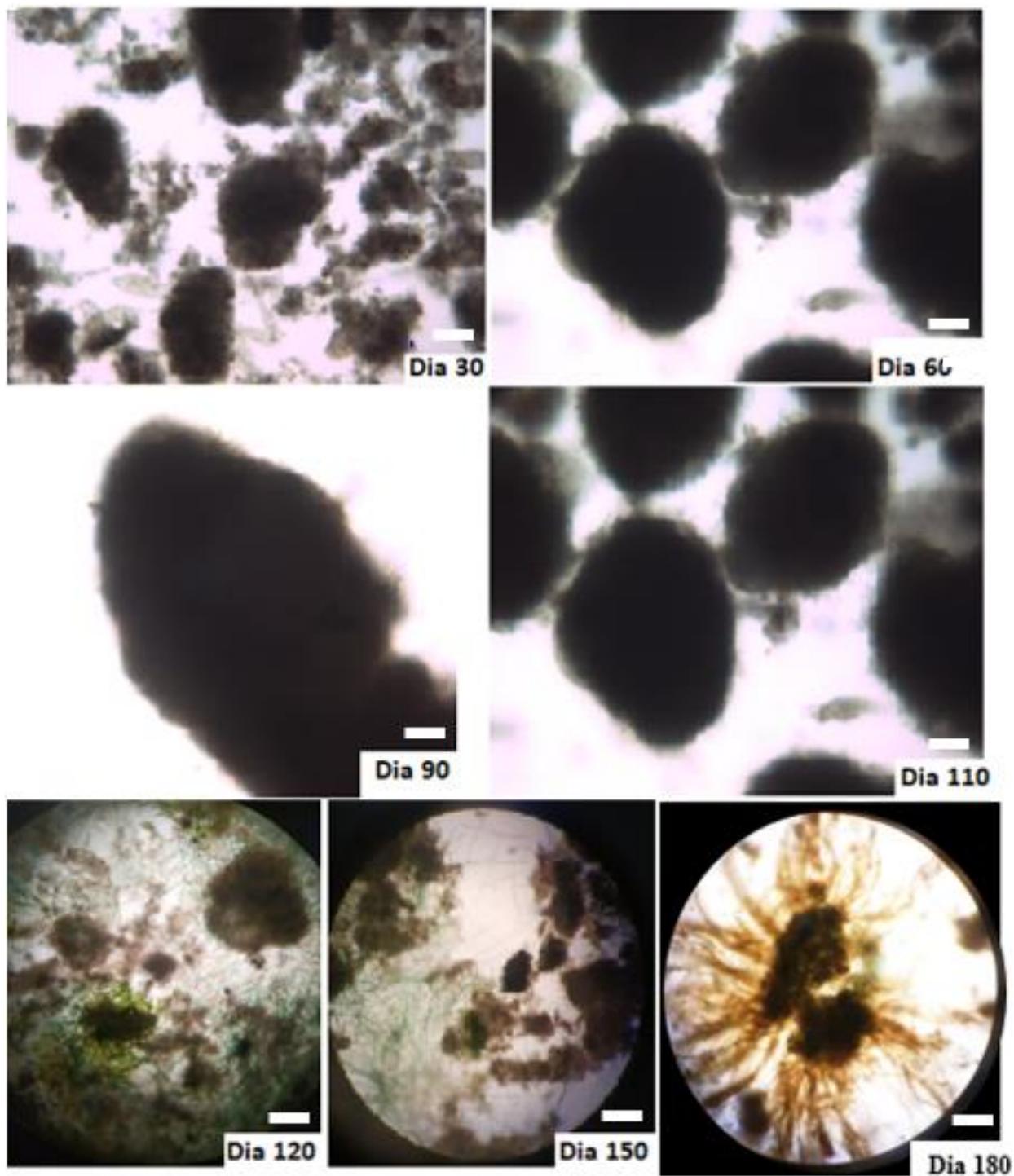
Ao longo da FII, pode-se observar na Figura 17 e Figura 18, a biomassa era predominantemente granular, apresentando grânulos bem formados. Ao 130º dia de operação, foi observada predominância de microalgas filamentosas e cianobactérias aderidas à superfície dos fotogrânulos, que estavam servindo como “ponte” para favorecer a estabilidade fotogranular.

Figura 17 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do R1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x (Barra 0,2 mm).



Fonte: A autora, 2020.

Figura 18 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do R2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x (Barra 0,2 mm).



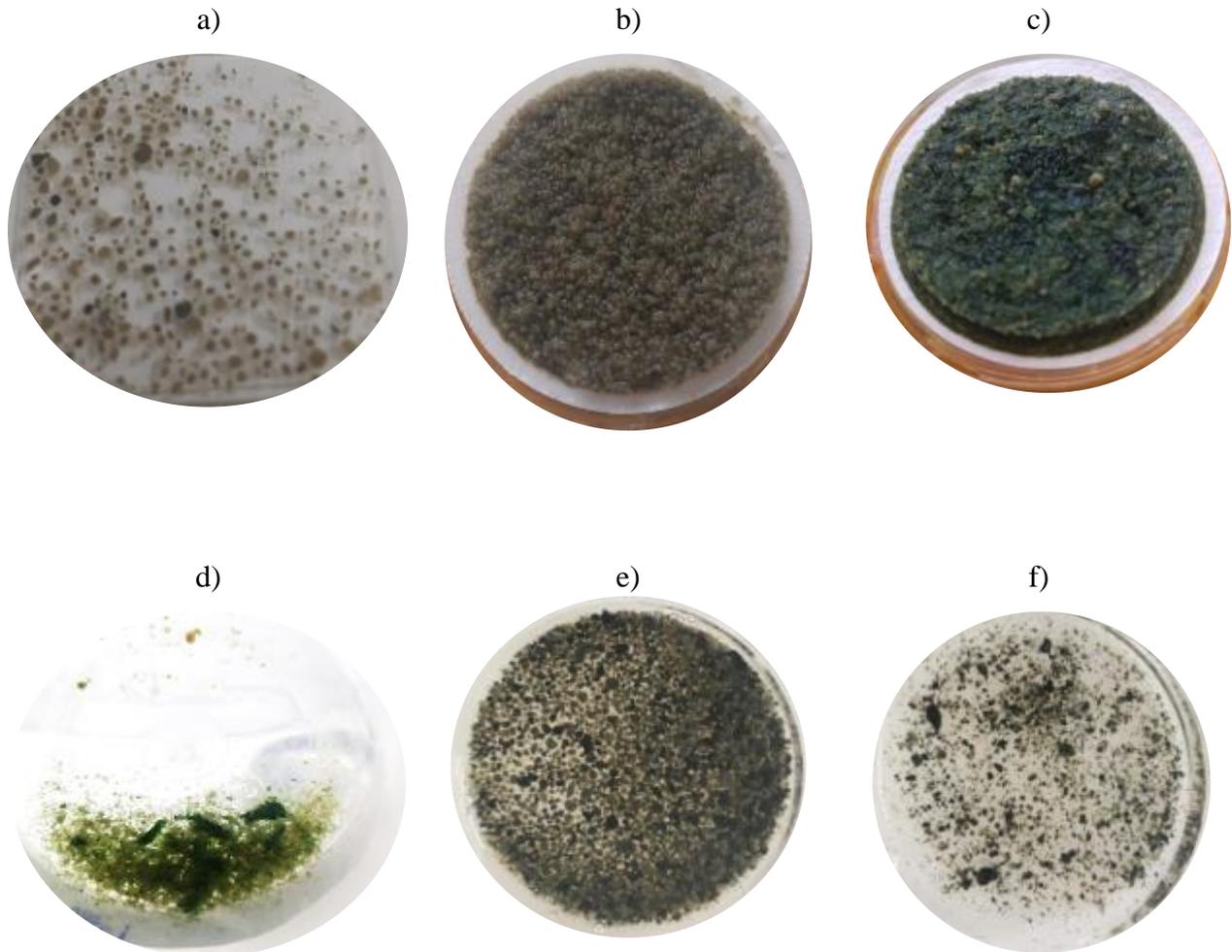
Fonte: A autora, 2020.

Durante a FIII, os fotogrânulos do R1 permaneceram estáveis com predominância de cianobactérias. He *et al.* (2018) observaram que, ao contrário dos sistemas com grânulos compostos somente por bactérias, o consórcio alga-bactéria consegue manter a estabilidade em sistemas com baixa carga orgânica. Neste estudo, aos 140 dias de operação não havia sinal de desintegração, e a biomassa apresentava estrutura esférica e compacta, com coloração verde-escuro (Figura 19 (b) e Figura 19 (d)). Zhang *et al.* (2018b) tratando esgoto doméstico sintético, operaram FRBS com fase anaeróbia de 60 min, e desenvolveram com sucesso fotogrânulos aeróbios com $\varnothing \approx 1,0\text{mm}$, mantendo-os sob operação por 120 dias, sem sinal de desintegração. Bassin *et al.* (2019), por sua vez, reportaram que os grânulos aeróbios cultivados em RBS, sofreram desintegração após 70 dias de operação. Os resultados indicam que a presença de microalgas na superfície e no interior dos fotogrânulos, promove grânulos mais estáveis e menos propensos à desintegração.

Por outro lado, durante a FIII, as cianobactérias presente no R2, não suportaram a mudança da condição operacional, e maior parte destas desapareceu do sistema. A Figura 19 (e) mostra a comparação entre a biomassa do R1 e a biomassa do R2 ao 180° dia de operação. O mecanismo de desintegração observado em R2 provavelmente ocorreu devido a dois fatores:

- Durante a FIII, os grânulos em R2 tinham uma forma irregular cercada por estruturas filamentosas. Yuan *et al.* (2019) associam a glicose como fator de favorecimento de crescimento de bactérias filamentosas, levando à instabilidade granular.
- Ao operar os FRBS com $Var = 0,55\text{ cm/s}$, foi possível obter com sucesso o consórcio granular, apresentando diâmetro superior a 1,5mm e diâmetro médio de 0,8mm. Portanto, com a adoção da $Var = 0,3\text{ cm/s}$, houve redução da força de cisalhamento hidrodinâmica aplicada. Yuan *et al.* (2019) também reportaram que a aplicação de baixa tensão de cisalhamento favorece a formação estrutural menos compactas e menos densas.

Figura 19 - Aspecto da biomassa após (a) 50 dias de operação (b) 70 dias de operação, (c) 120 dias de operação. (d) Biomassa granular e flocos de microalgas filamentosas aos 110 dias de operação. (e) Biomassa granular do R1 no dia 180. (f) Biomassa desintegrada do R2 no dia 180.



Fonte: A autora, 2020.

4.3.4 Surgimento das microalgas

No tópico 4.3.4 serão discutidos os surgimentos das espécies das microalgas abordando todas as condições operacionais. As Figuras 20 e 21 contêm imagens microscópicas com ampliação de 400x evidenciando o surgimento de microalgas ao longo do experimento.

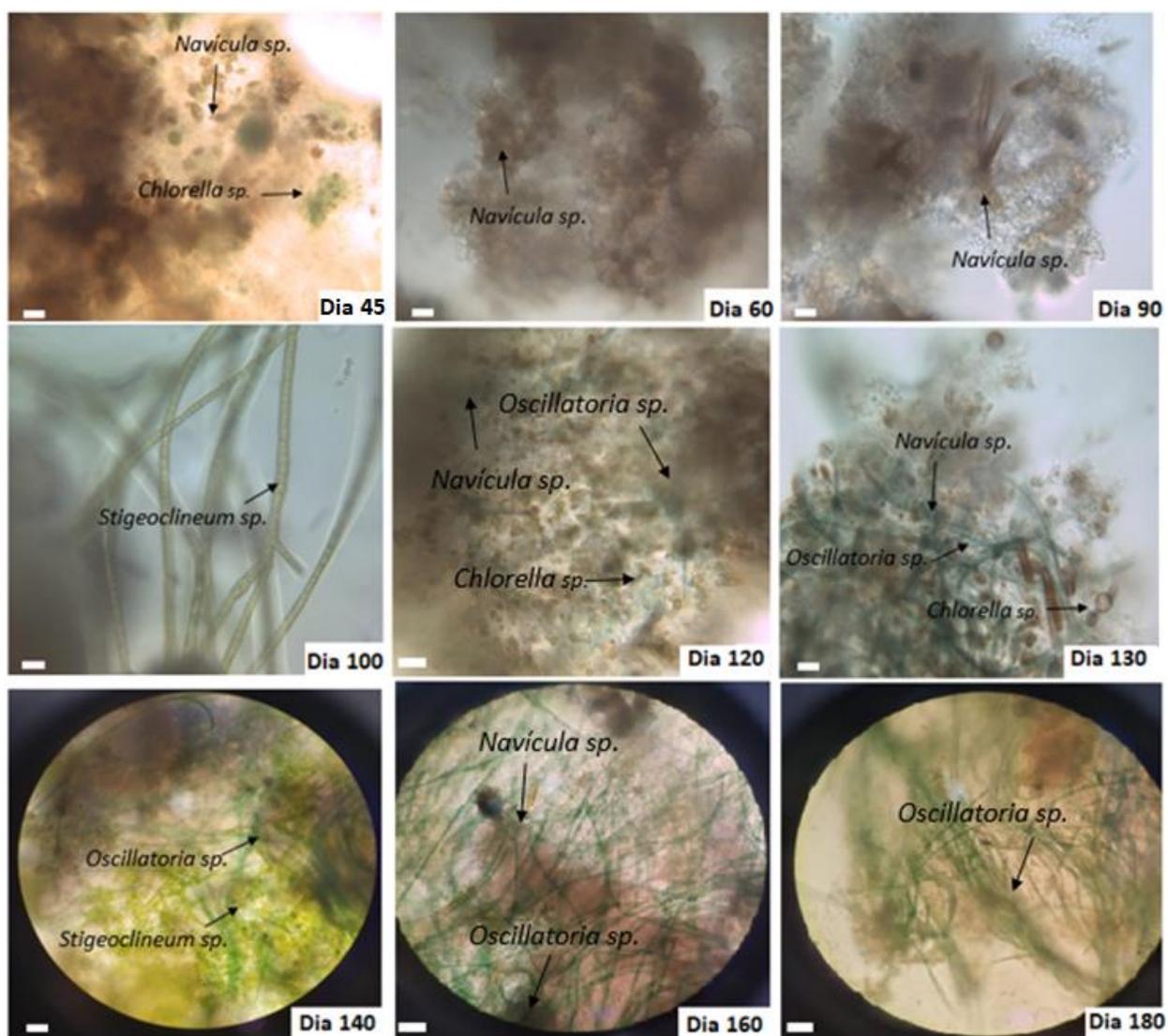
No início do experimento, foi possível perceber que as *Chlorella vulgaris* não se adaptaram ao sistema. Salienta-se que não houve aclimatização destas com o afluente sintético nem com o lodo aeróbio utilizado, que teve como resultado o desaparecimento quase total destas microalgas. Além disto, o fato do sistema ter sido inoculado com alta relação de biomassa (SSV) de lodo:alga

ter, indica que as bactérias heterotróficas dominaram o sistema, dificultando a penetração da iluminação no reator. Para tanto, com deficiência de iluminação, as microalgas podem ter apresentado dificuldade para se adaptar ao sistema, diminuindo consideravelmente a concentração destes microrganismos no sistema.

Apesar disto, a partir do dia 45° e 30° até o fim da FI, para R1 e R2, respectivamente, observou o florescimento de diatomáceas, *Navícula sp.*, e clorofíceas, *Chlorella sp.* (Figura 20 e Figura 21). Este fato pode estar atribuído à preferência destas microalgas pelo nitrogênio amoniaca, seguido de nitrato (Zhang *et al.*, 2018b; Geider e La Roche, 2002). Os resultados revelam que durante a FI foi possível desenvolver os fotogrânulos aeróbios. Além disso, as bactérias filamentosas desenvolvidas na FI, desempenharam um papel fundamental na fotogranulação, agindo como pontes, e fornecendo espaço suficiente para a formação e aderência das microalgas nos grânulos aeróbios (He *et al.*, 2018).

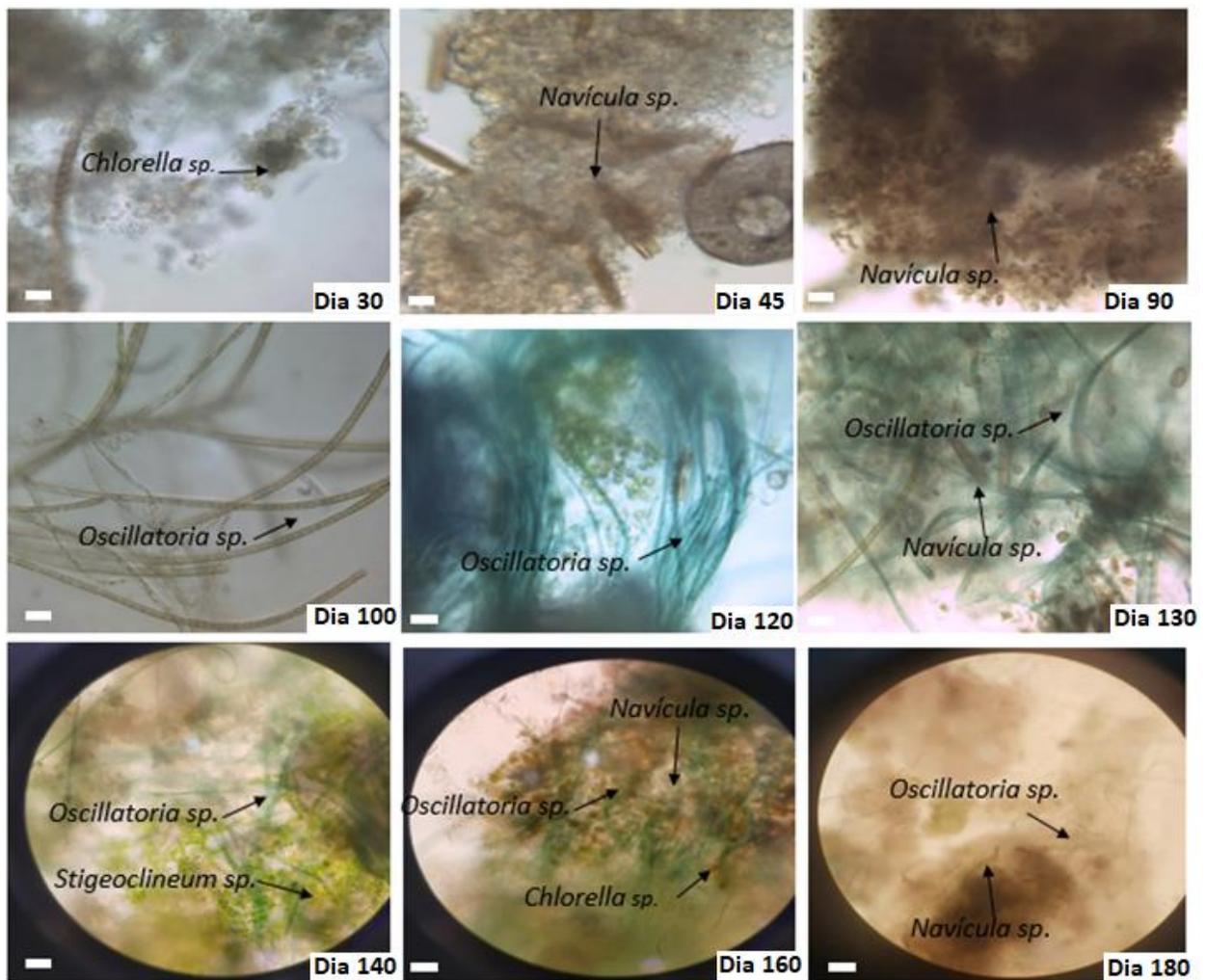
Para ambos FRBS, a partir do 100° dia de operação, surgiram as microalgas filamentosas (*Stigeoclonium sp.*), e cianobactérias (*Oscillatoria sp.*). Ao final da FII, o sistema estava com predominância de cianobactérias, que conferiram estabilidade granular, servindo como “ponte” entre os flocos, o que pode ter influenciado no aumento do tamanho dos agregados e evitado a desintegração da biomassa. Esta observação corrobora com Abouhend *et al.* (2018), que afirmam que o desenvolvimento de cianobactérias no sistema, promove grânulos mais estáveis e menos passíveis à desintegração. Além disto, foi observado que a predominância de cianobactérias na FII inibiu o crescimento das outras espécies de microalgas.

Figura 20 - Acompanhamento do aparecimento de microalgas no R1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 400x. (Barra de 0,4 μm)



Fonte: A autora, 2020.

Figura 21 - Acompanhamento do aparecimento de microalgas no R2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 400x. (Barra de 0,4 μm)

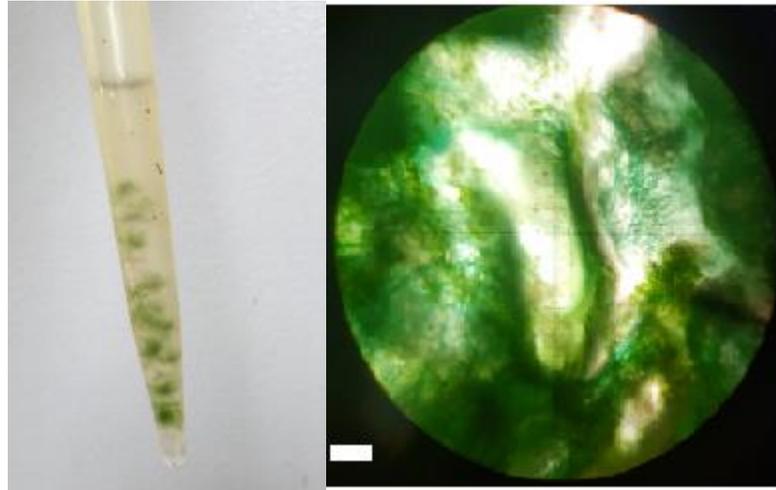


Fonte: A autora, 2020.

O florescimento de cianobactérias pode estar relacionado ao acúmulo de $N-NO_3^-$ (Arcila e Buitrón, 2017). Já que durante a FII, ambos reatores apresentaram concentração média de nitrato de $25 \pm 8 \text{ mg/L}$ e $23 \pm 8 \text{ mg/L}$ para R1 e R2, respectivamente. Ao longo da FII houve o desenvolvimento de flocos de cianobactérias no líquido (Figura 22). Ademais, Yang *et al.* (2018) observaram que à medida que as cianobactérias (*Oscillatoria sp.*) dominavam o sistema, as microalgas verdes desapareceram gradualmente. Indicando que a predominância de cianobactérias, inibe o crescimento de outras espécies de microrganismos autotróficos. Pouliot (1989), por sua vez, obteve em seu sistema a coexistência de cianobactérias filamentosas (*Phormidium sp.*) e outras

microalgas, atribuindo ao fato do gênero *Phormidium sp.* ser caracterizado por uma alta tolerância à diversidade de microalgas.

Figura 22 - Aparecimento de (a) floco de cianobactérias no 100 dia de operação em ambos reatores no dia 130 (b) Ampliação de 100x no microscópio.

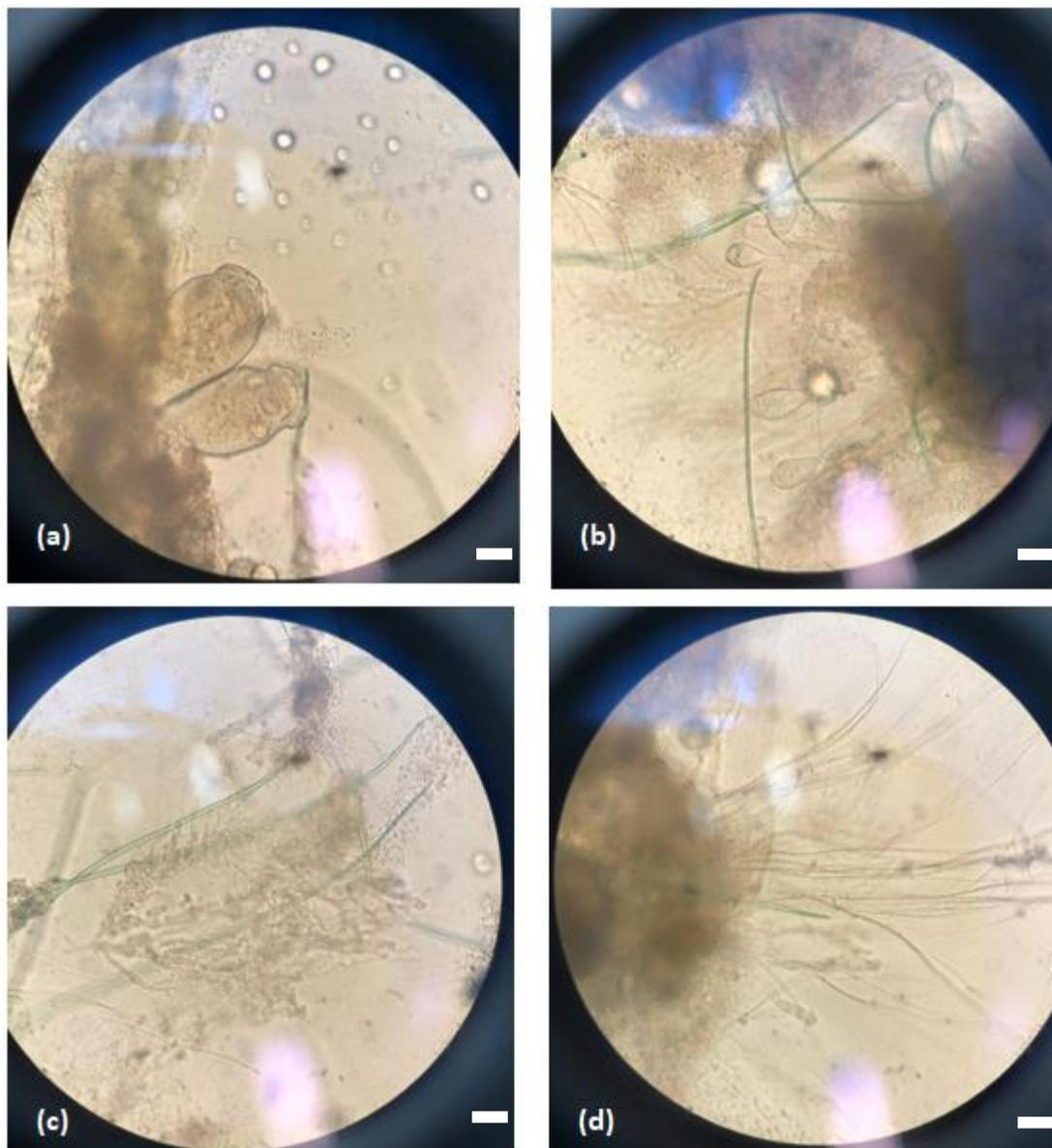


Fonte: A autora, 2020.

Durante a FIII, o R1 permaneceu com predominância de cianobactérias, mantendo a estabilidade granular até o 180º dia de operação. Como mencionado no Tópico 5.3.3, com aplicação da $Var= 0,33 \text{ cm/s}$, foi observada desintegração granular no R2. Além do mencionado, a desintegração pode estar relacionado à perturbação do metabolismo e função biológica das cianobactérias, levando a redução drástica destas na FII. Çelekli *et al.* (2016) explicam que, respostas bioquímicas de cianobactérias em diferentes condições de ecossistemas podem ser usadas na avaliação ecológica delas. Além disto, é possível observar que, no momento que houve o desaparecimento das cianobactérias, houve o reaparecimento das diatomáceas (*Navículla sp.*).

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o consórcio algal-bacteriano foi favorecido na condição FI. Ademais, é possível inferir que o surgimento das microalgas no processo de fotogranulação aeróbia ocorre em etapas, primeiro diatomáceas e clorofíceas são os autótrofos predominantes, em seguida cianobactérias filamentosas atuam na agregação da biomassa.

Figura 23 - Fotografias tiradas no microscópio de microrganismos encontrados no dia 150. (a) Vorticella com ampliação de 400x, (b) Vorticella com ampliação de 100x, (c) Zoogloea com ampliação de 100x (d) Bactérias filamentosas na ampliação de 100x (Barra de 0,1 mm).



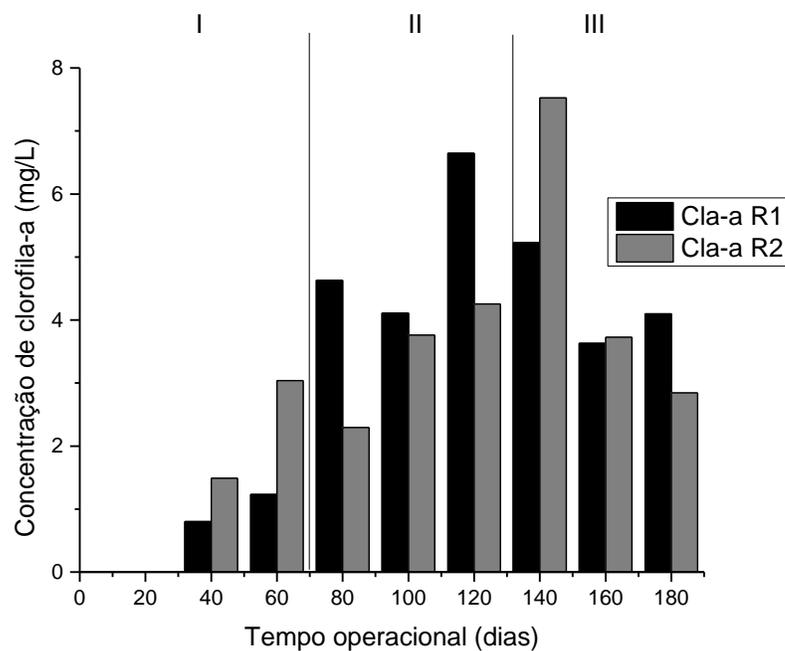
Fonte: A autora, 2020.

Além disso, outros microrganismos foram encontrados aderidas à superfície fotogranular, como *vorticella*, *rotíferos* e *zoogloea*s. Indicando a presença de uma rica população microbiana nos grânulos, além de explicitar bom funcionamento do sistema (Figura 23). Tang *et al.* (2016) demonstraram que a chave para a estabilidade do consórcio algal-bacteriano era a possível aderência das algas à *zoogloea*, além de serem capturadas pelos flocos e sedimentarem juntas.

4.3.5 Clorofila-a

No tópico 4.3.5 serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para clorofila-a em ambos FRBS, ao longo do experimento (Figura 24). A concentração de Cl-a foi monitorada afim de avaliar o desenvolvimento do consórcio granular alga-bactéria. A Figura 24 mostra que ao dia 30, R1 e R2 continham microalgas no sistema (Cla-a= 0,80 e 1,49 mg/L para R1 e R2, respectivamente). A concentração de clorofila-a no sistema confirma com o tópico anterior, em que foi possível desenvolver o consórcio alga-bactéria em FRBS sob clima tropical (29°C), porém é observado a variação deste parâmetro ao longo experimento, devido à aderência na parede do reator, onde a iluminação era mais intensa.

Figura 24 - Variação das concentrações de clorofila-a durante as três condições operacionais



Fonte: A autora, 2020.

Com a lavagem dos reatores, as microalgas aderidas retornavam para o sistema, intensificando a coloração verde-escura e, conseqüentemente, aumentando a concentração de clorofila-a nos FRBS. O aumento da concentração de clorofila-a indica o acúmulo de microalgas durante a fotogranulação (He *et al.* 2018). Durante a FIII, a concentração de clorofila-a despencou de 5,23 para 3,63 mg/L no R1, e 7,52 para 3,73 mg/L no R2. Assim, os resultados indicam que os microrganismos autotróficos não conseguiram acompanhar o crescimento do SSV no reator. Sun

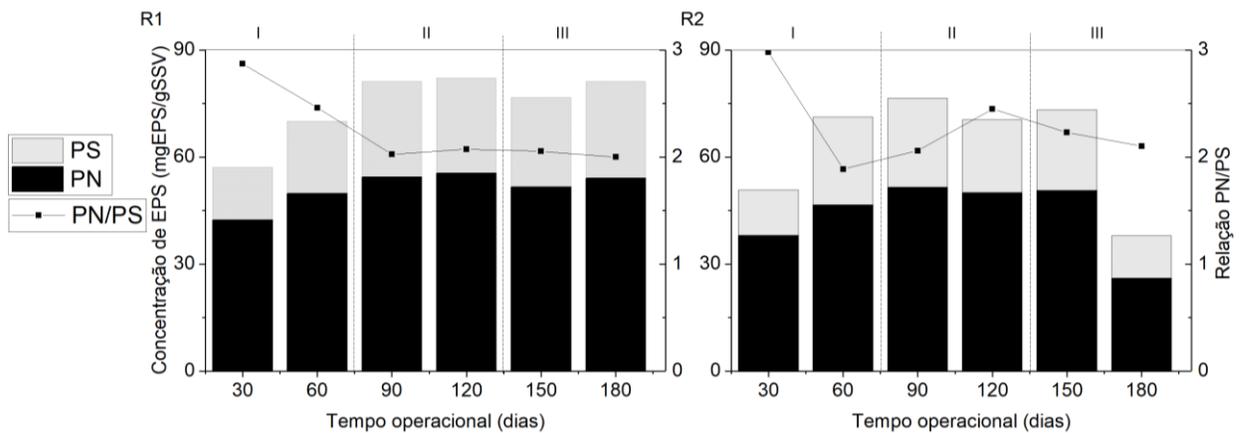
et al. (2018) atribuem que a elevada concentração de lodo no sistema resulta na diminuição da intensidade luminosa para a população algal e, como consequência, limita o crescimento das microalgas. A diminuição da concentração de clorofila-a no R1 deve-se à desintegração da biomassa, descartando as microalgas junto com a biomassa floculenta do sistema.

4.3.6 EPS

No tópico 4.3.6 serão apresentados e discutidos os resultados de EPS em ambos FRBS, somente a partir do dia 30 (início do processo da fotogranulação). Na Figura 25 está apresentado a concentração de EPS, dividido em frações de proteína (PN) e polissacarídeos (PS).

Com relação ao EPS, sabe-se que são constituídas por polissacarídeos, proteínas e outras substâncias, que atuam como um cola ”para formação e estabilidade de grânulos. Os fotogrânulos cultivados apresentaram mesma tendência, com relação a este parâmetro. Na fase de maturação, ambos apresentaram maiores valores de PN ($51,2 \pm 4,8$ e $43,7 \pm 10$ mg/gSSV para R1 e R2, respectivamente). Rollemberg *et al.* (2019) constaram que os RBS cultivados com glicose apresentaram frações de PN superiores aqueles cultivados com acetato. Indicando que o substrato influencia na formação do EPS. Além disto, foi observado uma diminuição da concentração de EPS no R2 durante a FIII, indicando que ao ocorrer a desintegração e diminuição das cianobactérias, a formação de EPS sofreu decréscimo. Para tanto, observa-se que a fração de proteínas (PN) manteve-se maior durante todo o experimento. Estes resultados corroboram com Li *et al.* (2015) e Zhao *et al.* (2018), que observaram maior produção de proteína (PN) durante o período granular, com fotogrânulos maduros e estáveis. Por outro lado, He *et al.* (2018) obtiveram maior produção de polissacarídeos (PS) durante a formação granular, indicando que, possivelmente a fração PS pode atuar como contribuinte na fotogranulação.

Figura 25 - Variação das concentrações de PN, PS e relação PN/PS durante as três estratégias operacionais.



Fonte: A autora, 2020.

Park e Dolan (2016) confirmam que no sistema granular algal-bacteriano, há alta produção de EPS para a formação do agregado. Esses autores ainda atribuem que devido à capacidade de locomoção das cianobactérias filamentosas, frações significantes de EPS são produzidas por estas. Polissacarídeos extracelulares são produzidos por cianobactérias para motilidade e proteção, e contribuir para o desenvolvimento de bioagregados estáveis (Milferstedt *et al.*, 2018). O EPS total, fração de proteína e polissacarídeos, e a relação PN/PS obtida por este estudo estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Média das concentrações de EPS total e frações de PS e PN para R1 e R2.

	R1	R2
EPS (mg/gSSV)	74,7±9,7	63,3±15,4
Polissacarídeos (mg/gSSV)	23,4±5,0	19,6±5,8
Proteínas (mg/gSSV)	51,2±4,8	43,7±10,0
PN/PS	2,2±0,4	2,3±0,4

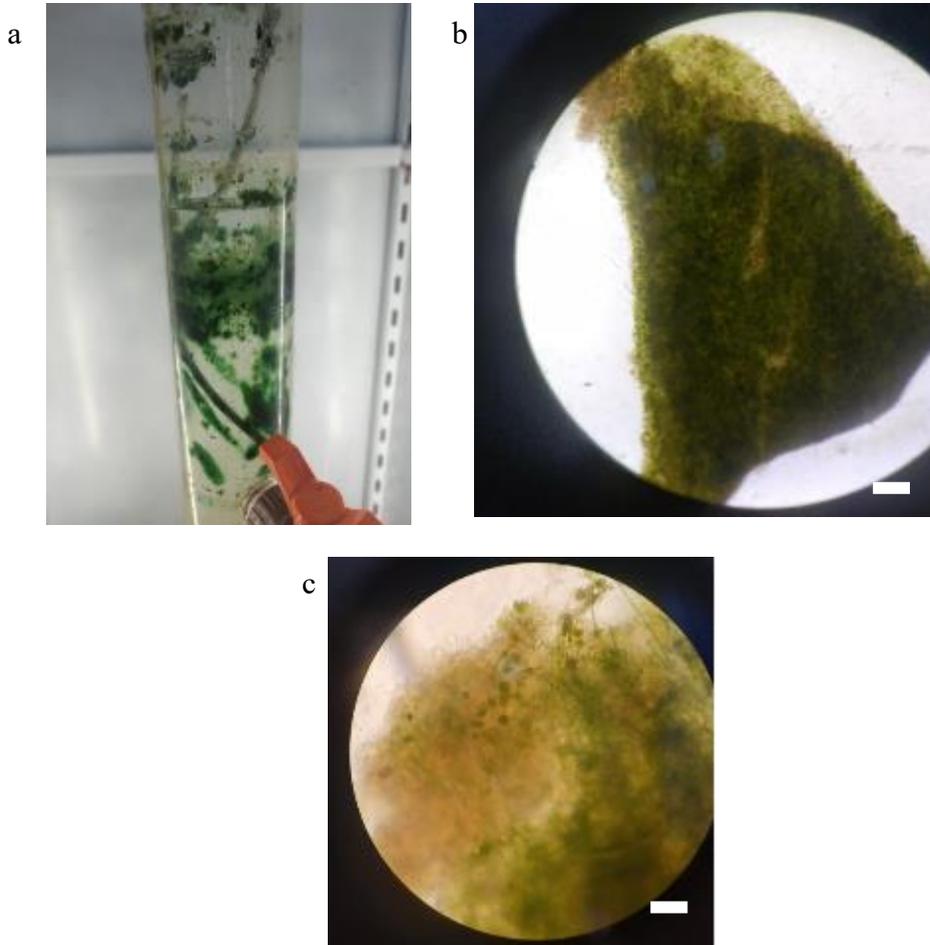
Fonte: A autora, 2020.

4.3.7 Desenvolvimento de biofilme na parede do reator

No tópico 4.3.7 será discutido a aderência da biomassa algal na parede dos FRBS. O desenvolvimento do biofilme na parede dos reatores tornou-se mais intenso após o desenvolvimento das cianobactérias, cerca do 120° dia de operação. Neste estudo, a ocorrência de biofilme foi considerada como fator negativo. Uma vez que reduziu a penetração da luz no reator

e criou uma concentração desigual de biomassa dentro do reator. Através de observações microscópicas, o biofilme era formado por uma mistura de microalgas, como *Chlorella sp.*, *Stigeoclenium sp.* e *Oscillatoria sp.* (Figura 26c). A razão pela qual as algas tendem a aderir à parede do reator pode estar associado a melhor captação de luz.

Figura 26 - Biofilme formado por microalgas (a) aderidas na parede do R2 no dia 130 (b) Biofilme com ampliação de 100x (Barra de 0,2 mm) (c) Biofilme com ampliação de 400x (Barra de 0,2 μ m).



Fonte: A autora, 2020.

Visto isso, há algumas medidas possíveis que podem ser adotadas para reduzir a tendência de aderência da biomassa algal na parede do reator, como:

- Aplicar maior velocidade ascensional do ar para intensificar a tensão de cisalhamento;
- Utilizar outra configuração de fotobioreator, como um fotobioreator plano.

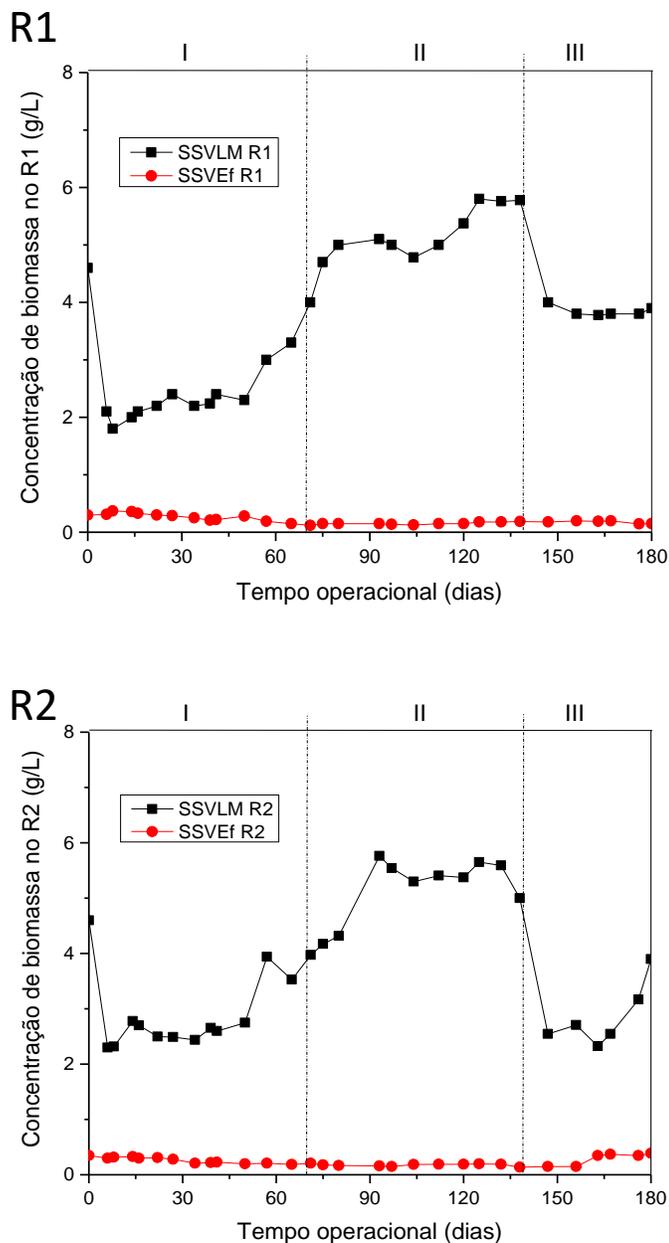
4.3.8 Comportamento do crescimento da biomassa

No tópico 4.3.8 será discutido a variação da concentração de biomassa nos FRBS, ao longo do experimento. Ambos FRBS foram inoculados com lodos ativados, com SSV inicial de 4,6 g/L. Como mostra na Figura 27, durante as primeiras bateladas, foi observado um decaimento para 1,69 e 1,98 g/L para R1 e R2, respectivamente, devido ao curto tempo de sedimentação adotado (3 min). Além disso, do início do experimento até o dia 20, foi observado que o efluente tratado continha concentração média de SSV= 0,30±0,05 g/L para R1 e 0,31±0,02 g/L para R2, porém após 50 dias de operação, ambos reatores apresentaram efluente com alta qualidade, com relação à concentração de sólidos descartados, com concentrações médias de SSV = 0,17±0,05 e 0,18±0,01 g/L para R1 e R2, respectivamente. Ademais, com o aumento da relação C:N de 4:1 para 8:1, o carbono disponível na FII foi sendo rapidamente consumido, resultando na produção maior de biomassa em ambos reatores. Assim, a concentração de SSV no R1 foi de 4,24±1,4 g/L, com SSV_{máximo}= 6,5 g/L no dia 125, ao passo que em R2 foi de 4,2±1,5 g/L, com SSV_{máximo}= 6,28 g/L no 122º dia de operação.

Durante a FIII, as concentrações de biomassa de ambos reatores sofreram diminuição. A concentração de SSV no R1 e R2 após 170 dias de operação era de 3,8 e 2,7 g/L, respectivamente. Além disso, no dia 140º, o R1 apresentou alta descarga de sólidos (SSV_{ef} = 0,69 g/L), porém após uma semana de operação, o efluente retornou as condições anteriores, apresentando baixas concentrações de sólidos (SSV_{ef} = 0,18 g/L), enquanto que R2 apresentou altas concentrações de sólidos descartadas no efluente a partir do dia 163 até o final do experimento.

Um encaixe linear foi realizado para R2 e R1 entre os dias 1 e 140 de operação, e o declive indicou a taxa de crescimento de biomassa de 0,183 gSSV/L.dia para R1 e 0,178 gSSV/L.dia para R2, indicando que o modo de alimentação não influenciou na taxa de crescimento da biomassa ao longo do experimento. Yuan *et al.* (2019) reportaram taxa de crescimento de biomassa bem maior que obtido neste estudo (0,288 gSSV/L.dia), ao operarem um RBS com glicose e carga orgânica de 3,6kg.DQO/m³.dia, confirmando que a carga orgânica aplicada influencia no crescimento da biomassa dos sistemas.

Figura 27 - Comportamento das concentrações de biomassa nos FRBS e no efluente durante as três estratégias operacionais.



Fonte: A autora, 2020.

Os resultados revelaram que o crescimento da concentração de biomassa nos reatores seguiram a mesma tendência durante a FI, em que R1 contava com $SSV=2,40\pm 0,3$ g/L e R2 $SSV=2,47\pm 0,8$ g/L. Isso é significativamente maior do que o sistema de tratamento operando somente com microalgas, que é na ordem de 0,2-0,6 g/L (Christenson e Sims, 2011). Sugere-se assim, que a

granulação de microalgas pode manter alta concentração de biomassa no reator. Ademais, os resultados constataram que o crescimento da biomassa no sistema está relacionado com a disponibilidade dos compostos orgânicos no afluente.

Apesar do aumento significativo da concentração de biomassa dos FRBS na FII, os valores obtidos neste estudos são menores que os reportadas na literatura, que, normalmente, apresentam valores de SSV maiores que 7,0 g/L (Huang *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2019). Este fato pode estar relacionado com a aplicação de baixa carga orgânica neste estudo (1,0 kgDQO/m³.d). Zhao *et al.* (2018) atingiram 7,63 g/L de SSV no sistema com elevada relação C:N (8:1), ao passo que a concentração de SSV do reator com relação C:N de 1:1, declinou para 3,21 g/L. Yuan *et al.* (2019) alcançaram 22,4 g/L de SSV em FRBS tratando esgoto doméstico de elevada carga orgânica (3,6 kgDQO/m³.d), afirmando que a carga orgânica afeta fortemente a concentração da biomassa do sistema. Além disso, Zhang *et al.* (2018) atribuem o aumento da concentração de biomassa devido à reação da fase escura do ciclo de Calvin, em que as microalgas presentes, por meio do processo de fotossíntese, assimilam o CO₂ liberado na respiração pelas bactérias heterotróficas e deposita-o como reserva sob a forma de EPS (Figura 25).

Apesar da estabilidade na concentração de SSV obtida na FII, foi observado decaimento na concentração de biomassa em ambos reatores durante a FIII. A diminuição de SSV no R1 deu-se pelo aumento da troca volumétrica, porém após 1 semana de operação, a biomassa foi capaz de se adaptar a nova condição, resultando num $SSV_{\text{médio}} = 3,88 \pm 0,16$ g/L. A diminuição na concentração de biomassa no R2 para 2,2 g/L pode ter sido influenciada pela desintegração fotogranular, promovendo a quebra dos agregados em fragmentos menores ($\phi < 0,2$ mm), que foram removidos no descarte do efluente, resultando em uma concentração de sólidos no efluente de $SSV_{\text{médio}} = 0,6 \pm 0,2$ g/L.

Com o processo de granulação, a biomassa descartada era composta por poucos flocos de menores tamanhos e menos densos, resultando em um efluente de melhor qualidade em termos de sólidos, respectivamente, confirmando que o consórcio granular alga-bactéria apresenta excelente performance na separação efluente-biomassa.

No dia 140, o R1 apresentou alta descarga de sólidos ($SSV_{\text{ef}} = 0,69$ g/L), devido ao aumento da troca volumétrica porém, após uma semana de operação, o efluente retornou as condições anteriores, apresentando baixas concentrações de sólidos ($SSV_{\text{ef}} = 0,18$ g/L). Este fato pode estar atribuído devido à seleção de biomassa de maior peso e de melhor sedimentabilidade. Por outro

lado, com a diminuição da tensão de cisalhamento e a desintegração devido à proliferação de microrganismos filamentosas, o efluente tratado do R2 apresentava baixa qualidade em termos de sólidos, até o final do experimento, com $SSV_{ef} = 0,38$ g/L. Su, Mennerich e Urban, (2012) avaliaram a concentração da biomassa do efluente tratado, e reportaram uma redução de 1,64 para 0,05 g/L no SST do sistema com consórcio alga-bactéria, enquanto a biomassa apenas com microalgas apresentava SST superior a 0,8 g/L.

4.4 PERFORMANCE DOS REATORES

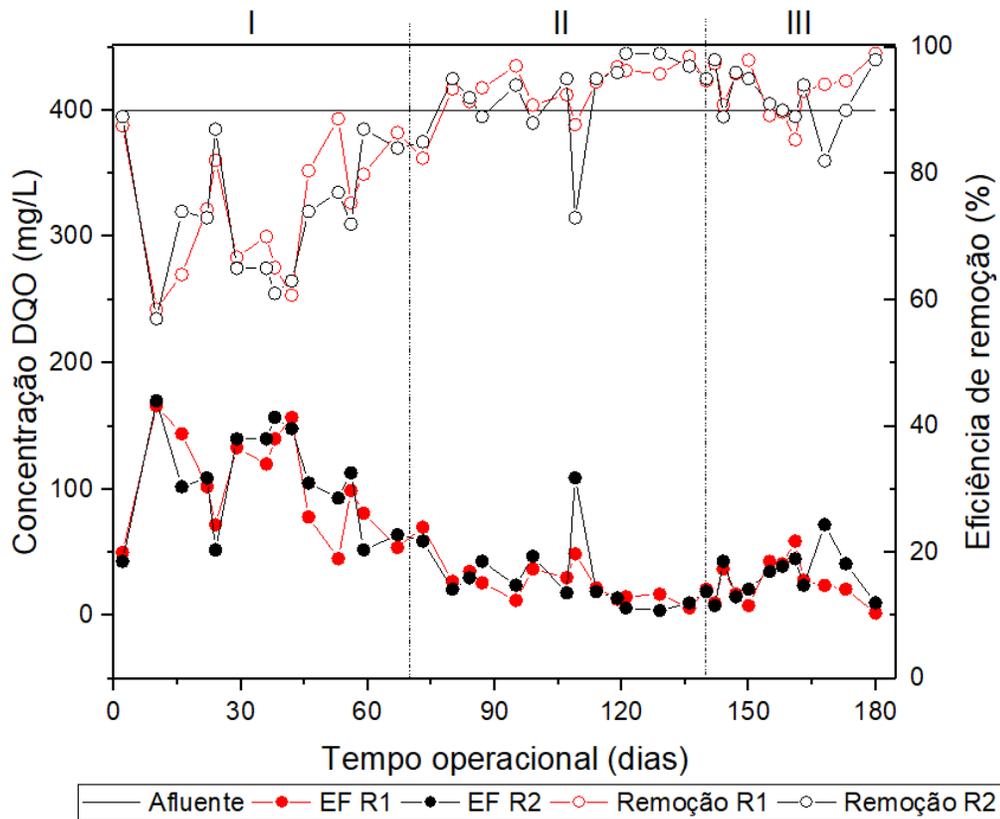
Neste tópico serão discutidas a performance dos FRBS, em termos de remoção de DQO, nitrogênio e fósforo, ao longo do experimento, abordando as três condições operacionais.

4.4.1 Remoção da Matéria orgânica carbonácea

Os reatores operaram tratando esgoto sintético com DQO de 400mg/L durante todo o experimento. As concentrações de DQO afluente, efluente e a remoção da matéria orgânica estão representadas na Figura 28.

Foi observado que as eficiências de remoção de DQO para ambos FRBS foram baixas e instáveis durante a FI, com eficiência média de $68 \pm 7\%$. Na FII as remoções de DQO aumentaram significativamente para $94 \pm 3\%$, tornando estáveis durante todo o experimento (Figura 28). A maior disponibilidade de carbono impactou, sobretudo, na eficiência de remoção de nitrogênio (Figura 29), aumentando a eficiência de desnitrificação do sistema. Assim, tem-se que o aumento da relação C:N de 4:1 para 8:1 influenciou na remoção da matéria orgânica carbonácea, produzindo efluente com $DQO_{média} = 25 \pm 15$ mg/L. Durante a FIII, as eficiências de remoções de DQO permaneceram superiores a 90% em ambos reatores, constatando que o sistema é capaz de apresentar excelente performance sob diferentes cargas orgânicas aplicadas. Além disto, a desintegração granular no R2 não afetou na remoção de DQO no sistema.

Figura 28 - Variações nas concentrações de DQO no efluente, afluente e eficiência de remoção durante as três condições operacionais.



Fonte A autora, 2020.

Estudos indicam que a relação ótima de C:N para sistemas com lodo granular é 7-8, em que são viabilizadas eficiências de remoção de DQO acima de 90%, uma vez que o carbono disponível no meio é facilmente utilizado na etapa de desnitrificação (Tang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). Estudos tratando esgoto doméstico em RBS somente com grânulos aeróbios também apresentaram excelente performance na remoção da matéria orgânica carbonácea, com eficiência de remoção de carbono entre 90 e 98% (Pronk *et al.*, 2015; Wang, X. *et al.*, 2019; Pishgar *et al.*, 2019). Ji *et al.* (2018) reportaram que o inóculo de maior proporção de bactérias heterotróficas favoreceu a remoção do material carbonácea. Por outro lado, Su, Mennerich e Urban, (2012) tratando esgoto doméstico unicamente com microalgas, obtiveram eficiência de remoção média de DQO na ordem de $66,0 \pm 6\%$, confirmando que as bactérias heterotróficas têm papel fundamental na degradação da matéria orgânica.

4.4.2 Remoção do Material Nitrogenado

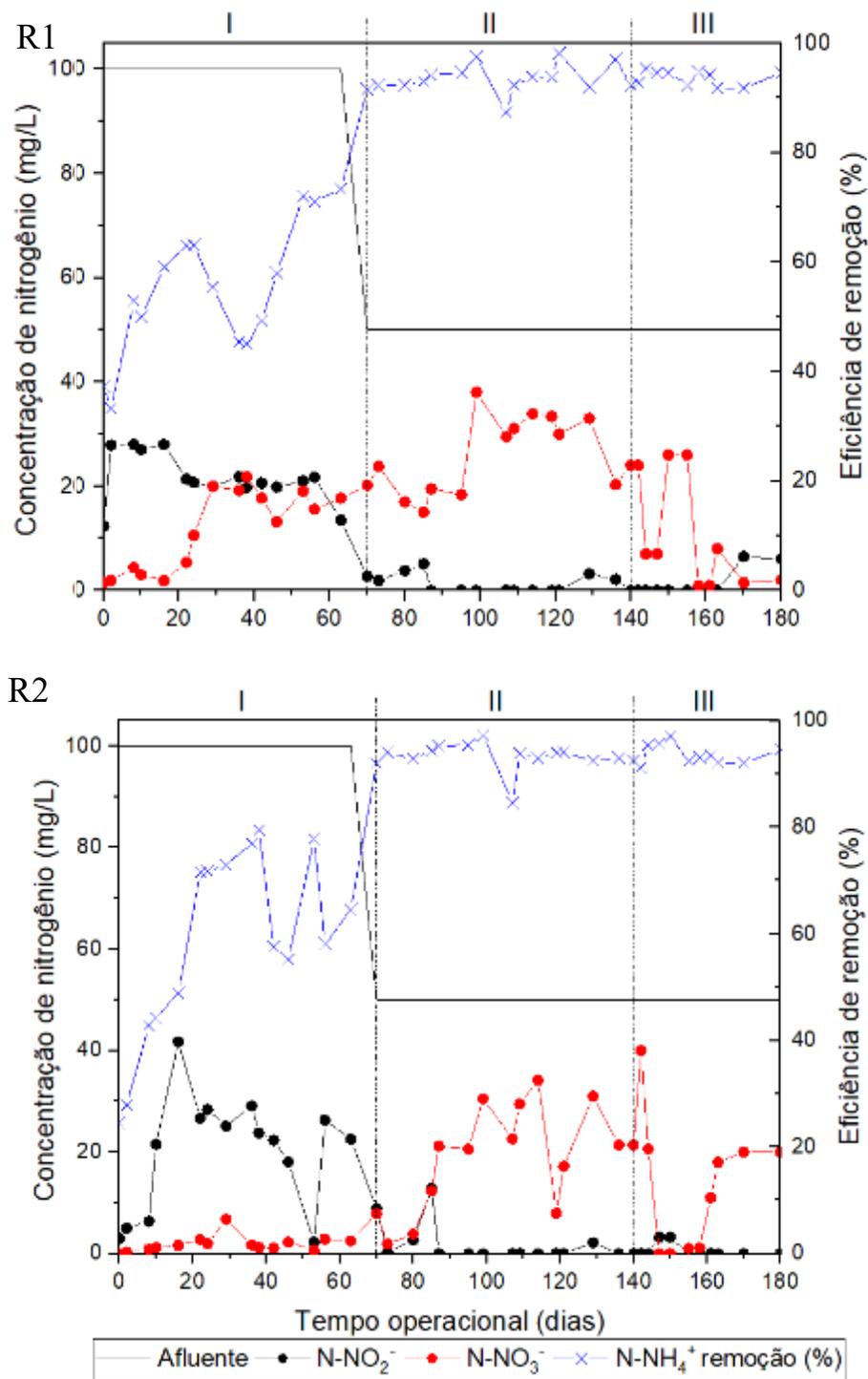
Os reatores operaram tratando esgoto sintético com N-NH_4^+ de 100 mg/L na FI e 50 mg/L na FII e FIII. As concentrações de N-NH_4^+ afluente, efluente, eficiência de remoção da amônia e as concentrações de N-NO_2^- e N-NO_3^- estão representadas na Figura 29.

Durante a FI, as remoções de N-NH_4^+ foram instáveis com $61\pm 15\%$, 61 ± 15 , para R1 e R2 respectivamente. No R1, observa-se que a oxidação da amônia aconteceu majoritariamente a nitrito (21 ± 8 mg/L) e a nitrato (12 ± 9 mg/L). Diferentemente do que ocorreu no reator com alimentação anaeróbia/anóxica de 40 min (R1), a oxidação da amônia no R2 (fase de alimentação anaeróbia/anóxica de 60 min), deu-se majoritariamente a nitrito (20.1 ± 8 mg/L).

Por outro lado, com o aumento da relação C:N de 4:1 para 8:1, as eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal em R1 e R2 aumentaram ligeiramente atingindo $93\pm 2\%$ no R1 e $93\pm 3\%$ no R2. Indicando que ambos os tempos de aerobiose foram suficientes nos dois reatores para oxidar a amônia. Em adição, a nitrificação foi constatada em ambos reatores, que acumularam nitrato no sistema. Apesar disso, R2 apresentou menores concentrações de N-NO_3^- ao longo da Fase II.

Durante a FIII, a remoção de N-NH_4^+ permaneceu alta em R1 e menores concentrações de nitrato foram detectados ($14,4\pm 10$ mg/L). Por outro lado, com a diminuição da concentração de oxigênio no R2, o sistema apresentou baixas concentrações de nitrito e nitrato, indicando sinais de NSD, do dia 140 ao dia 158. Porém, devido aos sinais de desintegração granular, o sistema retornou a acumular nitrato ($15,0\pm 15,0$ mg/L) até o final do experimento. Entretanto, a eficiência de remoção de N-NH_4^+ permaneceu superior 95%. Além disso, ambos reatores apresentaram baixas concentrações de nitrito ($1,3\pm 1,8$ mg/L para R1 e $2,0\pm 4,0$ mg/L para R2) durante a FIII.

Figura 29 Variações nas concentrações de N-NO_2^- e N-NO_3^- no efluente e N-NH_4^+ afluente e eficiência de remoção de N-NH_4^+ durante as três estratégias operacionais.



Fonte: A autora, 2020.

Diante dos resultados, observa-se que o processo de remoção de nitrogênio foi diretamente afetado pelo modo de operação e pela relação C:N. Durante a FI, a alimentação anaeróbia de 60 min favoreceu a nitrificação parcial e, possivelmente, o processo de desnitrificação via nitrito. Enquanto que foi percebido acúmulo de nitrito e nitrato no R1, indicando que a presença de microalga inibiu o processo de nitratação, sob relação C:N de 4:1.

Além disso, as análises estatísticas confirmaram a diferença significativa entre os reatores ($t(3,01369) > t_{crítico}(1,83311)$, e $p < 0,05$). Cai *et al.* (2019) reportaram que menor disponibilidade de OD reflete numa menor concentração de $N-NO_3^-$ no efluente, corroborando com os resultados observados no R2 durante a FI. Assim, tem-se que o oxigênio dissolvido é um parâmetro que influencia no processo de desnitrificação nos grânulos bacterianos e nos fotogrânulos.

Com o aumento da relação C:N de 4:1 para 8:1, as eficiências de remoção de $N-NH_4^+$ aumentaram ligeiramente, devido a maior disponibilidade de carbono no processo de remoção de nitrogênio, mais especificamente, na etapa de desnitrificação, corroborando com Ahmad *et al.* (2017), que relataram que ao utilizar relação C:N maior que 4:1, foi possível remover mais de 95% de $N-NH_4^+$. Em adição, Huang *et al.* (2015) operaram FRBS com relação C:N de 6:1, alcançaram eficiência de remoção de $N-NH_4^+$ superior a 90%, porém também foi observado o acúmulo de nitrito e nitrato. Portanto, a estratégia de adotar diferentes relações de C:N, repercute na aplicação dessa tecnologia em diferentes regiões, com diferentes características no esgoto sanitário. Além disso, de acordo com o teste estatístico, as médias de remoção de $N-NH_4^+$ não diferiram entre os FRBS durante a FII ($t(0,760469) < t_{crítico}(2,26215)$, e $p > 0,05$). Apesar disso, foram observadas menores concentrações de nitrato no R2, sugerindo que a duração de fase anaeróbia de 60min favoreceu, possivelmente, no processo de desnitrificação do sistema. A análise estatística confirma a diferença significativa entre os FRBS no acúmulo de nitrato ($t(2,0989) < t_{crítico}(1,83311)$, e $p < 0,05$).

Apesar do aumento na eficiência de remoção de $N-NH_4^+$, não foi alcançado 100% do processo de NDS, como reportado na literatura (REF, REF, REF). Esse fato pode ser explicado pela presença de microalgas na superfície e no interior do fotogrânulo (Meng *et al.*, 2019b). A produção de oxigênio nas zonas mais internas do fotogrânulo não permite a formação de microzonas anóxicas/anaeróbias, onde ocorrem os processos de desnitrificação no sistema granular.

A melhora no desempenho de ambos reatores na Fase II pode ser explicado pela maior disponibilidade de carbono no processo de remoção de nitrogênio, mais especificamente, na etapa de desnitrificação, corroborando com Ahmad *et al.* (2017), que relataram que ao utilizar relação C:N maior que 4:1, foi possível remover mais de 95% de N-NH₄⁺.

Durante a FIII, os resultados revelaram que o aumento da carga orgânica no sistema favorece maior eficiência nas etapas da remoção de nitrogênio, uma vez que, o aumento da carga orgânica de 1,0 para 1,7 kgDQO/m³.dia no R1, apresentou menores concentrações de nitrato, mantendo a alta eficiência de remoção de N-NH₄⁺. A análise estatística confirma o que fora constatado anteriormente ($t(2,0892) > t_{\text{crítico}}(1,83311)$, e $p < 0,05$).

Para mais, tem-se que a diminuição da concentração de OD no R2, promoveu o processo de NDS, porém devido aos sinais de desintegração granular, o reator retornou aos resultados anteriores, ou seja, com acúmulo de nitrato. O teste estatístico indicou que não foi observada diferença significativa na concentração de nitrato com a aplicação de menor taxa de aeração, a partir do dia 158 até o final do experimento ($t(0,47168) < t_{\text{crítico}}(2,26215)$, e $p > 0,05$).

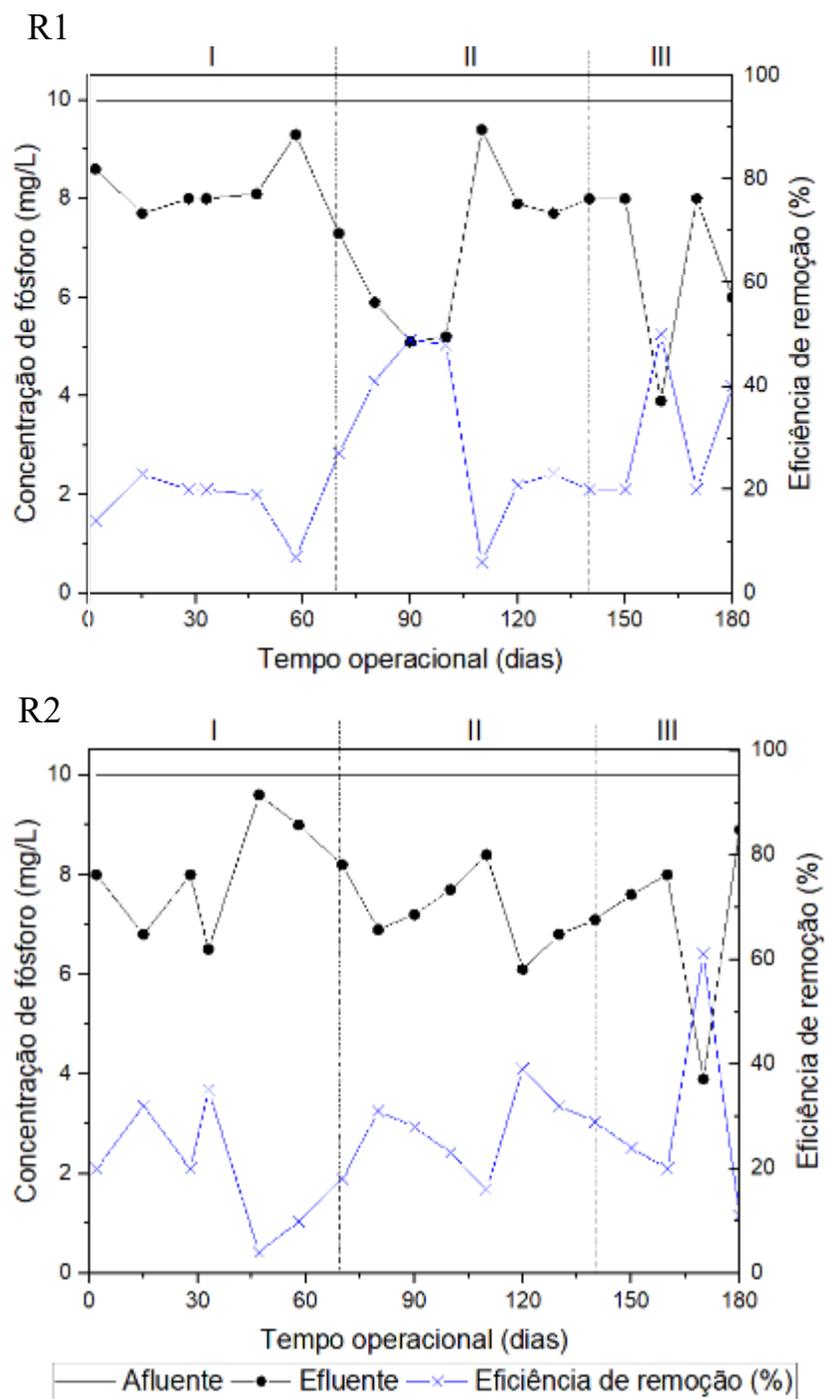
Além disso, o acúmulo de nitrito e nitrato pode estar relacionada com alta relação da concentração de biomassa de alga:lodo, na ordem de 1:5. Leong *et al.* (2018) observaram que a relação de concentração de biomassa de alga:lodo tem influência direta no perfil de remoção de nitrogênio. Reatores inoculados com relação de SST alga:lodo de 1:1 e 1:2, apresentaram altas eficiências de remoção de amônia, porém não foi observado acúmulo de nitrito ou nitrato, diferentemente dos reatores inoculados com relação de SST alga:lodo de 1:5. O mesmo foi reportado por Su, Mennerich e Urban, (2012) ao inocularem o sistema com uma relação de SST de 1:5 (alga:lodo). Indicando que o principal processo de remoção de nitrogênio com inóculo composto majoritariamente por lodos ativados, é via nitrificação/desnitrificação, e a assimilação das microalgas não é significativa.

4.4.3 Remoção de Fósforo Total

No tópico 4.4.3 será discutida a remoção de fósforo total ao longo do experimento, abordando as três estratégias operacionais. A concentração afluente, efluente e eficiências de remoção de fósforo estão exibidas na Figura 30. O afluente continha concentração de 10,0 mg/L de fósforo total. Os resultados constataram que, ao longo do experimento foram constatadas baixas remoções

de fósforo, produzindo efluente com concentração de fósforo bem instável. A remoção média de PT para R1 e R2 foi de $24,7 \pm 13,2\%$ em $24,7 \pm 12,2\%$, respectivamente.

Figura 30 - Variações na concentração de PT no efluente, afluente e eficiência de remoção durante as três estratégias operacionais.



Fonte: A autora, 2020.

A baixa performance dos FRBS na remoção de Fósforo total pode estar relacionada à alguns fatores:

- A formação de fotogrânulos de pequena dimensão (tamanho médio de 0,6 – 1,0 mm), dificultando o desenvolvimento de microambientes anaeróbios/anóxicos nos fotogrânulos. Liu e Tay (2004) sugerem que grânulos de menores dimensões tornem-se mais eficientes nos processos biológicos aeróbios, uma vez que a microzona anaeróbia não está bem definida.

- O curto período de fase anaeróbia (40 - 60 min). Estudos indicam que para a remoção eficiente de fósforo, os ciclos devem compreender fase anaeróbia de 2 a 3 hrs, não afetando o metabolismo de liberação e sequestro do fósforo na fase aeróbia (He *et al.*, 2018). Dantas (2018) operou dois RBS com predominância de biomassa granular tratando esgoto doméstico real de baixa carga orgânica. A autora verificou remoção de fósforo total de 20,36%, para o reator com fase anaeróbia de 60 min e 47,97% para o reator com 90 min de fase anaeróbia/anóxica. Os resultados indicam que o tempo anaeróbio de 60 min não foi suficiente para os PAO armazenarem PHA, refletindo em menores taxas de absorção de fosfato pelos PAO durante a fase aeróbia.

- A utilização de glicose como fonte de carbono. Rollemberg *et al.* (2019) reportaram que no RBS alimentado com glicose houve baixa remoção de fósforo ($\approx 20\%$), possivelmente devido à ausência de conversão anaeróbia do substrato e armazenamento de polímeros, como os PHA. Além disso, pode ter desenvolvido GAO, que atuam na fase anaeróbia, porém não removem fósforo.

- A possível remoção de nitrito e nitrato na fase anaeróbia/anóxica promove a competição entre os PAO e as desnitrificantes. Wang *et al.* 2019 reportaram que as bactérias desnitrificantes e os PAO competem por matéria orgânica facilmente degradável.

5 CONCLUSÕES

Fotogrânulos aeróbios foram desenvolvidos com sucesso em FRBS de escala de bancada tratando esgoto doméstico sintético de baixa carga orgânica, a partir do inóculo de lodos ativados com *Chlorella vulgaris*, sob condição de clima tropical ($29\pm 2^\circ\text{C}$).

Ambos reatores desenvolveram diversas espécies de microalgas ao longo do experimento: *Chlorella sp.*, *Navícula sp.*, *Cianobactérias (Oscillatoria sp.)* e *Stigeoclinium sp.* que desempenharam papel fundamental na estabilidade granular dos fotogrânulos aeróbios.

A aplicação de diferentes condições operacionais auxiliou a compreender melhor a formação do fotogrânulo e sua performance na remoção de nutrientes e matéria orgânica. A duração da fase de alimentação anaeróbia/anóxica de 60 min favoreceu o processo de granulação, além de proporcionar melhor desempenho no processo de desnitrificação.

O aumento da relação C:N de 4:1 para 8:1, impactou no desempenho do sistema, aumentando ligeiramente a remoção de nitrogênio amoniacal (>93%) e DQO (>95%), embora a remoção de fósforo tenha permanecido baixa.

Foi verificado que a aplicação da maior carga orgânica confere maior eficiência de remoção de nitrogênio, favorecendo o processo de desnitrificação. Por outro lado, a operação de FRBS sob baixas concentrações de OD não apresentou melhoria no processo de desnitrificação. Por outro lado, a aplicação da menor velocidade ascensional provocou o surgimento de microrganismos filamentosos, promovendo sinais de desintegração no sistema.

Em síntese, os FRBS apresentaram resultados promissores no tratamento de esgoto doméstico de baixa carga orgânica, tornando possível a remoção simultânea de nutrientes e matéria orgânica.

6 RECOMENDAÇÕES

Ao analisar os resultados obtidos, algumas recomendações serão feitas para o melhor entendimento do processo da fotogranulação aeróbia:

- Testar outras fontes de carbono como composição do afluente, afim de desenvolver grânulos maiores e mais robustos;
- Realizar análise de toxicidade na biomassa do reator com predominância de cianobactérias;
- Adicionar pulsos de ar durante a alimentação anaeróbia/anóxica para promover maior contato da biomassa com afluente;
- Realizar teste de assimilação de nitrogênio pelas algas adicionando ATU para inibir a ação das bactérias nitrificantes;
- Testar ciclos de 6hrs com introdução de fase anóxica ao final da fase anaeróbia para impulsionar o desenvolvimento dos PAO e melhorar a eficiência do sistema;
- Realizar análises de PCR ou FISH para verificar a abundância relativa dos microrganismos no consórcio algal-bacteriano.

REFERÊNCIAS

- ABINANDAN, S.; SHANTHAKUMAR, S. Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 123–132, 2015.
- ABOUHEND, A. S. *et al.* The Oxygenic Photogranule Process for Aeration-Free Wastewater Treatment. **Environmental Science and Technology**. 2018.
- AHMAD, J. S. M. *et al.* Stability of algal-bacterial granules in continuous-flow reactors to treat varying strength domestic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 244, n. June, p. 225–233, 2017.
- ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D. *et al.* Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. **Algal Research**, 2017.
- ALVES, O. I. M. **Aspectos microbiológicos do tratamento de esgotos sanitários em reatores em batelada sequencial com lodo granular**. Dissertação. 95p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
- APELDOORN, M. E. VAN *et al.* Review Toxins of cyanobacteria. p. 7–60, 2007.
- APHA, AWWA, and WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 22th ed. Baltimore: Port City Press, 2012.
- ARAUJO, J. P. M. **Condição de partida para a granulação aeróbia em reator em bateladas sequenciais tratando esgoto doméstico diluído**. Dissertação. 77p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- ARCILA, J. S.; BUITRÓN, G. Microalgae – bacteria aggregates : effect of the hydraulic retention time on the municipal wastewater treatment , biomass settleability and methane potential. **Algal research**, n. February, 2016.
- ARCILA, J. S.; BUITRÓN, G.. Influence of solar irradiance levels on the formation of microalgae-bacteria aggregates for municipal wastewater treatment. **Algal Research**, v. 27, n. March, p. 190–197, 2017.
- ARELLANO-BADILLO, M., *et al.* Effect of the organic matter to ammonia ratio on aerobic granulation during 4-chlorophenol degradation in a sequencing batch reactor, **Clean: Soil, Air, Water** 20, p: 428–433, 2014.
- ARIAS, D.M., *et al.* Cultivation and selection of cyanobacteria in a closed photobioreactor used for secondary effluent and digestate treatment. **Science of total environment**. p: 157-167, 2017.
- ARIAS, D.M., *et al.* Selection of cyanobacteria over green algae in a photo-sequencing batch bioreactor fed with wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 485–495, 2019.

ATTA, M. *et al.* Intensity of blue LED light : A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 373–378, 2013.

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

BRANCO, S.M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. São Paulo: Cetesb, 1978. 620 p.

BRASIL, **Resolução CONAMA N°430, de 13/05/2011 - dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores**. 2011. Disponível em:< <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>.

BUTLER C, EL-MOSELHY KM, PARK C. The oxygenic photogranule (OPG) for aeration-free and energy-recovery wastewater treatment process. In: Proceedings of the water environment federation. **WEFTEC**, 2016.

CAI, W. *et al.* Algae granulation for nutrients uptake and algae harvesting during wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 214, p. 55–59, 2019.

CAMERON, J. C. *et al.* Biogenesis of a Bacterial Organelle : The Carboxysome Assembly Pathway. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1131–1140, 2013.

CARMICHAEL, W. W.; CARMICHAEL, W. W. Human and Ecological Risk Assessment : An International Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria : “ The CyanoHABs ” Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria : “ The CyanoHABs ”. v. 7039, 2012.

ÇELEKLI, H. A. *et al.*, Biochemical responses of filamentous algae in different aquatic ecosystems in South East Turkey and associated water quality parameters, **Ecotoxicol. Environmental Safety**. 133 p: 403–412, 2016.

CHANDRA, D. *et al.* Field performance of bacterial inoculants to alleviate water stress effects in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, p. 261–281, 2019.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 686–702, 2011.

CORSINO, S. F. *et al.* Study of aerobic granular sludge stability in a continuous-flow membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 1055–1059, 2016.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P. *et al.* Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. **Algal Research**, v. 24, p. 438–449, 2017.

- DANTAS, B.K.S.F. **Formação De Lodo Granular Aeróbio Em Reatores Em Bateladas Sequenciais Para O Tratamento De Esgoto Doméstico De Baixa Carga Visando À Remoção De Nutrientes**. Dissertação. 80 p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- DE KREUK, *et al.*, Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. **Biotechnology & Bioengineering**. 90, p:761-769, 2005.
- DE KREUK, *et al.*, Formation of Aerobic Granules with Domestic Sewage. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, n. 6, p. 694–697, 2006.
- DU, B. *et al.* Impacts of long-term exposure to tetracycline and sulfamethoxazole on the sludge granules in an anoxic-aerobic wastewater treatment system. **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 67–77, 2019.
- DUBOIS, M., *et al.*, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, **Chemosphere**. 28, p:350–356, 1956.
- FRANCA, R. D. G. *et al.* Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 228–246, 2018.
- GAO, D. *et al.* Aerobic granular sludge: Characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 137–152, 2011.
- GARCÍA, D. *et al.* Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 120–126, 2018.
- GARCÍA, J. *et al.* Long term diurnal variations in contaminant removal in high rate ponds treating urban wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1709–1715, 2006.
- GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 24, p. 403–415, 2017.
- HE, Q. *et al.* Natural sunlight induced rapid formation of water-born algal-bacterial granules in an aerobic bacterial granular photo-sequencing batch reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 359, n. June, p. 222–230, 2018.
- HOH, D.; WATSON, S.; KAN, E. Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 466–473, 2016.
- JI, X. *et al.* The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 44–50, 2018.
- JIA E QIUYAN YUAN. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia, Huijun, **Cogent Environmental Science**, 2016.

KAMPSCHREUR, M. J. *et al.* Nitrous oxide emission during wastewater treatment. **Water Research**, v. 43, n. 17, p. 4093–4103, 2009.

KANG, D. *et al.* Enhancement of wastewater treatment efficiency through modulation of aeration and blue light on wastewater-borne algal-bacterial consortia. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 135, n. February, p. 9–18, 2018.

KERFELD, C. A. *et al.* Bacterial microcompartments. **Nature**, 2018.

KESAANO, M.; SIMS, R. C. Algal biofilm based technology for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 5, p. 231–240, 2014.

KWON, H. *et al.* Harvesting of Microalgae Using Flocculation Combined with Dissolved Air Flotation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 149, p. 143–149, 2014.

LEE, C. S. *et al.* Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater. **Bioresource Technology** v. 68, 2015.

LEE, C. S. *et al.* Two-phase photoperiodic cultivation of algal – bacterial consortia for high biomass production and efficient nutrient removal from municipal wastewater. **Bioresource Technology** v. 200, p. 867–875, 2016.

LEONG, W. *et al.* Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Co-cultivation of activated sludge and microalgae for the simultaneous enhancements of nitrogen-rich wastewater bioremediation and lipid production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 87, p. 216–224, 2018.

LI, B. *et al.* Effect of TiO₂ nanoparticles on aerobic granulation of algal-bacterial symbiosis system and nutrients removal from synthetic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 214–220, 2015.

LI, X. *et al.* Responses of microalgae *Coelastrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 251, n. October 2017, p. 274–279, 2018.

LI, Y. *et al.* Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5138–5144, 2011.

LIU, J. *et al.* Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1127–1137, 2017.

LIU, L. *et al.* Development of algae-bacteria granular consortia in photo-sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 64–71, 2017.

- LIU, L. *et al.* Characteristics and performance of aerobic algae-bacteria granular consortia in a photo-sequencing batch reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 349, n. January, p. 135–142, 2018.
- LIU, Y.; TAY, J. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 533–563, 2004.
- MAKAREVICIENE, P. D. V. *et al.* Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 57, n. 3, p. 21–27, 2011.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.
- MENG, F. *et al.* Bioresource Technology Effects of light intensity on oxygen distribution , lipid production and biological community of algal-bacterial granules in photo-sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 272, n. October 2018, p. 473–481, 2019a.
- METCALF e EDDY. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5. ed., Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 1980 p., 2016.
- MILFERSTEDT, K. *et al.*, Biogranules applied in environmental engineering. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2017.
- MILFERSTEDT, K. *et al.*, The importance of filamentous cyanobacteria in the development of oxygenic hotogranules. **International Journal of Hydrogen Energy** p. 1–25, 2018.
- MISHIMA, K.; NAKAMURA, M. Self-Immobilization of Aerobic Activated Sludge-a Pilot Study of the Aerobic Upflow Municipal Sewage Treatment. **Water Science Technology**, v. 23 (4-6), p. 981–990, 1991.
- MOSQUERA-CORRAL, A. *et al.* Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. **Water Research** v. 39, p. 2676–2686, 2005.
- MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2799–2815, 2006.
- NANCHARAI AH, Y. V.; KIRAN KUMAR REDDY, G. Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 1128–1143, 2018.
- PARK, C., DOLAN, S. Algal-sludge granule for wastewater treatment and bioenergy feedstock generation. **United States Patent**. 2016
- PICOT, B. *et al.* Nutrient removal by high rate pond system in a Mediterranean climate (France). **Water Science and Technology**, v. 23, n. 7–9, p. 1535–1541, 1991.

- PISHGAR, R. *et al.* Influence of operation mode and wastewater strength on aerobic granulation at pilot scale : Startup period , granular sludge characteristics, and effluent quality. **Water Research**. v. 160, 2019.
- POULIOT, Y. Culture of Cyanobacteria for Tertiary Wastewater Treatment and Biomass Production. **Biological wastes**. v. 29, p. 81–91, 1989.
- 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.
- RAZZAK, S. A. *et al.* Integrated CO₂ capture , wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing — A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013.
- ROLLEMBERG, S. L. DE S. *et al.* Effects of carbon source on the formation, stability, bioactivity and biodiversity of the aerobic granule sludge. **Bioresource Technology**, p. 195–204, 2019.
- SALES, M. A. M. P. **Lodo aeróbio granular: remoção de nutrientes de esgoto sanitário edinâmica das substâncias poliméricas extracelulares**. Dissertação. 75p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- SANTOS, M.V.A. **Filtros de pedra de fluxo horizontal como pós-tratamento de lagoa de estabilização: remoção de sólidos suspensos e cianobactérias**. Dissertação. 130p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014.
- SCHMIDT, I.; BOCK, E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. **Microbiology**. p. 106–111, 1997.
- SCHMIDT, I.; SPANNING, R. J. M. VAN; JETTEN, M. S. M. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type , and NirK- and NorB-deficient mutants Printed in Great Britain. **Microbiology**. p. 4107–4114, 2004.
- SILVA, P. M. J. Avaliação das diferentes condições operacionais na formação de grânulos aeróbios utilizando reatores em bateladas sequenciais na remoção de nitrogênio e fósforo de esgoto sanitário. **Tese**. 101 p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
- SOLIMAN, M., ELDYASTI A. Development of partial nitrification as a first step of nitrite shunt process in a Sequential Batch Reactor (SBR) using Ammonium Oxidizing Bacteria (AOB) controlled by mixing regime. **Bioresource technology**, 2016.
- SU, Y.; MENNERICH, A.; URBAN, B. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 67–73, 2012.

SUN, L. *et al.* ScienceDirect Performance and microbial community analysis of an algal-activated sludge symbiotic system : Effect of activated sludge concentration. **Journal of Environmental Sciences**, v. 76, p. 121–132, 2018.

SUTHERLAND, D. L. *et al.* Size matters – Microalgae production and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds of three different sizes. **Algal Research** v. 45, n. September 2019, 2020.

SYAFRI, J. *et al.* Algal-bacterial aerobic granule based continuous- flow reactor with effluent recirculation instead of air bubbling : Stability and energy consumption analysis. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. March, p. 100215, 2019.

TANG, C. *et al.* Enhanced nitrogen and phosphorus removal from domestic wastewater via algae-assisted sequencing batch bio film reactor. **Bioresource Technology** v. 250, n. September 2017, p. 185–190, 2018.

TANG, C. C. *et al.* Effect of aeration rate on performance and stability of algal-bacterial symbiosis system to treat domestic wastewater in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 156–164, 2016.

TAO, Q. *et al.* Enhanced biomass / biofuel production and nutrient removal in an algal bio film airlift photobioreactor. **Algal research**. v. 21, p. 9–15, 2017.

TIRON, O. *et al.* Granular activated algae for wastewater treatment. **Water Science and technology** p. 832–839, 2015.

TIRON, O. *et al.* Overcoming Microalgae Harvesting Barrier by Activated Algae Granules. **Scientific Reports** p. 1–18, 2018.

TRICOLICI, O. *et al.* Dairy wastewater treatment using an activated sludge-microalgae system at different light intensities. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 8, p. 1598–1605, 2014.

UMMALYMA, S. B. *et al.* Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 227–235, 2017.

WANG, L. *et al.* Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge , microalgae and combination systems. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 1–5, 2016.

WANG, L. *et al.* Enhanced aerobic granulation by inoculating dewatered activated sludge under short settling time in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 286, n. 1, p. 121386, 2019.

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

XIA, S. *et al.* Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE and combining FISH with flow cytometry.

Biochemical Engineering Journal, v. 49, n. 3, p. 370–378, 2010.

YANG, J. *et al.* Impacts of sludge retention time on the performance of an algal-bacterial bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 343, n. January, p. 37–43, 2018.

YE, J. *et al.* Bioresource Technology Operation optimization of a photo-sequencing batch reactor for wastewater treatment : Study on influencing factors and impact on symbiotic microbial ecology. **Bioresource Technology**, v. 252, n. December 2017, p. 7–13, 2018.

YUAN, Q. *et al.* ScienceDirect Strategies to improve aerobic granular sludge stability and nitrogen removal based on feeding mode and substrate. **Journal of Environmental Sciences**, v. 84, p. 144–154, 2019.

ZENG, R. J.; YUAN, Z. Improved understanding of the interactions and complexities of biological nitrogen and phosphorus removal processes Improved understanding of the interactions and complexities of biological nitrogen and phosphorus removal processes. **Environmental Science and biotechnology**, 2004.

ZHANG, B. *et al.* Enhancement of aerobic granulation and nutrient removal by an algal–bacterial consortium in a lab-scale photobioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, n. September 2017, p. 2373–2382, 2018a.

ZHANG, B. *et al.* The attachment potential and N-acyl-homoserine lactone-based quorum sensing in aerobic granular sludge and algal-bacterial granular sludge. **Environmental biotechnology**. 2018b

ZHAO, Z. *et al.* Response of algal-bacterial granular system to low carbon wastewater: Focus on granular stability, nutrients removal and accumulation. **Bioresource Technology**, v. 268, n. July, p. 221–229, 2018.

ANEXO A – ANÁLISE ESTATÍSTICA

N-NH₄⁺ R1 FII x R2 FII

	NH4 FI R1	NH4 FI R2
Mean	44.78	43.92
Variance	256.9217778	434.0662222
Observations	10	10
Pearson Correlation	0.732261705	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	9	
t Stat	0.191388339	
P(T<=t) one-tail	0.426234737	
t Critical one-tail	1.833112933	
P(T<=t) two-tail	0.852469475	
t Critical two-tail	2.262157163	

N-NO₃⁻ R1 FI x R2 FI; N-NO₃⁻ R1 FII x R2 FII; N-NO₃⁻ R1 FII x R1 FIII; N-NO₃⁻ R2 FII x R2 FIII.

	NO3 FI R1	NO3 FI R2		NO3 FII R1	NO3 FIII R1
Mean	9.456	1.838	Mean	23.981	14.415
Variance	82.42071556	3.667728889	Variance	81.10498778	111.1952056
Observations	10	10	Observations	10	10
Pearson Correlation	0.638167246		Pearson Correlation	-0.091326708	
Hypothesized Mean Difference	0		Hypothesized Mean Difference	0	
df	9		df	9	
t Stat	3.013699833		t Stat	2.089233984	
P(T<=t) one-tail	0.007313939		P(T<=t) one-tail	0.033132806	
t Critical one-tail	1.833112933		t Critical one-tail	1.833112933	
P(T<=t) two-tail	0.014627877		P(T<=t) two-tail	0.066265613	
t Critical two-tail	2.262157163		t Critical two-tail	2.262157163	

	NO3 FII R1	NO3 FII R2		NO3 FII R2	NO3 FIII R2
Mean	23.981	18.445	Mean	18.445	15.315
Variance	81.10498778	130.8333389	Variance	130.8333389	242.6827833
Observations	10	10	Observations	10	10
Pearson Correlation	0.6910461		Pearson Correlation	-0.187523902	
Hypothesized Mean Difference	0		Hypothesized Mean Difference	0	
df	9		df	9	
t Stat	2.09890056		t Stat	0.471680275	
P(T<=t) one-tail	0.032617283		P(T<=t) one-tail	0.324190206	
t Critical one-tail	1.833112933		t Critical one-tail	1.833112933	
P(T<=t) two-tail	0.065234565		P(T<=t) two-tail	0.648380412	
t Critical two-tail	2.262157163		t Critical two-tail	2.262157163	