

ISMARLEY LAGE HORTA MORAIS

TRATAMENTO COM LODO AERÓBIO GRANULAR DE EFLUENTE DE
FÁBRICA DE PAPEL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2011

ISMARLEY LAGE HORTA MORAIS

TRATAMENTO COM LODO AERÓBIO GRANULAR DE EFLUENTE DE
FÁBRICA DE PAPEL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2011.

Prof. Cristiano Piacsek Borges

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

Prof^a. Ann Honor Munteer
(Co-orientadora)

Prof. Antônio Galvão do Nascimento
(Co-orientador)

Prof. Cláudio Mudado Silva
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado, me dado forças para enfrentar os desafios e ter sempre me iluminado para fazer as melhores escolhas.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Engenharia Florestal e ao Laboratório de Celulose e Papel pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus pais, Ismar e Isabel, por me apoiarem em todas as minhas decisões e torcerem para que eu obtivesse sucesso em mais este trabalho. Às minhas irmãs que também me deram forças para que eu vencesse mais uma etapa.

A Natália pela companhia, por estar ao meu lado me apoiando, pelo bom humor, pelas palavras de conforto nas horas em que precisei e pelo carinho durante todo esse tempo.

Ao Theo, meu cachorro, por estar ao meu lado durante as várias horas de escrita da dissertação e que sempre disputava com o computador minha atenção.

Ao professor Cláudio Mudado Silva pela orientação e ensinamentos proporcionados desde o estágio e iniciação científica durante a graduação, e pela amizade construída ao longo destes anos de convivência.

A professora Ann Honor Mounteer pela participação também na minha formação acadêmica desde a graduação, pela amizade e pelas contribuições importantes para a realização deste trabalho.

Ao professor Antônio Galvão do Nascimento por ter me recebido em seu laboratório, por ter aturado minha falta de prática e aversão inicial às análises microbiológicas, por ter se disponibilizado a ir inúmeras vezes ao laboratório em finais de semana ou após o horário de trabalho para auxílio nas análises e discussões de resultados e/ou metodologias. Enfim, pela enorme contribuição dada ao trabalho e pela amizade construída.

Aos professores Cristiano Piacsek Borges e Sérgio Oliveira de Paula por aceitarem o convite de participarem da banca, pela atenção e as contribuições para melhoria do trabalho.

A todos do Laboratório de Meio Ambiente do LCP pela companhia e os bons momentos de convivência proporcionados, especialmente ao José Antônio e André Cardoso pelas coletas e os “galhos quebrados” durante a realização do experimento. Aos meus estagiários, Karla Brandão, Leonard Batista e Vivian Ane pelo trabalho realizado e as idas ao laboratório fora de horário. À Valéria Antônia pela companhia

durante todos estes anos, ensinamento das análises e pela manutenção da organização no laboratório. Ao Rodrigo Sarto pela amizade e companheirismo durante diversos trabalhos realizados.

Aos colegas de trabalho do laboratório de fisiologia do Bioagro por terem me recebido bem, me auxiliado nas análises e por terem tido paciência com minha falta de experiência com análises microbiológicas.

Aos amigos de Viçosa pela amizade e momentos de felicidade proporcionados.

Ao CNPq pelo suporte financeiro concedido.

A Cataguases de Papel pelo fornecimento dos efluentes utilizados nos reatores em batelada.

A COPPE-UFRJ e a PAM membranas pela atenção, por ter ajudado na realização dos testes de determinação do fluxo crítico e por ter fornecido os equipamentos para que os testes fossem realizados em Viçosa.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram para que eu realizasse mais este sonho.

BIOGRAFIA

Ismarley Lage Horta Morais, filho de Ismar de Assis Morais e Isabel Lage Moreira, nasceu na cidade de Timóteo, Minas Gerais, em 8 de novembro de 1984.

Em março de 2004 iniciou o curso de Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em janeiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o curso de pós-graduação em Ciência Florestal, na área de ambiência, na Universidade Federal de Viçosa desenvolvendo trabalhos na área de tratamento aeróbio granular de efluentes de máquina de papel e obteve o título de *Magister Scientiae* em fevereiro de 2011.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	3
TRATAMENTO DE EFLUENTES DE FÁBRICA DE PAPEL ATRAVÉS DE REATORES AERÓBIOS GRANULAR PRODUÇÃO DE GRÂNULOS AERÓBIOS, EFICIÊNCIA E FILTRABILIDADE.	3
1. INTRODUÇÃO	3
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. O processo de lodos ativados.....	6
3.2. Biorreatores a membrana	7
3.3. Colmatação da membrana.....	8
3.3.1. Fluxo crítico	11
3.3.2. Reator sequencial por batelada	13
3.3.3. A formação do floco biológico.....	14
3.3.4. Biogrânulos aeróbios	16
4. METODOLOGIA.....	23
4.1. Efluentes	23
4.2. Lodo Biológico	23
4.3. Tratamento biológico	23
4.4. Membranas de microfiltração.....	25
4.5. Observações microscópicas	25

4.6.	Caracterização físico-química.....	26
4.7.	Teste para determinação do fluxo crítico dos lodos biológicos.....	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1.	Formação do lodo granular.....	28
5.2.	Temperatura e pH.....	31
5.3.	Eficiência de Remoção de Matéria Orgânica.....	34
5.4.	Morfologia dos Grânulos Aeróbios.....	37
5.5.	Fluxo crítico.....	38
6.	CONCLUSÕES.....	47
CAPITULO 2		48
SELEÇÃO DE LINHAGENS QUE CONTRIBUAM PARA O PROCESSO DE FORMAÇÃO DOS AGREGADOS.....		48
1.	INTRODUÇÃO	48
2.	HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	50
3.	REVISÃO DE LITERATURA	51
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1.	Plano experimental	58
4.2.	Isolados bacterianos	60
4.3.	Co-agregação na ausência de um único isolado	61
4.4.	Co-agregação entre pares ou trios de agregados.....	62
4.5.	Critério utilizado para determinação do índice de agregação	63
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1.	Meio de cultura.....	64
5.2.	Escolha da metodologia para determinação do índice de co-agregação..	64
5.3.	Avaliação da ausência de cada um dos isolados.....	67
5.4.	Combinação aos pares entre os isolados E2, E7, E9, E13 e E25 e todos os outros isolados.....	71
5.5.	Avaliação do efeito dos isolados E4 e E10 na formação dos agregados..	75
5.6.	Avaliação do efeito do isolado E19 na formação dos agregados.....	78

5.7. Teste de resistência dos agregados ao rompimento com ultra-som.....	84
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS	88
ANEXO A – MEIOS DE CULTURA	101
ANEXO B – MANUTENÇÃO DAS CULTURAS NO ULTRAFREEZER.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das unidades de um sistema de lodos ativados convencional. ...	7
Figura 2 - Mecanismos de incrustação de membranas. (a) estreitamento de poros, (b) obstrução de poros, e (c) formação de torta. Fonte: AMARAL, 2009.	9
Figura 3 - (A) Diferença de pressão e fluxo versus tempo para a condição de fluxo inferior ao fluxo crítico e (B) diferença de pressão e fluxo versus tempo para fluxo superior ao fluxo crítico. Fonte: Adaptado de Chen <i>et. al.</i> (1997).	12
Figura 4 - Comparação das diferenças de pressão obtidas para um fluxo fixado diretamente ou incrementado gradualmente. Fonte: Adaptado de Chen <i>et. al.</i> (1997).	13
Figura 5 - Imagem fotográfica de grânulos aeróbicos.	18
Figura 6 - Esquema do sistema de microfiltração utilizado para os testes de determinação de fluxo crítico.....	27
Figura 7 - Fotomicrografias do lodo do reator granular. (A), (B) e (C) lodo floculento; (D) e (E) início do aparecimento de grânulos; (F) maior parte do lodo constituída por grânulos; (G) lodo granular. Aumento de 100 vezes.	29
Figura 8 - Valores diários de pH dos efluentes dos reatores biológicos.	32
Figura 9 - Valores diários de temperatura dos efluentes dos tratamentos biológicos.	33
Figura 10 - Valores de DQO afluente e efluente aos reatores.	35
Figura 11 - Eficiências de remoção de DQO.	36
Figura 12 - DBO afluente e efluente aos reatores.	36
Figura 13 - Eficiências de remoção de DBO.	37
Figura 14 - Grânulos aeróbicos obtidos a partir do tratamento de efluente de máquina de papel.	37
Figura 15 – Fluxo, ao longo do tempo, do sistema com lodo aeróbio granular para diferentes valores de pressão ($SST = 2700 \text{ mg.L}^{-1}$).	38
Figura 16 - Fluxos medidos durante a filtração do sistema com lodo aeróbio granular ($SST = 2700 \text{ mg.L}^{-1}$).	39
Figura 17 - Fluxo, ao longo do tempo, do sistema com lodo floculento para diferentes valores de pressão ($SST = 2700 \text{ mg.L}^{-1}$).	39

Figura 18 - Fluxos medidos durante a filtração do sistema com lodo floculento (SST = 2700 mg.L ⁻¹).....	40
Figura 19 - Fluxo, ao longo do tempo, do lodo granular e floculento a diferentes valores de pressão (SST = 2700 mg.L ⁻¹).....	41
Figura 20 - Determinação do fluxo crítico para o lodo floculento. SST = 4400 mg.L ⁻¹	42
Figura 21 - Determinação do fluxo crítico para o lodo granular. SST = 4400 mg.L ⁻¹ .	42
Figura 22 – Fluxos medidos durante a filtração do sistema com lodo floculento SST = 4400 mg.L ⁻¹	43
Figura 23 – Fluxos medidos durante a filtração do sistema com lodo granular SST = 4400 mg.L ⁻¹	44
Figura 24 - Valores de fluxo ao longo do tempo para diferentes lodos biológicos com valores de SST de 2700 e 4400 mg.L ⁻¹	46
Figura 25 - Fluxograma com as etapas de trabalho realizadas.....	60
Figura 26 - Combinações entre isolados na ausência de um deles.	71
Figura 27 - Efeito da introdução dos isolados E4 e E10 em combinações de pares de isolados.	77
Figura 28 - Agregados formados em presença e na ausência do Isolado E19.	78
Figura 29 - Efeito do isolado E19 em combinações de pares de isolados.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Redução do tempo de decantação do reator de lodo aeróbio granular ao longo do tempo.....	24
Tabela 2 - Duração dos períodos de operação dos reatores após a formação do lodo granular	25
Tabela 3 - Número de ciclos necessários para recuperação do lodo do reator granular após cada redução do tempo de sedimentação	28
Tabela 4 - Fotomicrografias dos lodos biológicos ao longo do período de redução do tempo de sedimentação do lodo granular	30
Tabela 5 - Valores médios e desvios padrões encontrados para os parâmetros analisados no afluente e efluentes dos reatores	34
Tabela 6 - Valores das absorvâncias, após 54 horas de incubação, antes e após centrifugação para determinação da porcentagem de co-agregação e classificação por ordem decrescente de co-agregação	66
Tabela 7 - Resultados do teste inicial para verificar o efeito da ausência de cada um dos isolados na formação dos agregados. Cada tratamento corresponde à combinação de 18 dos 19 isolados obtidos, exceto aquele isolado indicado no tratamento	67
Tabela 8 - Repetição de algumas combinações utilizadas para verificar o efeito da ausência de cada um dos isolados na formação dos agregados.....	70
Tabela 9 - Resultados do teste de formação de agregados entre pares de isolados	71
Tabela 10 - Indicação das combinações que formaram ou não formaram agregados durante o experimento	74
Tabela 11 - Efeito da presença dos isolados E4 e E10 na formação de agregados..	76
Tabela 12 - Resultados da introdução do isolado E19 em combinações que formavam grandes agregados com boa sedimentabilidade	79
Tabela 13 - Imagens microscópicas das combinações em presença e ausência do Isolado E19 após 31,5 horas de incubação. Aumento 1000x.....	82
Tabela 14 - Combinações contendo o isolado E19 antes do teste ao rompimento com ultra-som.....	84

Tabela 15 - Média e desvio padrão da quantidade de pulsos necessários para o rompimento dos agregados presentes nas combinações.....85

RESUMO

MORAIS, Ismarley Lage Horta. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Tratamento com lodo aeróbio granular de efluente de fábrica de papel.** Orientador: Cláudio Mudado Silva. Co-orientadores: Ann Honor Mounteer e Antônio Galvão do Nascimento.

O tratamento biológico de águas residuárias por lodos ativados pode ser utilizado para diversas tipologias industriais, alcançando elevados índices de remoção de matéria orgânica e, em alguns casos, de nutrientes. No entanto, um dos principais problemas enfrentados neste processo tem sido a separação do lodo biológico nos decantadores secundários, em decorrência de problemas de má formação dos flocos, causando perdas de sólidos e, conseqüentemente, deteriorando a qualidade do efluente tratado. Neste contexto, os biorreatores a membrana (BRM) surgiram como uma alternativa para solucionar tal problema, uma vez que a separação entre os sólidos e o efluente tratado não depende das características de sedimentabilidade do lodo. Entretanto, tem-se observado que flocos mal formados provocam um entupimento rigoroso dos poros das membranas, causando a redução do fluxo e o aumento na freqüência de limpeza das membranas. Assim, mesmo em sistemas BRM, a boa formação do floco biológico mostra-se essencial para o bom andamento do processo. Recentemente, pesquisadores trabalhando com reatores de lodos ativados descobriram a organização da microbiota em forma de grânulos aeróbios. Neste tipo de configuração, as bactérias se agregam de forma mais compacta, podendo reduzir a possibilidade de formação de biofilme na superfície da membrana, e permitindo a manutenção de um fluxo mais elevado por maiores períodos de tempo durante a filtração. O presente estudo verificou a possibilidade de formação de grânulos aeróbios com efluentes de máquina de papel e comparou a eficiência de remoção de DQO e DBO dos tratamentos utilizando-se lodo granular com lodo convencional floculento. A filtrabilidade dos lodos granular e floculento foram comparados através de testes preliminares de filtração. Foram utilizados dois reatores em paralelo, sendo um com lodo aeróbio granular e outro com lodo floculento. Ambos os sistemas obtiveram eficiências de remoção de DBO de 97% e de remoção de DQO de 89% e

91% para os reatores granular e floculento, respectivamente. No reator granular, houve a formação de grânulos de tamanhos variados, com grânulos de diâmetros de até cerca de cinco milímetros, visíveis a olho nu. Os testes de determinação do fluxo crítico dos lodos biológicos indicaram um maior fluxo para o lodo granular quando operado a uma concentração de 2700 mg L^{-1} . No entanto, um menor fluxo crítico para o lodo granular foi observado quando os sistemas foram operados com sólidos suspensos totais (SST) igual a 4400 mg.L^{-1} . Posteriormente, foi realizado um estudo microbiológico buscando determinar quais os tipos de bactérias que influenciam positivamente e negativamente para a formação de grânulos. Foi realizada a desagregação dos grânulos, isolamento das culturas puras e realizados estudos de co-agregação e autoagregação indicando alguns isolados que contribuem para a formação dos grânulos e outros isolados que prejudicam o processo de formação.

ABSTRACT

MORAIS, Ismarley Lage Horta. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2011. **Aerobic granular sludge treatment of paper mill effluents.** Adviser: Cláudio Mudado Silva. Co-advisers: Ann Honor Munteer and Antônio Galvão do Nascimento.

The activated sludge process is widely used for the treatment of industrial effluents, achieving high rates of organic matter removal. Nevertheless, the separation of biological sludge in secondary clarifiers can be a serious problem of this process due to the poor floc formation, causing solids losses and, consequently, deterioration of treated effluent quality. Membrane bioreactors (MBR) emerged as an alternative to solve this problem, since the separation of suspended solids from the treated effluent is not dependent on the sludge settling characteristics. However, it has been observed that malformed flocs foul the pores of the membranes, causing the reduction of flux and consequently an increase in the need for membrane cleaning. Thus, even in MBR, good formation of the biological floc is essential for proper operation of the process. Recently, researchers working with aerated activated sludge reactors found a different organization of the microbiota in the form of aerobic granules. In this configuration, the bacteria clump together more tightly, thus reducing the possibility of biofilm formation on the membrane surface, and allowing the maintenance of a higher flow for longer periods of time during filtration. This study examined the possibility of formation of aerobic granules with paper machine effluent and compared the removal efficiency of COD and BOD of the granular sludge with the conventional flocculent sludge. The filterability of sludge granular and flocculent were also compared. Two reactors were operated in parallel, one with aerobic granular sludge and the other with flocculent sludge. Both systems achieved BOD removal efficiencies of 97% and COD removal of 89% and 91% for granular and flocculent sludge, respectively. In the granular sludge reactor, granules of different sizes with diameters up to about five millimeters, visible to the naked eye were formed. Sludge filtration tests showed a higher critical flow for granular sludge with total suspended solids (TSS) equal to 2700 mg L^{-1} . However, the opposite behavior was observed when the reactors were operated with a TSS of 4400 mg.L^{-1} . A microbiological study to identify bacterial isolates that positively and negatively

influence granules formation. Granules were dispersed, pure cultures isolated and a re-aggregation study was carried out indicating that some isolates contribute to the formation of granules and other isolates harm the aggregation process.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho buscou avaliar a viabilidade técnica de se realizar um tratamento aeróbio granular de efluente de máquina de papel. Processos de tratamento biológico de efluentes de fábricas de papel são adotados em praticamente todo o mundo. As Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) podem possuir como tratamento secundário processos aeróbios ou anaeróbios de diversas modalidades tais como o dos lodos ativados, reatores anaeróbios de fluxo ascendente, lagoas de estabilização, etc.

Mais recentemente, processos biológicos acoplados a micro ou ultrafiltração, denominados biorreatores a membranas (BRM) têm ganhado espaço por se tratar de processos compactos e de alta eficiência. No entanto, um fator limitante ao uso desta tecnologia tem sido a severa colmatação dos poros das membranas que reduz sobremaneira o fluxo e aumenta a necessidade de maiores áreas.

Por outro lado, tem-se observado que o rigor do processo de colmatação está intimamente ligado a qualidade do lodo, ou seja, lodo com flocos bem formados apresenta uma melhor filtrabilidade.

A poucos anos atrás, se observou a possibilidade de formação de grânulos biológicos em reatores aeróbios, diferenciando a morfologia do lodo que convencionalmente se apresenta na forma de flocos. Os grânulos possuem um maior diâmetro e forma arredondada, mas não existem experiências industriais para tratamento de efluentes utilizando este novo conceito.

Neste contexto, o presente trabalho, que está dividido em dois capítulos, buscou essencialmente estudar os seguintes tópicos:

1) Capítulo 1: TRATAMENTO DE EFLUENTES DE FÁBRICA DE PAPEL ATRAVÉS DE REATORES AERÓBIOS GRANULAR, PRODUÇÃO DE GRÂNULOS AERÓBIOS, EFICIÊNCIA E FILTRABILIDADE.

- a. Verificar a possibilidade de formação de grânulos em reatores sequenciais por batelada aeróbios alimentados com efluentes de fábrica de papel.

- b. Comparar a eficiência do reator com lodo granular com reator convencional com lodo floculento.
- c. Comparar a filtrabilidade e potencial de colmatação de membranas de microfiltração dos lodos granulares e floculentos.

2) Capítulo 2: SELEÇÃO DE LINHAGENS QUE CONTRIBUAM PARA O PROCESSO DE FORMAÇÃO DOS AGREGADOS

- a. verificar quais microrganismos presentes no lodo aeróbio granular contribuem para a agregação microbiana
- b. verificar quais microrganismos prejudicam o processo de formação de agregados.

CAPÍTULO 1

TRATAMENTO DE EFLUENTES DE FÁBRICA DE PAPEL ATRAVÉS DE REATORES AERÓBIOS GRANULAR PRODUÇÃO DE GRÂNULOS AERÓBIOS, EFICIÊNCIA E FILTRABILIDADE.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de lodos ativados convencional tem sido amplamente utilizado no tratamento de efluentes de fábricas de polpa celulósica e papel, alcançando uma elevada eficiência na remoção de matéria orgânica. Este processo é constituído, basicamente, por um reator (tanque de aeração) onde a matéria orgânica dos efluentes é estabilizada biologicamente por uma comunidade microbiana mista, seguido por um processo de sedimentação (decantador secundário) responsável pela separação do efluente tratado e os sólidos suspensos; e uma linha de recirculação de lodo que retorna parte do lodo decantado para o reator, possibilitando a manutenção de uma maior concentração de microrganismos no tanque de aeração.

Em um biorreator a membranas (BRM), o decantador secundário é substituído por um processo de filtração com membranas, geralmente micro ou ultrafiltração, que retém os sólidos suspensos no sistema (concentrado) e permite a passagem do efluente tratado (permeado). A principal vantagem desse sistema é que ele permite a produção de um efluente tratado isento de sólidos suspensos e de melhor qualidade. A maior limitação do processo de BRM é a ocorrência de colmatação (entupimento) das membranas e conseqüente redução do fluxo de permeado através delas. Em um BRM, a colmatação está relacionada principalmente com a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) pela microbiota e pela formação de um biofilme na superfície das membranas.

Na atividade microbiana, os EPS servem de barreira entre a célula e o meio ambiente. Eles cumprem o papel de protetor das células contra dessecação, agentes antibacterianos (antibióticos, anticorpos, bacteriocinas, fagos, células fagocíticas), predação por protozoários e por outros organismos superiores. Dessa forma, o aumento na produção de EPS pode ser uma resposta a algum tipo de estresse que a célula esteja submetida.

No sistema de lodos ativados convencional, os microrganismos no tanque de aeração tendem a se organizar na forma de floco biológico. A floculação é resultado do metabolismo microbiano e ela tende a ocorrer quando a disponibilidade de

alimento é limitada ou a comunidade microbiana é submetida a algum outro tipo de estresse (VON SPERLING, 2005).

Estudos recentes mostraram que sob determinado nível de estresse, essa comunidade microbiana pode se organizar na forma de grânulos. A morfologia dos biogrânulos aeróbios é completamente diferente de qualquer outro tipo de biofilme, incluindo os biofilmes de lodos ativados na forma de flocos. Os biogrânulos possuem formato esférico ou arredondado.

Grânulos aeróbios possuem um importante papel na adsorção de substâncias tóxicas, devido à grande área superficial, porosidade e boa capacidade de sedimentação (ADAV *et al.* 2009). O lodo granular possivelmente pode apresentar melhor sedimentabilidade e filtrabilidade em relação ao lodo floculado por apresentar maior tamanho. Esta característica, associada à baixa compressibilidade do lodo granular, pode levar a uma diminuição significativa das incrustações da membrana no BRM. Assim, a principal forma de incrustação da membrana causada pelo lodo pode ser eliminada pela substituição do lodo floculado pelo granular, sendo que a permeabilidade ao longo da operação ficaria condicionada apenas aos solutos e colóides presentes no meio.

A utilização desta nova configuração da biomassa em sistemas de BRM pode permitir o controle do fluxo com a diminuição de incrustações da membrana, mantendo o bom desempenho para o tratamento.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

As hipóteses deste trabalho são:

- Dependendo das condições de operação do reator biológico é possível formar lodo aeróbio granular em biorreatores de tratamento de efluentes de fábricas de papel.
- O biorreator com lodo aeróbio granular apresenta elevada eficiência de remoção de matéria orgânica de um efluente de máquina de papel, alcançando valores tão significativos quanto aqueles obtidos por um sistema com lodos floculares.
- O fluxo através da membrana de um biorreator a membranas (BRM) com lodo aeróbio granular é maior do que em um com lodo floculado devido à menor formação de biofilme na superfície da membrana pelo lodo granular.

Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho foi verificar a viabilidade técnica de se utilizar o processo de tratamento de efluentes de fábrica de papel com lodo granular.

Como objetivos específicos têm-se:

- produzir lodo aeróbio granular em reatores de tratamento de efluentes de fábrica de papel;
- determinar parâmetros para a granulação do lodo biológico;
- avaliar o desempenho do reator com lodo granular e compará-lo ao lodo flocular em relação à remoção de matéria orgânica;
- caracterizar a microbiota presente nos grânulos aeróbios;
- avaliar o desempenho dos grânulos em relação ao atendimento aos padrões de lançamento de efluentes.
- avaliar a filtrabilidade de lodo granular e comparar com o lodo flocular convencional.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O processo de lodos ativados

O processo de tratamento biológico mais utilizado no mundo é o de lodos ativados, amplamente utilizado para o tratamento de águas residuárias domésticas e industriais, que permite a obtenção de elevadas eficiências de remoção da matéria orgânica com baixos requisitos de área, se comparado a outros sistemas de tratamento. No entanto, inclui um índice de mecanização superior ao de outros sistemas de tratamento, implicando em uma operação mais sofisticada e em maiores consumos de energia elétrica. (VON SPERLING, 2005).

O processo consiste basicamente de um reator biológico aerado, comumente denominado “tanque de aeração”, seguido por um decantador secundário e uma linha de recirculação do lodo decantado para o reator biológico, contribuindo para manter elevada a concentração de microrganismos no reator biológico. A água residuária é estabilizada biologicamente por uma comunidade microbiana, constituindo-se basicamente de bactérias heterotróficas, fungos, protozoários e alguns metazoários. Esta biomassa se utiliza do substrato presente no efluente para se desenvolver ocorrendo o fenômeno de floculação, ou seja, a formação do floco biológico. A decantação do lodo é possível, graças à essa formação dos flocos pelo crescimento de bactérias heterotróficas. Estas bactérias degradam a matéria orgânica presente no efluente, obtendo energia para reprodução e síntese de exopolímeros, o que favorece a floculação (JENKINS *et al.*, 2003).

No decantador secundário ocorre a separação dos flocos biológicos do efluente tratado pela ação da gravidade. Parte do lodo sedimentado no decantador é descartada a fim de controlar o balanço de sólidos e a eficiência do sistema; outra parte é recirculada para o biorreator, de forma a manter a concentração de microrganismos elevada, aumentando as taxas de depuração do efluente. A qualidade final do efluente tratado depende, sobretudo, da perfeita separação da fase sólida (lodo biológico) da fase líquida (efluente tratado). Um esquema do sistema de lodos ativados é apresentado na Figura1.

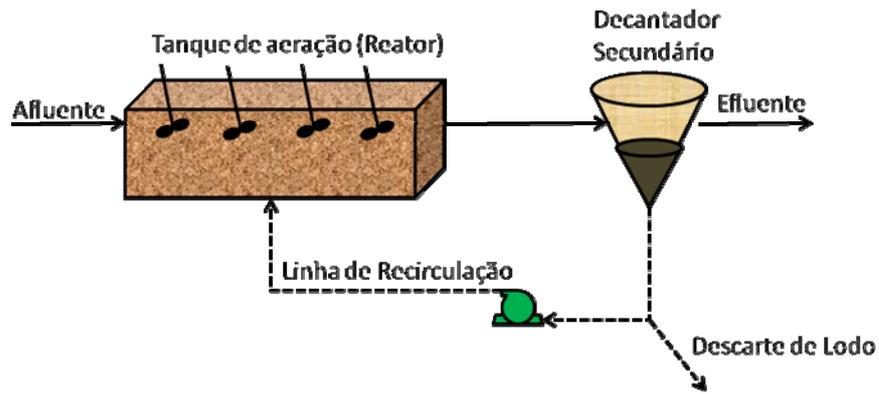


Figura 1 - Esquema das unidades de um sistema de lodos ativados convencional.

3.2. Biorreatores a membrana

Membranas são barreiras que possibilitam a retenção física e/ou química de partículas presentes num fluido. A seletividade das membranas porosas é dependente do tamanho dos poros e das propriedades físico-químicas dos polímeros componentes da membrana, principalmente dos polímeros localizados em sua superfície.

O biorreator a membranas (BRM) é um processo de tratamento onde a separação dos microrganismos e outros sólidos suspensos presentes no efluente ocorre através do uso de filtração por membranas ao invés de decantação por gravidade.

Nos últimos anos, os BRM têm ganhado popularidade e se tornado uma alternativa avançada para o tratamento de efluentes. Isto só foi possível pelo desenvolvimento de tecnologias que melhoraram a eficiência, aumentaram a vida útil, e reduziram os custos dos processos com membranas, e pela vantagem de se produzir um efluente com concentrações de sólidos suspensos desprezíveis. Loures (2007) operando um sistema anaeróbio de BRM alimentado com efluente de máquina de papel, alcançou uma eficiência de remoção de sólidos suspensos totais de 100 %; mesma eficiência obtida por Souza (2008) tratando o mesmo tipo de efluente em um sistema BRM aeróbio.

Surgindo como uma inovação importante para o tratamento de águas residuárias, o sistema de BRM, possuiu uma estrutura compacta, que pode gerar um efluente tratado de melhor qualidade do que tratamentos convencionais e com uma baixa produção de lodo excedente. No entanto, a colmatação e conseqüente

redução do fluxo através das membranas nos processos de BRM limita a sua aplicação.

Relatos em literatura indicam que a formação de incrustações à membrana está intimamente relacionada com os polissacarídeos extracelulares (EPS) e com propriedades do lodo biológico. Li *et al.* (2005) observaram uma maior resistência referente à torta com a diminuição do tamanho do floco, embora em alguns casos este comportamento não seja observado.

Ramesh *et al.* (2006) constataram que o EPS quando aderido à célula contribui em menor proporção para a diminuição da permeabilidade da membrana do que o EPS em sua forma solúvel.

Foi verificado por Trussel *et al.* (2007) que a permeabilidade normalizada da membrana de um sistema de BRM diminui com o aumento da concentração de sólidos suspensos e aumenta com a intensificação da aeração por bolhas grossas.

3.3. Colmatação da membrana

Os quatro principais tipos de colmatação das membranas são: orgânica, biológica, inorgânica e particulada. Dentre estas, a colmatação orgânica é a mais comum e a biológica a mais severa (GOOSEN *et al.*, 2004 citado por STORK, 2008). A colmatação orgânica consiste na adesão e acumulação de compostos orgânicos na superfície da membrana. A biológica é a deposição e a formação de biofilmes. A inorgânica é causada pela formação e acumulação de cristais de íons e afeta principalmente membranas de menores porosidades como nanofiltração ou osmose inversa nas quais ocorre a retenção de íons. A colmatação particulada consiste na deposição de macromoléculas orgânicas e agregados, maiores do que 0,45 micrômetros, na superfície da membrana provocando a redução do fluxo.

As interações entre os diferentes tipos de materiais incrustantes (biológicos, orgânicos e inorgânicos) podem acelerar ou aumentar a incrustação. Durante a operação de BRM as concentrações de biopolímeros e materiais inorgânicos devem ser controladas para minimizar a incrustação das membranas. A concentração de biopolímeros pode ser controlada pela otimização das condições operacionais, tais como idade do lodo, TDH, carga orgânica e relação DBO/N/P e a concentração de inorgânicos pode ser controlada através de pré-tratamento (AMARAL, 2009).

Desta forma, a caracterização da “torta” formada na superfície da membrana durante a filtração e a compreensão do mecanismo de incrustação são importantes para a definição dos parâmetros operacionais ótimos do BRM, assim como podem fornecer informações importantes para o controle de incrustação (AMARAL, 2009).

Dentre os mecanismos de formação da colmatação, destacam-se: a formação de “torta” e obstrução dos poros. Além destes, outro mecanismo importante para a redução do fluxo é a adsorção superficial (estreitamento de poros). Estes mecanismos são influenciados pelo pH, pela concentração iônica, pelos tipos de compostos orgânicos e inorgânicos presentes e pela carga superficial da membrana (GOOSEN *et al.*, 2004; ZULARISAM *et al.*, 2006; STORK, 2008). Tais mecanismos estão ilustrados na Figura 2.

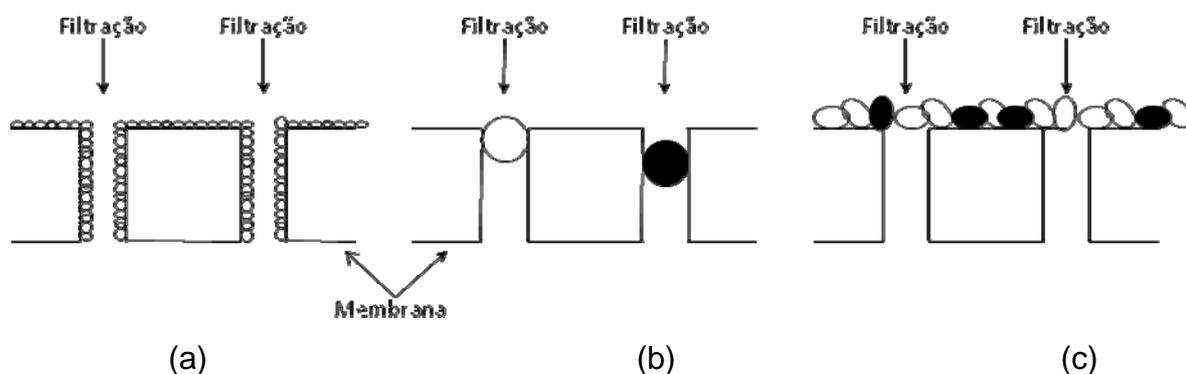


Figura 2 - Mecanismos de incrustação de membranas. (a) estreitamento de poros, (b) obstrução de poros, e (c) formação de torta. Fonte: AMARAL, 2009.

Na adsorção superficial, à medida que os compostos presentes no meio líquido são retidos pela membrana, eles se concentram e aderem à superfície. Isto ocorre devido à carga da membrana e dos contaminantes, ao atrito e às forças de arraste (AL-AHMAD *et al.*, 2000; GOOSEN *et al.*, 2004; STORK, 2008).

No processo de formação de torta uma camada gelatinosa é formada sobre a superfície da membrana à medida que aumenta a concentração dos constituintes gerando uma camada com ligações intermoleculares e iônicas fracas. A camada gelatinosa reversível aumenta a resistência à passagem, resultando na redução do fluxo e do tamanho dos poros (AL-AHMAD *et al.*, 2000; GOOSEN *et al.*, 2004; STORK, 2008). Essas ligações fracas podem ser rompidas por retrolavagem ou fluxo tangencial; entretanto elas voltam a se formar rapidamente. O tratamento efetivo consiste em lavagens frequentes ou limpezas químicas, o que pode implicar em aumento do custo do processo.

Uma consequência da formação desta camada gelatinosa é o aumento da pressão necessária para a manutenção do fluxo. Elevadas pressões resultam em agregação dos constituintes (coloidal, macromolecular e compostos orgânicos micromoleculares) formando uma camada fortemente aderida à superfície da membrana.

A redução do fluxo também ocorre pelo bloqueio dos poros da membrana. Partículas pequenas como os colóides são arrastadas através da membrana, mas parte pode ficar retida devido a diferenças no tamanho ou morfologia dos poros. A obstrução também pode estar relacionada à retenção no interior dos poros de partículas menores que o tamanho destes provocando a redução do tamanho efetivo dos poros (COMSTOCK, 1982; KILDUFF *et al.*, 2005; STORK, 2008).

A carga elétrica superficial da membrana e dos compostos tem grande influência na retenção de contaminantes e na colmatação. Em geral, membranas com carga superficial negativa apresentam boa retenção e são menos favoráveis à colmatação devido ao fato de a maior parte das partículas causadoras deste fenômeno é composta por compostos hidrofóbicos e compostos carregados negativamente (SADR GHAYENI *et al.*, 1998; GOOSEN *et al.*, 2004; STORK, 2008). Constituintes com elevada carga superficial negativa, como ácidos húmicos e fúlvicos, são repelidos pela carga da membrana evitando a aderência destes à superfície (JARUSUTTHIRAK *et al.*, 2002; STORK, 2008).

O valor da força de repulsão entre a membrana e os contaminantes pode ser reduzido pelo aumento da força iônica da solução. Águas com alta concentração de íons são mais propensas à colmatação do que águas com menor concentração devido à acumulação de íons em torno das superfícies carregadas (BRAGHETTA *ET AL.*, 1997; STORK, 2008). Superfícies com cargas negativas atraem íons com cargas positivas formando uma camada elétrica dupla. Este acúmulo de íons positivos atrai os íons negativos que, por sua vez, atrai mais íons positivos, numa região chamada de camada difusa. Elevada força iônica e baixo pH possuem efeitos semelhantes no comportamento da superfície da membrana e na colmatação. Essas variáveis reduzem as forças de repulsão eletrostática entre a superfície da membrana e os contaminantes, permitindo a concentração dos contaminantes na superfície, provocando o entupimento da membrana. Por outro lado, forças de repulsão eletrostáticas reduzidas causam a compressão da membrana. Essa

redução no volume e, conseqüentemente, dos poros, resulta na redução do fluxo (BRAGHETTA *et al.*, 1997; KILDUFF *et al.*, 2005; STORK, 2008).

3.3.1. Fluxo crítico

Partículas polarizadas próximas à superfície da membrana podem influenciar o fluxo através da membrana de diferentes maneiras. Por exemplo, algumas partículas podem interagir com a superfície da membrana por adsorção ou alocação física nos poros; podendo ocorrer tanto interação interna quanto superficial. Além disso, em elevadas concentrações, estas partículas podem formar um biofilme (CHEN *et al.*, 1997).

Um dos maiores problemas de processos de membranas é a redução do fluxo a valores muito abaixo aos da capacidade teórica da membrana. A variação típica do fluxo com o tempo consiste numa redução inicial rápida seguida de uma longa e gradual redução ao longo do tempo. É sabido que a colmatação da membrana é o principal fenômeno responsável por isso. A ocorrência da colmatação afeta o desempenho da membrana tanto por deposição de uma camada sobre a membrana ou pelo bloqueio total ou parcial dos poros, afetando o tamanho efetivo destes (FIELD *et al.*, 1995).

Nos experimentos que mostram a operação de sistemas de microfiltração a fluxo constante, sem o aumento da pressão através da membrana por longo período de tempo, pode-se deduzir que nestas circunstâncias a colmatação é branda. Por outro lado, quando a pressão é aumentada e atinge um valor onde começa a ocorrer uma colmatação rigorosa, o fluxo se reduz a valores iguais ou inferiores aos valores de fluxo observados antes da colmatação. Certamente, mesmo reduzindo novamente a diferença de pressão o fluxo continua inferior devido a uma camada de colmatação na superfície da membrana (FIELD *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1997). Tal comportamento pode ser observado na Figura 3.

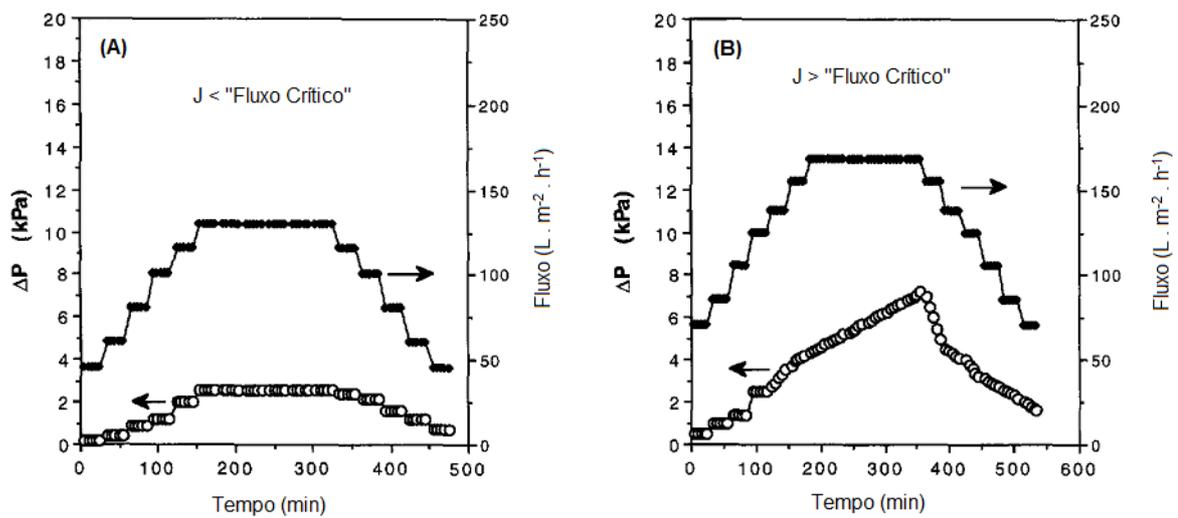


Figura 3 - (A) Diferença de pressão e fluxo versus tempo para a condição de fluxo inferior ao fluxo crítico e (B) diferença de pressão e fluxo versus tempo para fluxo superior ao fluxo crítico. Fonte: Adaptado de Chen *et. al.* (1997).

A hipótese do fluxo crítico de um sistema de filtração é que existe um fluxo abaixo do qual a redução do fluxo com o tempo não existe (ou é muito pequeno); acima deste, é observado a colmatação. Este fluxo é o fluxo crítico e depende das características hidrodinâmicas, das características do lodo biológico e de outras variáveis do sistema de filtração (FIELD *et. al.*, 1995).

Estudos realizados por diversos autores (KIM *et. al.*, 1993; CHEN *et. al.*, 1995; FRANKEN *et. al.*, 1990; FANE e HODGSON, 1989; BOWEN e GAN, 1991; HODGSON *et. al.*, 1993) citados por Chen *et. al.* (1997), confirmaram que sistemas de filtração operando com elevados fluxos iniciais podem causar uma colmatação mais severa do que operando a fluxos mais baixos. Agregação coloidal e depósitos heterogêneos são observados numa alta propagação em direção à membrana. Para partículas maiores como biomassa de lodos ativados, não foi observada colmatação quando o fluxo foi mantido abaixo de um valor crítico que dependia do fluxo, do tamanho dos poros e da natureza da alimentação.

Em experimentos realizados por Chen *et. al.* (1997), foram observados que o perfil de fluxo/pressão é muito dependente da forma como os experimentos são conduzidos. Quando um fluxo elevado foi imposto diretamente, a pressão através da membrana aumentou rapidamente, assumindo valores mais elevados do que quando o fluxo foi aumentado gradualmente. Tal comportamento pode ser observado na Figura 4.

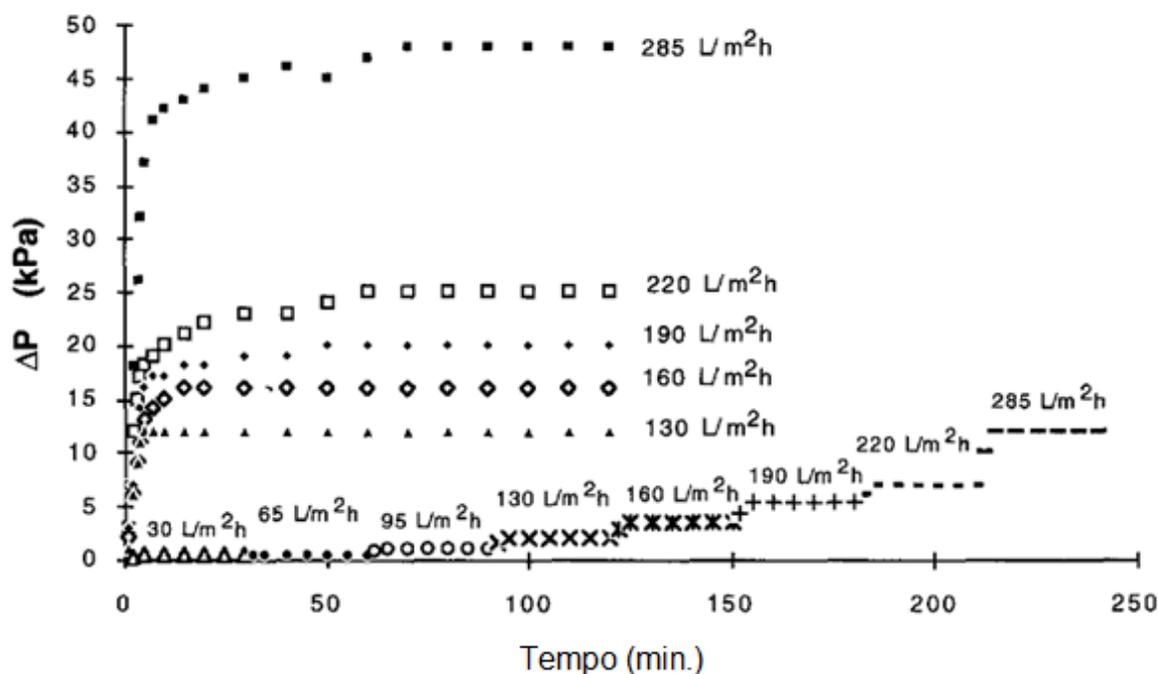


Figura 4 - Comparação das diferenças de pressão obtidas para um fluxo fixado diretamente ou incrementado gradualmente. Fonte: Adaptado de Chen *et. al.* (1997).

É possível observar uma grande diferença entre os valores medidos de ΔP , o qual para o fluxo máximo ($285 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) foi de aproximadamente 50 kPa quando o fluxo foi imposto diretamente e menos de 15 kPa quando o fluxo foi aumentado gradualmente. Uma explicação para essa diferença é que a natureza dos depósitos varia significativamente com a forma como eles são formados. Para fluxos elevados e impostos diretamente, o biofilme forma rapidamente e pode se tornar uma camada consolidada com baixa fluidez. Para fluxos menores (e menores pressões) a camada polarizada apresentará menor concentração, mais instável e com menor possibilidade de consolidação devido a interações entre solutos.

3.3.2. Reator sequencial por batelada

Os processos que envolvem lodo ativado em batelada, mais conhecido como RSB (reatores sequenciais por batelada), têm sido propostos como alternativa aos processos contínuos convencionais.

Nos reatores sequenciais por batelada, a biomassa encontra-se em suspensão, tal como ocorre no processo de alimentação contínua, no entanto, todas

as etapas do processo ocorrem em um único tanque, quais sejam, oxidação biológica e decantação secundária, onde reação e separação acontecem em diferentes momentos. Isto é conseguido por meio de ciclos de operação com durações definidas.

Os reatores seqüenciais por batelada são operados em regime de ciclos, onde cada ciclo é composto por cinco etapas distintas (VON SPERLING, 1996):

- Enchimento ou alimentação – enchimento consiste da adição do efluente contendo o substrato para a atividade microbiana;
- Reação – é ligado o sistema de aeração para oxidação biológica da matéria orgânica;
- Sedimentação – interrompe-se a aeração para repouso do efluente sem interferência de entrada e saída de líquidos;
- Retirada do sobrenadante – O efluente clarificado é retirado durante a fase de esvaziamento. Feito isso, a biomassa permanece em repouso até que um novo ciclo se reinicie;
- Repouso – É feito o descarte do lodo, quando necessário.

Utilizando um tanque único, as mudanças entre esses processos e operações ocorrem simplesmente ao longo do tempo, e não em unidades separadas como ocorre nos processos convencionais de fluxo contínuo. A biomassa permanece no reator durante todos os ciclos, eliminando dessa forma a necessidade de decantadores separados e das elevatórias de recirculação de lodo.

A duração usual de cada ciclo pode ser alterada em função das variações da vazão afluente, das necessidades do tratamento e das características da água residuária e da biomassa do sistema. Para aplicações em processos com geração contínua de efluentes é necessária a instalação de pelo menos dois tanques, onde um recebe o fluxo enquanto o outro completa o ciclo de tratamento.

3.3.3. A formação do floco biológico

O floco biológico é uma estrutura heterogênea, composta por microrganismos e material orgânico diverso. Além das bactérias e dos protozoários, fungos, rotíferos, nematóides e, mais raramente, larvas de insetos, também são encontrados, aglomerados nos flocos. Contudo, as condições que levam ao crescimento

aglomerado dos microrganismos ainda não estão bem esclarecidas (VON SPERLING, 1996). O que se sabe é que as bactérias filamentosas funcionam como uma espécie de esqueleto estrutural, onde as bactérias formadoras de floco se aderem, provavelmente por meio de exopolissacarídeos, presentes na forma de cápsula ou camada gelatinosa (VON SPERLING, 1996).

O floco biológico é formado por duas estruturas básicas, a saber: microestrutura, que é composta por bactérias formadoras de flocos e macroestrutura, constituída por microrganismos filamentosos. Estes microrganismos formam uma cadeia, uma espécie de rede, que serve de estrutura de apoio para o crescimento dos organismos formadores de flocos. As bactérias filamentosas, que formam a macroestrutura são responsáveis pelo formato dos flocos, uma vez que o floco cresce na direção que as bactérias filamentosas se desenvolvem (JENKINS *et al.*, 2003).

Quando há o crescimento excessivo das bactérias filamentosas e o lodo torna-se intumescido, com pouca densidade, ao invés de decantar, ele flutua no decantador secundário, ocasionado o que se chama de flotação por intumescimento filamentosos.

Por outro lado é possível que o crescimento de microrganismos filamentosos seja insuficiente, neste caso, a estrutura do floco é fraca, desintegrando facilmente com a turbulência do tanque, formando o que se chama de “pin-point flocc” ou floco cabeça de alfinete, que sedimentam muito lentamente, produzindo um efluente turvo. O ideal é que haja um balanço entre os crescimentos dos microrganismos filamentosos e os formadores de flocos, formando flocos fortes, compactos e com boa sedimentabilidade.

A floculação é resultado do metabolismo bacteriano. Neste processo, as bactérias tendem a flocular-se quando as concentrações de matéria orgânica se encontram abaixo do nível necessário para sustentar um crescimento logarítmico. Nesse sentido, a floculação ocorrerá, principalmente, na condição de déficit alimentar e nutricional, ou seja, quando a disponibilidade de alimento for limitada. Tal fenômeno pode ser explicado pela maior produção de exopolissacarídeo (EPS) nesta condição.

Segundo Sutherland (2001), não existem razões conclusivas sobre a produção de EPS pelas células. Entretanto, algumas suposições sobre a necessidade fisiológica dos EPS para a célula são bem aceitas. Os EPS servem de barreira entre a célula e o meio ambiente. Eles cumprem o papel de protetor das

células contra dessecação, agentes antibacterianos (antibióticos, anticorpos, bacteriocinas, fagos, células fagocíticas), predação por protozoários e por outros organismos superiores. Dessa forma, o aumento na produção de EPS pode ser uma resposta a algum tipo de estresse que a célula esteja submetida (SUTHERLAND, 2001), o que explica melhores floculações quando a disponibilidade de alimento é baixa. Segundo Jenkins *et al.* (2003) e Von Sperling (2005), altas taxas de alimento disponível em relação à massa celular, ou seja, alta relação A/M beneficiam o crescimento disperso em detrimento à floculação.

Sutherland (2001) verificou que a síntese de EPS não é somente em função da taxa de alimento disponível em relação à concentração de massa celular, mas dependente da disponibilidade de substrato de carbono (dentro e fora da célula) e, principalmente, do balanço entre carbono e nutrientes. O excesso de carbono disponível e a limitação de nutrientes (nitrogênio, potássio e fosfato) promoverão a síntese de EPS.

3.3.4. Biogrânulos aeróbios

A primeira vez em que se observou o fenômeno de granulação do lodo foi em um reator piloto da fábrica CSM em Amsterdam, sob condições anaeróbias (WANG *et al.*, 2004). O lodo granular com características vantajosas, como boa capacidade de sedimentação e atividade metanogênica, foi amplamente incorporado aos sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes, como em reatores UASB. Nestes reatores a biomassa que cresce apresenta boa sedimentabilidade o que permite a acumulação de grandes quantidades de biomassa ativa no reator e os clarificadores são dispensados, pois o processo de separação do lodo ocorre dentro do próprio reator.

O desenvolvimento de biogrânulos aeróbios foi relatado pela primeira vez por Mishima e Nakamura (1991) em sistema contínuo, em um reator aeróbio de manta de lodo com fluxo ascendente. Grânulos aeróbios com diâmetro de 2-8 mm foram desenvolvidos, apresentando boa sedimentabilidade.

Beun *et al.* (2002) consideram que o crescimento na forma granular seria uma forma especial de crescimento em biofilme. Existe a hipótese de que a estrutura de um biofilme é o resultado líquido do crescimento da biomassa e processos de separação. Neste caso, o crescimento da biomassa seria influenciado principalmente pela taxa de carga do substrato e pelo rendimento de crescimento dessa biomassa. Já os processos de separação nestes sistemas altamente

turbulentos seriam influenciados, principalmente, pelas forças cisalhantes. Yang *et al.* (2004) também reforçam a idéia, propondo que o crescimento dos grânulos aeróbios após o início da aderência célula a célula seria similar ao crescimento de um biofilme, resultado líquido entre o crescimento bacteriano e o desprendimento de material do biofilme. O balanço entre os processos de crescimento e desprendimento, por sua vez, conduzirá a um equilíbrio na granulometria.

A morfologia de biogrânulos aeróbios é completamente diferente de qualquer outro tipo de biofilme, como diferente dos biofilmes de lodos ativados na forma de flocos. A forma de um biogrânulo aproxima-se de esférica à arredondada (Figura 5), e a superfície externa possui coloração clara (LIU e TAY, 2004). Já o diâmetro médio varia de 0,2 a 5,0 mm, embora alguns autores cite diâmetros de grânulos aeróbios de até 8,0 mm (MISHIMA e NAKAMURA, 1991).

O lodo granular aeróbio apresenta ainda vantagens em relação ao lodo granular anaeróbio, como menor tempo de formação, menores temperaturas operacionais e uma capacidade de promover a remoção de nutrientes da água residuária (LIU e TAY, 2004). Estudos recentes revelam que a tecnologia de granulação aeróbia poderia ser aplicada para o tratamento de efluentes que possuem alta resistência ao tratamento biológico (MOY *et al.*, 2002), com a possibilidade de remoção simultânea de nitrogênio (YANG *et al.*, 2004), remoção de fósforo e para o tratamento de efluentes tóxicos (JIANG *et al.*, 2002).

Grânulos aeróbios possuem um importante papel na adsorção de substâncias tóxicas, devido à grande área superficial, porosidade e boa capacidade de sedimentação (ADAV *et al.*, 2009). XU e LIU (2008) propuseram que a troca iônica, a ligação aos EPS's e a precipitação química, são os principais contribuintes para a bio-adsorção de Cd, Cu e Ni pelos grânulos aeróbios.

Os biogrânulos podem suportar condições ambientais desfavoráveis, tais como compostos tóxicos e variações de pH, já que sua estrutura compacta limitaria a transferência de massa e protegeria a atividade de bactérias no interior do biogrânulo (LIU *et al.*, 2005).

A Figura 5 mostra um exemplo de uma foto com grânulos aeróbios.



Figura 5 - Imagem fotográfica de grânulos aeróbicos.

3.3.4.1. O processo de granulação aeróbia e a estabilidade dos grânulos

Em estudos desenvolvidos por Beun *et al.* (1999) em sistemas de reatores seqüenciais em batelada (RSB), para compreensão do processo de granulação do lodo aeróbio e baseando-se em observações microscópicas do lodo, constatou-se a presença de uma matriz de imobilização em que houve o crescimento bacteriano fora de colônias, sendo que esta matriz de crescimento microbiano consistia em um aglomerado de fungos filamentosos que prevalecem no início da operação do sistema. Após um tempo observa-se que estes aglomerados de fungos se desfazem devido à lise que ocorre em seu interior. Este fato permite que as novas colônias agora já consolidadas possuam maiores densidades e apresentem maiores velocidades de sedimentação. Isto descreveria a ocorrência de um processo de granulação em um reator seqüencial em batelada.

A característica típica do RSB é o seu funcionamento cíclico, que consiste de enchimento, aeração, decantação e fases de descarte. A concentração de substrato durante a fase de aeração varia de alta para baixa. Um longo período de ausência de alimento (jejum) foi identificado durante a fase de aeração no RSB granulado aeróbio, levando a hipótese de que o jejum foi um fator importante para induzir mudanças nas características da superfície celular e aumentar a aderência entre as células. (TAY *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2006).

Um importante fator para a formação de grânulos é a submissão da biomassa a repetitivas pressões de seleção, para que as partículas dispersas sejam levadas para fora do sistema, enquanto que as partículas mais densas fiquem retidas (BEUN *et al.*, 1999).

De acordo com Wang *et al.* (2004), o aumento da pressão seletiva, criado por meio da diminuição do tempo de sedimentação e aumento da taxa de carga orgânica, em um reator de batelada seqüencial, aumenta a formação de lodo granular aeróbio, que segue três etapas consecutivas: aclimatação, granulação e maturação.

A combinação de um curto tempo de sedimentação inicial com ciclos curtos e sobre fortes pressões hidráulicas de seleção, aumenta a formação de grânulos aeróbios (LIU *et al.*, 2007).

Um tempo de ciclo curto (baixo tempo de retenção hidráulica – TRH) leva a uma alta pressão de seleção, porque o baixo TRH suprime um crescimento de biomassa suspensa, que é levada para fora do sistema com maior frequência (TYHUIS *et al.*, 1994). Segundo Morgenroth *et al.* (1997) baixo TRH favorece a granulação e ainda, como proposto por Beun *et al.* (1999) melhora a estabilidade da biomassa granular. Um baixo TRH e uma força de cisalhamento alta, também foram indicados por Beun *et al.* (1999) como condições favoráveis à granulação.

Em estudos conduzidos por Li *et al.* (2006) o lodo granular aeróbio demonstrou alta bioatividade. Esta alta bioatividade levou ao rápido esgotamento das fontes de carbono no reator, o que indicou que uma longa fase de ausência de alimento reinou durante o período de aeração do SBR. A eficiência de remoção de carbono orgânico total (COT) alcançada durante este estudo foi de até 93% e, segundo os autores, elevadas taxas de COT podem ser aplicadas ao lodo granular aeróbio.

Liu e Tay (2008) ao investigarem a influência do tempo de jejum, em um reator em batelada seqüencial, na formação e estabilidade dos grânulos, observaram que um menor tempo de jejum acelera a granulação, mas estes grânulos formados sob estas condições não se apresentaram muito estáveis. Já em reatores em que a microbiota está submetida a maiores tempos de jejum, os grânulos se apresentaram mais estáveis, possibilitando longos períodos de operação do sistema. Portanto, um tempo razoável de jejum deve ser aplicado para manter a estabilidade dos grânulos a longo prazo.

Liu *et al.* (2007) concluíram que o período de jejum ao qual a biomassa pode estar submetida em um reator de batelada seqüencial não é pré-requisito para a granulação, visto que em operações sem a observação deste fenômeno houve a granulação aeróbia. Contrariando a hipótese de que a agregação em grânulos seria uma forma de superar o período de ausência de alimento. Porém, o período de

jejum constitui um importante papel na estabilidade de grânulos aeróbios, sendo que um período de jejum prolongado possui efeitos positivos sobre a estabilidade dos grânulos.

A baixa estabilidade dos grânulos aeróbios, em muitos casos, é o que limita sua utilização na prática. Para melhorar a estabilidade dos grânulos, a seleção de bactérias de crescimento lento, tais como bactérias nitrificantes e removedoras de fósforo tem sido proposta (LIU *et al.*, 2004). No entanto, este método está intimamente relacionado com as características do efluente, que deve conter altas concentrações de nitrogênio e fósforo para que haja o crescimento em larga escala destas bactérias de crescimento lento.

O uso de agentes quelantes sintéticos, como o ácido nitrilotriacético – NTA aumenta a granulação microbiana aeróbia. A presença de compostos de degradação lenta torna o crescimento bacteriano mais lento. Então, uma fonte de carbono relativamente difícil de degradar (agente quelante), poderia promover uma melhor granulação do lodo aeróbio devido à seleção de bactérias de crescimento lento, resultando na formação de grânulos estáveis (YARLAGADDA *et al.*, 2008).

A estabilidade dos grânulos aeróbios também determina a viabilidade de utilização destes sistemas a longo prazo (LIU *et al.*, 2004). Mc Swain *et al.* (2005) demonstraram que algumas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) possuem um importante papel na estabilidade dos grânulos aeróbios.

Devido a uma serie de condições estressantes de inoculação, a produção e distribuição dos EPS nos grânulos aeróbios são bastante diferentes dos flocos biológicos convencionais (Mc SWAIN *et al.*, 2005).

3.3.4.2. Biorreator a membrana com lodo granular aeróbio

A substituição do lodo floculado pelo lodo granular em um sistema de Biorreatores a Membrana (BRM) para o controle da queda do fluxo durante a operação, foi proposto por Li *et al.* (2005). A utilização desta nova configuração permitiu o controle do fluxo com a diminuição de incrustações a membrana e mantendo o bom desempenho para o tratamento como o sistema convencional. O BRM foi alimentado com água residuária sintética composta por glicose, proteínas e micronutrientes, com módulo de membrana submersa de microfiltração. No sistema de Biorreator a Membrana com Lodo Granular Aeróbio (BRMGA) não foi observado uma queda acentuada no fluxo ao inicio da operação do sistema, o que é uma característica dos sistemas de BRM, sendo que o fluxo foi diminuindo gradualmente

ao longo do tempo de operação. Por outro lado, o processo com lodo flocular apresentou uma redução no fluxo de 45,6% em relação ao valor inicial após oito dias de operação. A permeabilidade no BRMGA apresentou uma queda gradual e ao final do estudo apresentou um valor 50% maior se comparada à permeabilidade do sistema BRM com lodo flocular. De acordo com os autores, esta diferente característica quanto ao entupimento da membrana está principalmente relacionada com as características dos diferentes tipos de lodo. O lodo floculado do sistema convencional é o responsável pela queda quase que imediata do fluxo ao se iniciar a operação do BRM, formando uma torta na superfície da membrana e causando o entupimento parcial dos poros, o que diminui consideravelmente o fluxo. Já o lodo granular do novo BRM não apresentou tal comportamento e a queda do fluxo observada estaria relacionada principalmente aos solutos e colóides que promovem um entupimento interno dos poros da membrana, não sendo observada a formação de torta espessa e a torta formada neste sistema seria devido a uma pequena quantidade de lodo floculado que se tem entre o lodo granular predominante no sistema. Por isso a limpeza física neste novo sistema não possuiu a mesma eficiência se comparada à apresentada no BRM, mas por outro lado a limpeza química apresentou alta eficiência, chegando a recuperar o fluxo em 100%. Isto está de acordo com as diferenças nas naturezas das incrustações observadas nas duas configurações. Então a principal forma de incrustação da membrana, a causada pelo lodo, pode ser eliminada pela substituição do lodo floculado pelo granular, sendo que agora a permeabilidade ao longo da operação estaria condicionada apenas aos solutos e colóides presentes no meio.

O lodo granular apresenta melhor sedimentabilidade e filtrabilidade em relação ao lodo floculado por apresentar maior tamanho. Tal comportamento foi apresentado pelo lodo aeróbio granular em reatores em batelada para o tratamento de água sintética com acetato de sódio como fonte de carbono. Estas características podem levar à uma diminuição significativa das incrustações da membrana no sistema de BRM. Este comportamento foi atribuído à baixa compressibilidade de sua biomassa (TAY *et al.*, 2007).

Um novo sistema de Biorreatores a Membrana com lodo Granular Aeróbio (BRMGA) foi investigado por WANG *et al.* (2008) quanto a sua capacidade de remoção de matéria orgânica e capacidade de promover a nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS). O BRMGA apresentou uma eficiência de

remoção de carbono orgânico total (COT) de 84,7-91,9%; de 85,4-99,7% para a remoção de nitrogênio amoniacal e de 41,7-78,4% de nitrogênio total. A explicação para o processo de NDS que ocorre no BRMGA seria devido à formação de uma zona anóxica no interior do grânulo aeróbio devido à limitação de transferência de oxigênio no grânulo. Assim, verificou-se que quanto maior o tamanho dos grânulos, melhor é a capacidade de promoção da desnitrificação, devido ao aumento da zona anóxica que ocorre no interior do grânulo.

Os desempenhos de dois reatores, um operando em sistema de BRMGA e outro em um sistema convencional de Biorreator a Membrana Submersa (BRMS) foram comparadas por Tay *et al.* (2007), sendo que o reator operado em sistema de BRMGA apresentou vantagens como: lodo com melhor filtrabilidade; a queda de permeabilidade da membrana foi bem menor do que no BRMS (21 vezes menor); e o incremento de pressão transmembrana (PTM) foi insignificante, enquanto que no BRMS limpezas físicas regulares eram necessárias.

4. METODOLOGIA

4.1. Efluentes

Os efluentes foram coletados de uma fábrica de papel capa e miolo, destinados para produção de embalagens, 100% reciclados, produzidos a partir de aparas de papel/papelão recicláveis. A fábrica produz cerca de 5500 toneladas de papel por mês e consome, em média, de 6,0 a 10,0 metros cúbicos de água por tonelada de papel produzido. As amostras foram coletadas semanalmente e encaminhadas à Universidade Federal de Viçosa, onde foram armazenadas sob resfriamento em câmara fria a 5°C.

4.2. Lodo Biológico

O lodo biológico foi coletado em uma estação de tratamento por lodos ativados de uma fábrica de polpa celulósica. A coleta foi feita na linha de recirculação de lodo biológico e enviada à Universidade Federal de Viçosa, onde foi imediatamente adicionado ao reator para início do experimento.

4.3. Tratamento biológico

O tratamento biológico foi realizado em reatores de bancada com alimentação intermitente. Foram montados dois reatores em paralelo sendo um reator operado com parâmetros típicos de um processo de lodos ativados convencional para formação de lodo flocular e outro com parâmetros típicos para a formação de lodo aeróbio granular.

Cada sistema possui um tanque de aeração com volume útil de 6 litros, sendo que a cada ciclo foram removidos 3 litros do efluente tratado e o volume completado com novo efluente. Os reatores foram mantidos à temperatura ambiente. Para suprir a necessidade de oxigênio da biomassa foi injetado ar nos reatores através de um sistema constituído de sopradores e difusores de bolha fina. Cada reator foi operado com ciclos de operação de 12 horas. Pouco antes de completar as 12 horas de reação, a aeração era interrompida permitindo a sedimentação do lodo biológico. No reator de lodo flocular o período de decantação foi de 1 hora durante todo o experimento. Já no reator de lodo aeróbio granular iniciou-se um período de decantação de 20 minutos decrescendo até 1 minuto de forma gradativa, conforme mostra Tabela 1.

Em seguida à decantação, o efluente tratado era removido e novo efluente adicionado aos reatores (tanques de aeração). A aeração era, então, reiniciada dando início a um novo ciclo. Dessa forma, como o volume útil do reator era de 6 litros e a cada ciclo eram removidos 3 litros de efluente tratado, a razão de troca volumétrica (volume de efluente/volume total de operação) era de 0,5 resultando num tempo de detenção hidráulica (TDH) igual a 24 horas. Em ambos reatores, o oxigênio dissolvido (OD) foi mantido sempre acima de 2 mg L⁻¹, o pH do efluente foi ajustado a 6,5 - 7,5, antes de sua adição aos reatores, e os nutrientes nitrogênio e fósforo adicionados na proporção de DBO:N:P igual a 100:5:1. A concentração de biomassa nos reatores foi estimada pelo valor de sólidos em suspensão voláteis (SSV), de acordo com o método APHA (1998). Diariamente, foram feitas as análises de DQO dos efluentes tratados, sólidos do tanque de aeração e observações microscópicas do lodo biológico. Semanalmente, foi realizada a análise de DBO₅ dos efluentes tratados pelo método Winkler modificado.

O parâmetro de processo utilizado para o controle do reator com lodo flocular foi a manutenção dos SST próximo a 3500 mg.L⁻¹.

Para o reator com lodo granular não houve descarte intencional de lodo, embora tenha havido, sobretudo no início de operação do sistema uma perda de sólidos não intencional no efluente tratado, devido à redução gradativa do tempo de decantação. Após cada redução do tempo de decantação neste reator, esperava-se um período suficiente para a recuperação da biomassa a um valor de SST de pelo menos 2000 mg.L⁻¹ para, então, promover uma nova redução do tempo de decantação, até atingir o valor de decantação de apenas 1 minuto que ocorreu somente no quinquagésimo primeiro dia de operação. A partir daí, o tempo de decantação do lodo granular foi mantido em 1 minuto.

Tabela 1 - Redução do tempo de decantação do reator de lodo aeróbio granular ao longo do tempo

Dia	Tempo decantação (minutos)	Observação
0	20	Lodo floculento.
7	10	Lodo floculento.
10	8	Lodo floculento.
33	6	Aparecimento dos primeiros grânulos.
38	4	Aumento gradativo de grânulos.
43	2	Maior parte do lodo composta por grânulos.
51	1	Lodo granular.

As durações de cada etapa de operação dos reatores, após a formação do lodo granular, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Duração dos períodos de operação dos reatores após a formação do lodo granular

Etapa	Tempo (minutos)	
	Granular	Floculento
Alimentação	2	2
Reação	658	658
Sedimentação	1	58
Remoção Efl. Tratado	2	2

Os dois reatores foram operados com etapas de operação idênticas, variando apenas o período de sedimentação, uma vez que um reduzido tempo de sedimentação possibilita a seleção dos grânulos e favorece a produção do lodo granular.

No reator granular, após a remoção do efluente tratado era adicionado novo afluente e o reator era deixado em repouso até o fim do ciclo de decantação do reator com lodo flocular. O sistema de aeração dos dois sistemas era religado ao mesmo momento para garantir que a etapa de reação de ambos os reatores possuíssem a mesma duração.

As velocidades de sedimentação dos lodos biológicos foram determinadas pela distância entre o nível da água e válvula de descarte de efluente tratado, dividida pelo tempo de sedimentação de cada um dos lodos.

4.4. Membranas de microfiltração

Foram utilizados módulos de membranas ocas submersas de microfiltração, unidade de teste de bancada, fabricado e gentilmente cedidos pela PAM-Membranas Seletivas, com diâmetro nominal médio do poro de 0,2 μm e área superficial nominal da membrana de 0,5 m^2 .

4.5. Observações microscópicas

As observações microscópicas foram realizadas, diariamente, com amostras do lodo fresco, utilizando um microscópio ótico com contraste de fase, da marca LEICA, modelo DMLS. Foi acompanhado o desenvolvimento dos grânulos e

observado as características morfológicas do lodo biológico durante o processo de granulação. Foi utilizada uma máquina digital, da marca Nikon, modelo COOLPIX 4500 para obtenção de fotomicrografias das características morfológicas dos lodos biológicos.

4.6. Caracterização físico-química

Os efluentes foram caracterizados antes e após os tratamentos propostos quanto aos valores de DQO, DBO, pH e sólidos por métodos padronizados (APHA, 1998). A DQO foi determinada pelo método colorimétrico, após refluxo fechado (APHA método 5220D), a análise de pH foi realizada de acordo com APHA método 4500, os sólidos foram quantificados por gravimetria de acordo com APHA método 2540 e a DBO pelo método Winkler modificado (APHA método 5210B).

As análises foram realizadas no Laboratório de Celulose e Papel do Departamento de Engenharia Florestal da UFV.

4.7. Teste para determinação do fluxo crítico dos lodos biológicos

O sistema foi composto de um tanque de armazenamento com volume útil de 5 litros, com um sistema de injeção de ar comprimido ao fundo. A sucção do efluente tratado foi realizada por uma bomba modelo CVE – 8701 – F – ESP série 9035-9 e a pressão medida por um manovacuômetro modelo PAM série 666866, gentilmente cedidos por PAM-Membranas Seletivas. Em intervalo de tempos regulares, foi utilizada uma proveta para a medição da vazão por meio volume filtrado durante 30 segundos. A diferença de pressão de sucção foi ajustada por meio do controle da rotação da bomba hidráulica e/ou abertura de um registro do tipo agulha. Um esquema do sistema utilizado é apresentado na Figura 6.

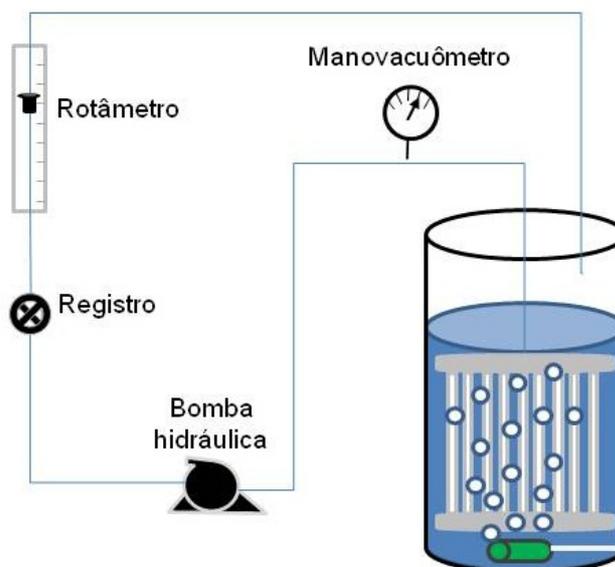


Figura 6 - Esquema do sistema de microfiltração utilizado para os testes de determinação de fluxo crítico.

Antes de determinar o fluxo crítico, foi utilizada água destilada para determinar a resistência da membrana limpa. Em seguida, adicionou-se ao sistema um dos lodos biológicos e fixou-se um valor de pressão, medindo o fluxo através da membrana durante 15 minutos. Posteriormente, aumentou-se a pressão e mediu-se novamente o fluxo por mais 15 minutos. Foram utilizados diversos valores de pressão, mantidos constantes por 15 minutos. O fluxo crítico corresponde ao valor abaixo do qual o sistema não apresenta variação no fluxo, embora a pressão seja mantida constante. Dessa forma, a variação do fluxo ao longo do tempo, para um mesmo valor de pressão, indica que o fluxo alcançado é maior do que o fluxo crítico. Para determinar o valor do fluxo crítico, adotou-se a média entre o valor do fluxo inicial na pressão na qual foi observada queda do fluxo ao longo do tempo e o valor do fluxo na pressão imediatamente inferior.

Ao final do teste, foi feita a retrolavagem com água de torneira e água destilada para limpeza da membrana. Antes de iniciar o procedimento com o segundo lodo, foi determinada, novamente, a resistência da membrana com água destilada, para verificar se a membrana estava limpa.

Foi realizada a análise de sólidos suspensos totais dos lodos biológicos e a concentração de SST foi ajustada por meio do descarte do sobrenadante do lodo mais diluído.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Formação do lodo granular

Iniciou-se a operação do reator biológico utilizando-se lodo biológico proveniente de uma estação de tratamento por lodos ativados de uma indústria de polpa celulósica kraft branqueada. Inicialmente o lodo apresentava uma concentração de SST igual a 2000 mg de SST.L⁻¹. Foi adotado um tempo de decantação inicial de 20 minutos. Como esse tempo de decantação observou-se uma grande perda de sólidos juntamente com a remoção do efluente tratado. Evidentemente a velocidade média de decantação do lodo proveniente da fábrica era baixa, ou seja, apresentava um alto IVL igual a 204 mL.g⁻¹. Conseqüentemente, houve uma redução na concentração de sólidos suspensos para valores próximos a 600 mg.L⁻¹ durante os primeiros dias de operação.

No entanto, com o passar do tempo, mantendo-se o tempo de decantação de 20 minutos, observou-se um aumento da concentração de sólidos suspensos totais, uma vez que se iniciou a seleção biológica de flocos que possuíam maior velocidade de sedimentação. Adotou-se como uma referencia, um valor de concentração de SST no reator igual a 2000 mg.L⁻¹ para reduzir o tempo de decantação pela metade, ou seja, para 10 minutos. Mais uma vez, como se esperava, houve uma nova alta perda de lodo e redução da concentração de SST. Antes de reduzir o tempo de decantação para 8 minutos, esperou-se novamente, um aumento da concentração de SST do lodo no reator para 2000 mg.L⁻¹. Tal procedimento foi repetido para redução do tempo de decantação para os valores de 6, 4, 2 e 1 minuto.

A Tabela.3 apresenta o número de ciclos que foram necessários para a recuperação do lodo, ou seja, alcançar concentrações em torno de 2000 mg L⁻¹, para cada etapa de redução do tempo de decantação.

Tabela 3 - Número de ciclos necessários para recuperação do lodo do reator granular após cada redução do tempo de sedimentação

Tempo decantação (minutos)	Ciclos
20	-
10	14
8	6
6	46
4	10

A Figura 7 apresenta fotomicrografias do lodo durante o período de redução do tempo de decantação: (A) 20 minutos, lodo flocular (partida do reator); (B) 10 minutos; (C) 8 minutos; (D) 6 minutos, observação dos primeiros grânulos; (E) 4 minutos; (F) 2 minutos, maior parte do lodo já era constituída por grânulos aeróbios; (G) 1 minuto, lodo granular.

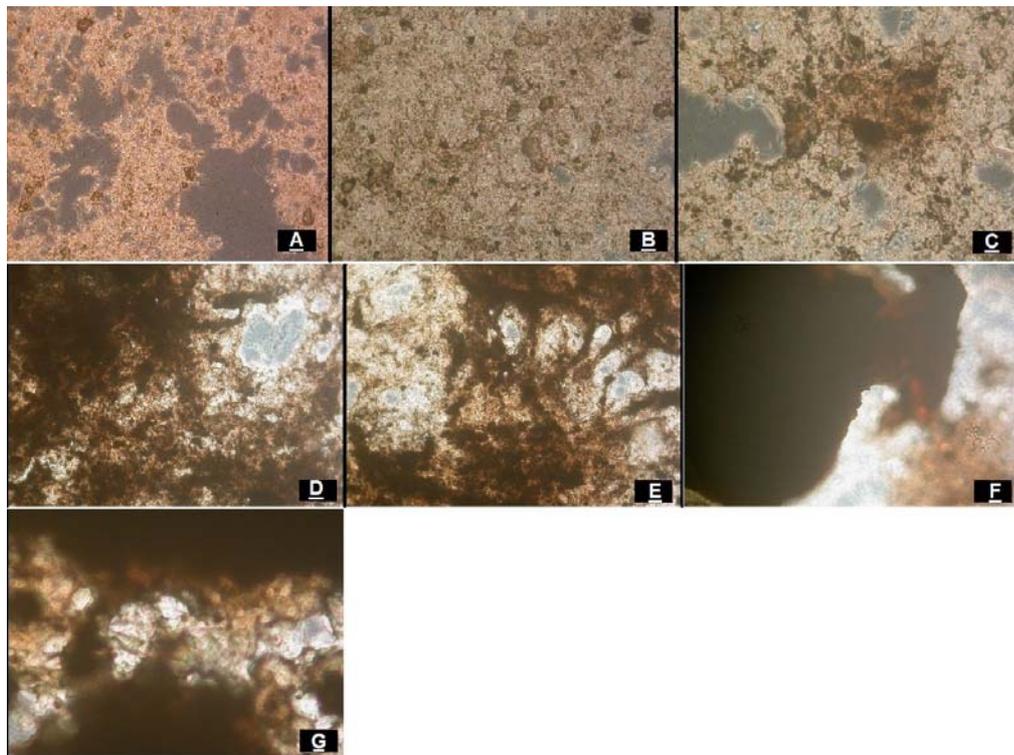


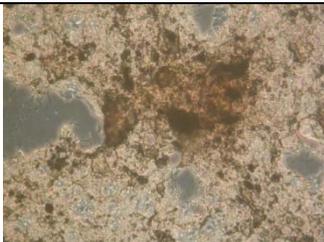
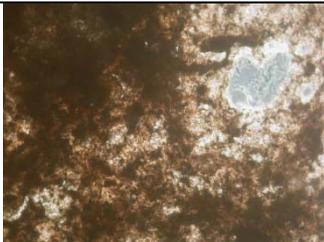
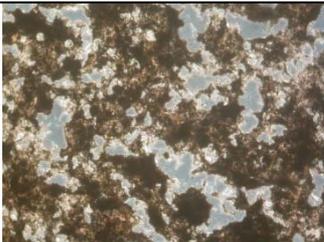
Figura 7 - Fotomicrografias do lodo do reator granular. (A), (B) e (C) lodo floculento; (D) e (E) início do aparecimento de grânulos; (F) maior parte do lodo constituída por grânulos; (G) lodo granular. Aumento de 100 vezes.

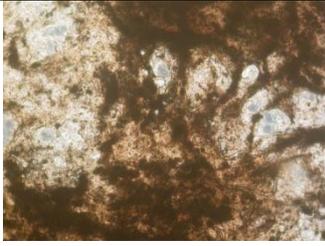
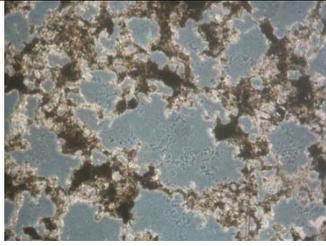
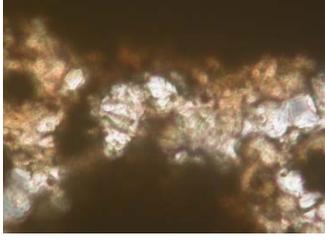
É visível a alteração morfológica do lodo. Inicialmente observou um lodo flocular, com flocos abertos, com presença de poucas bactérias filamentosas. No entanto, desde o início do tratamento, houve a predominância de flocos grandes, os quais foram aumentando ao longo do tempo, culminando na formação de grânulos. Além disso, não se observou filamentos se projetando para o exterior do grânulo, uma vez que, segundo Jenkins *et. al.* (2003) a abundância de bactérias filamentosas

ocasiona problemas de intumescimento filamentoso, prejudicando a floculação e a decantabilidade do lodo.

A Tabela 4 apresenta fotomicrografias dos lodos floculento e granular durante a redução do tempo de sedimentação para formação dos grânulos. Como pode ser observado, o lodo floculento não apresentou grande variação em sua morfologia, enquanto no lodo granular houve um aumento no tamanho dos flocos com a redução do tempo de sedimentação até haver o predomínio de grânulos após 51 dias de operação.

Tabela 4 - Fotomicrografias dos lodos biológicos ao longo do período de redução do tempo de sedimentação do lodo granular

Dia	Tempo de sedimentação reator granular	Granular	Floculento
0	20 minutos		
7	10 minutos		
10	8 minutos		
33	6 minutos		

38	4 minutos		
43	2 minutos		
51	1 minuto		

5.2. Temperatura e pH

O pH do afluente e dos efluentes dos reatores biológicos foram monitorados diariamente. Nos casos onde o valor do pH afluente encontrava-se fora de uma faixa de valores em torno da neutralidade (entre 6,5 a 7,5) foi feita a correção antes da adição ao sistema. O valor médio do pH afluente apresentado na Tabela 5 foi baseado nos valores de caracterização do mesmo, antes de qualquer adição de ácido ou base, quando necessário.

A Figura 8 apresenta os valores diários de pH dos efluentes dos tratamentos biológicos. Como pode-se observar, houve uma tendência de aumento do pH ao longo do tratamento, obtendo-se, na maior parte do experimento valores acima de 7,0. Além disso, não houve grande diferença entre os valores obtidos para os dois efluentes.

Yang *et al.* (2008) citados por Adav *et al.* (2009) conduziram experimentos utilizando dois RSB alimentados com água residuária sintética com glicose como fonte de carbono e observaram que baixa alcalinidade e pH tende a formar grânulos com predominância de fungos. Por outro lado, alta alcalinidade e pH implicou em grânulos predominantemente formados por bactérias, com formação muito mais

lenta do que os formados por fungos. Entretanto, os grânulos formados por fungos são mais frágeis do que os formados por bactérias.

Lemaire *et al.* (2008a) citados por Adav *et al.* (2009) afirmam que os complexos minerais associados à matriz de EPS dos grânulos são dissolvidos em pH baixos e prejudicam os agregados.

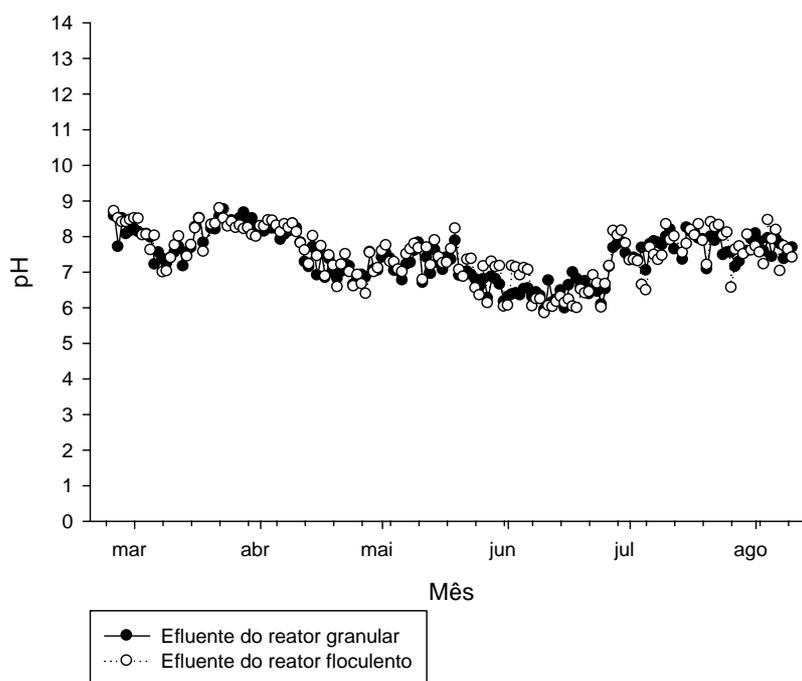


Figura 8 - Valores diários de pH dos efluentes dos reatores biológicos.

No final do mês de maio e durante grande parte do mês de junho foi observado valores de pH inferiores a 7,0 para o efluente tratado de ambos os reatores. No entanto, não foi observado redução na eficiência de remoção de matéria orgânica ou perda de sólidos de nenhum dos dois sistemas.

Os reatores foram operados a temperatura ambiente e o monitoramento da temperatura dos tratamentos biológicos foi feita através da análise dos efluentes tratados. Os valores diários obtidos para os efluentes são apresentados na Figura 9.

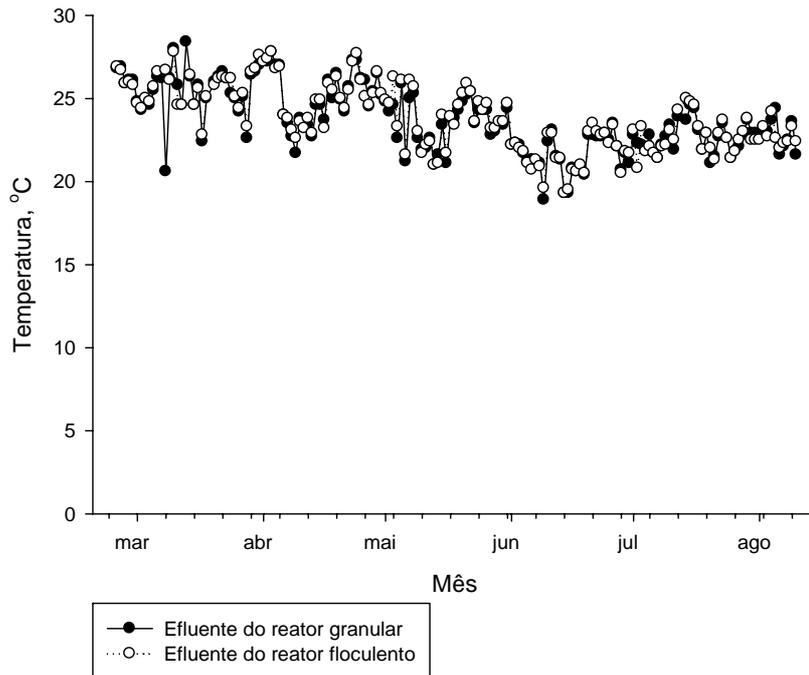


Figura 9 - Valores diários de temperatura dos efluentes dos tratamentos biológicos.

De acordo com a Figura 9, não foram observadas diferenças significativas entre as temperaturas dos efluentes dos reatores.

O metabolismo microbiano é altamente dependente da temperatura do meio e tende a ser mais elevado em temperaturas mais altas. No entanto, o tratamento aeróbio granular apresenta elevada eficiência de remoção de matéria em temperatura ambiente e o processo de formação dos grânulos é favorecido em condições de crescimento lento da biomassa (Tay, 2004). Por isso, não foi realizado o aquecimento dos biorreatores visando o favorecimento da produção de biogrânulos.

O efeito da temperatura na formação dos grânulos foi avaliado por Kreuk *et al.* (2005) em um reator seqüencial por batelada alimentado com água sintética e ciclos de três horas de duração. O início do processo a 8 °C resultou em grânulos irregulares que desagregavam assim que a aeração era interrompida, causando uma grande perda de biomassa com o efluente tratado e uma operação instável. A presença de DQO durante a fase aeróbia é considerada a principal razão para a instabilidade dos grânulos. Com baixa concentração de biomassa no reator, o consumo de DQO é limitado durante o ciclo de operação do reator resultando em mais substrato disponível para “competir” pelo aceptor de elétrons (oxigênio) durante o período aeróbio. Este fato é crucial na formação de grânulos aeróbios estáveis.

Por outro lado, iniciando o processo a 20 °C e reduzindo a temperatura para 15 °C e 8°C não foi observado nenhum efeito na estabilidade dos grânulos e a biomassa pôde ser facilmente retida no sistema. Devido à redução da atividade biológica nas camadas externas do grânulo à baixas temperaturas, a penetração do oxigênio nas camadas mais internas aumentou, o que resultou num grande volume de biomassa aeróbia, compensando a redução da atividade individual dos microrganismos.

5.3. Eficiência de Remoção de Matéria Orgânica

A Tabela 5 apresenta os parâmetros analisados para a caracterização do afluente e efluente dos reatores biológicos. Pode-se observar a elevada eficiência na remoção de matéria orgânica (DQO e DBO) em ambos os sistemas.

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrões encontrados para os parâmetros analisados no afluente e efluentes dos reatores

Parâmetro	Unidade	Afluente	Ef. Granular	Ef. Convencional
pH	-	6,40 ± 0,70 ^a	7,41 ± 0,66 ^b	7,46 ± 0,73 ^c
Temperatura	°C	-	23,7 ± 2,0 ^b	23,8 ± 1,9 ^c
SST	mg L ⁻¹	566 ± 536 ^d	316 ± 306 ^e	267 ± 231 ^e
SSV	mg L ⁻¹	405 ± 391 ^f	209 ± 253 ^e	185 ± 201 ^e
DQO _{sol}	mg L ⁻¹	780 ± 390 ^g	76 ± 44 ^g	61 ± 49 ⁱ
Efic. remoção	%		90 ± 7 ^h	92 ± 6 ^h
DBO _{sol}	mg L ⁻¹	488 ± 268 ^j	13 ± 7 ^j	12 ± 6 ^j
Efic. remoção	%		97 ± 2 ^j	97 ± 2 ^j

^a média ± desvio padrão, n = 169

^b média ± desvio padrão, n = 166

^c média ± desvio padrão, n = 164

^d média ± desvio padrão, n = 75

^e média ± desvio padrão, n = 28

^f média ± desvio padrão, n = 74

^g média ± desvio padrão, n = 59

^h média ± desvio padrão, n = 57

ⁱ média ± desvio padrão, n = 58

^j média ± desvio padrão, n = 23

Como o afluente foi coletado diretamente da indústria, a qual apresenta grande variedade no processo e na qualidade da matéria-prima, podem-se observar grandes variações nos parâmetros físico-químicos no efluente industrial antes do tratamento biológico, o que implicou em variações no efluente tratado de ambos os reatores. Estas variações podem ser confirmadas pelos elevados valores dos desvios padrões das análises.

No entanto, não houve variação significativa entre o pH dos reatores. A média dos valores de SST e SSV do efluente tratado no reator granular foram similares aos valores do efluente tratado no reator floculento convencional. Salienta-se que os

dados referentes aos SST e SSV nos efluentes do reator granular foram obtidos somente após a estabilização do processo com tempo de decantação de 1 minuto.

Pode-se observar que a remoção da matéria orgânica solúvel mensurada pela DBO e DQO solúveis foi também similar, demonstrando a alta capacidade de remoção destes compostos pelo lodo granular. Os valores de DQO_{sol} encontrados ao longo do projeto para o afluente aos reatores e para os efluentes tratados por cada reator biológico são apresentados na Figura 10.

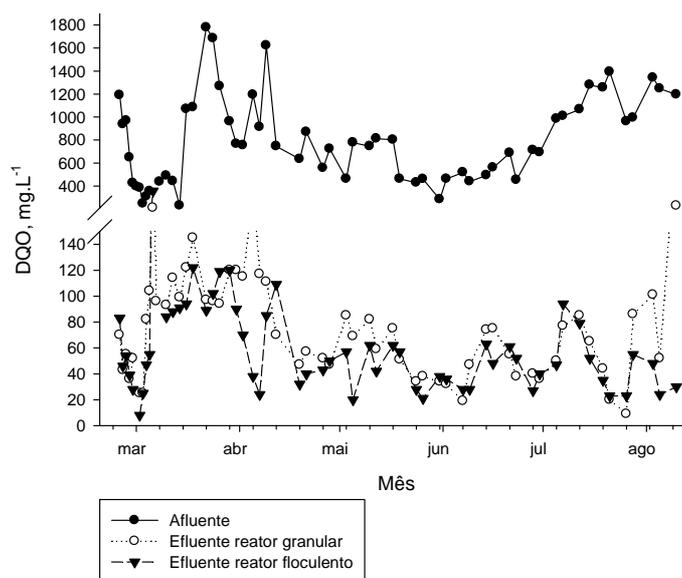


Figura 10 - Valores de DQO afluente e efluente aos reatores.

A Figura 10 mostra que houve uma grande variação nos valores de DQO do afluente devido a diferenças do efluente industrial de uma coleta para outra. Os valores de DQO efluente tratado dos reatores acompanham a tendência da DQO afluente, principalmente para o reator convencional, apresentando aumentos em dias de maior DQO afluente e redução com a redução desta. Por esse motivo, a eficiência de remoção desse parâmetro (Figura 11) não apresentou grande variação ao longo do tratamento em nenhum dos reatores, atingindo valores superiores a 80% na maior parte do tempo. A variação maior ocorreu no início do tratamento em decorrência do período de estabilização do sistema.

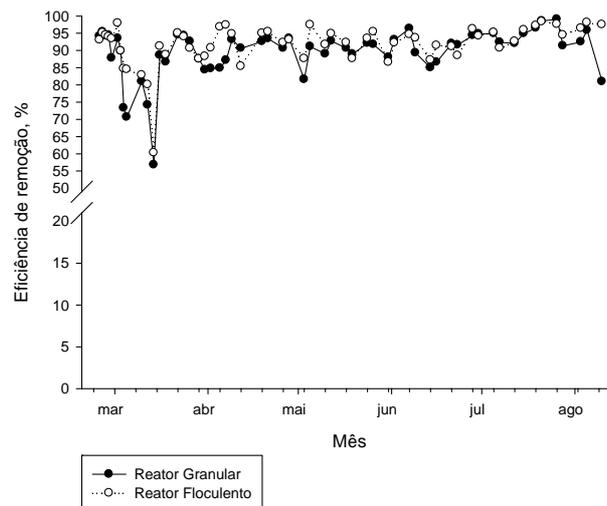


Figura 11 - Eficiências de remoção de DQO.

As Figuras 12 e 13 apresentam as concentrações de DBO_5 solúveis na entrada e saídas dos reatores e a eficiência de remoção, respectivamente. Pode-se observar que os valores das concentrações nos efluentes tratados foram sempre inferiores a 30 mg L^{-1} durante todo o período de tratamento, tanto para o reator floculento quanto para o reator granular. Este fato confirmou a elevada eficiência de remoção de DBO em ambos os reatores. As eficiências obtidas foram superiores a 91%, na maioria das amostragens, para ambos os reatores granular e flocular.

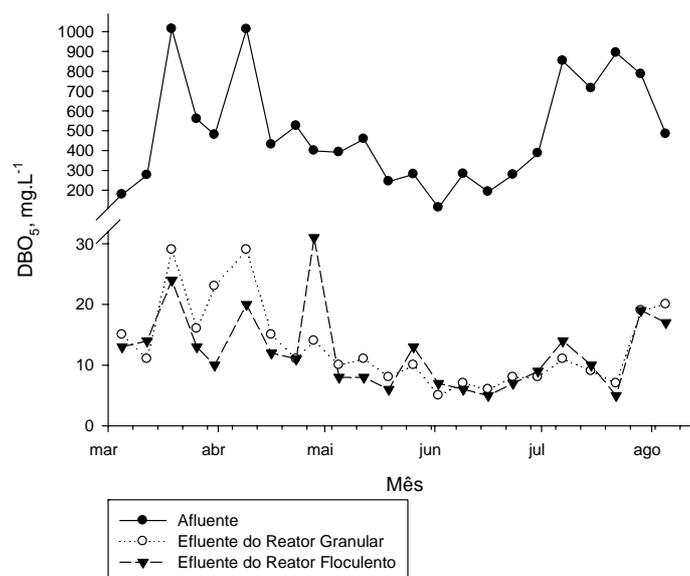


Figura 12 - DBO afluente e efluente aos reatores.

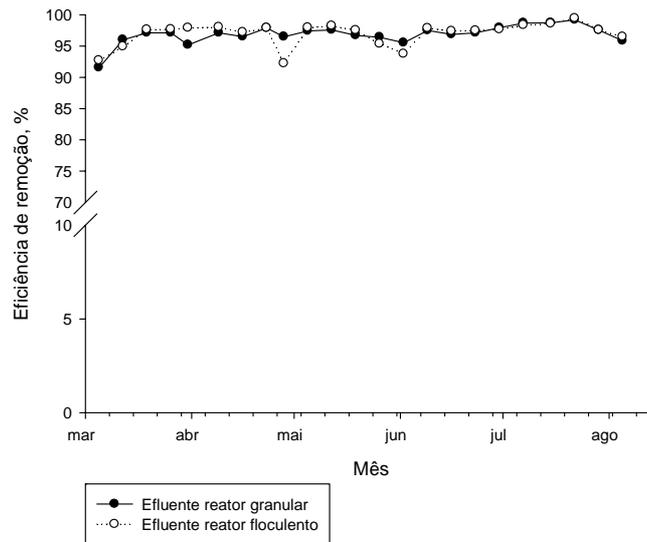


Figura 13 - Eficiências de remoção de DBO.

5.4. Morfologia dos Grânulos Aeróbios

A Figura 14 apresenta fotografias do lodo aeróbio granular. Os grânulos são bem maiores do que os flocos comumente encontrados nos sistemas aeróbios convencionais e, ao contrário destes, os grânulos podem ser vistos sem o auxílio da microscopia.

Por serem maiores e mais compactos do que o flocos, os grânulos apresentam maior densidade e, conseqüentemente, maior velocidade de sedimentação. As velocidades de sedimentação apresentadas foram de 10,8 e 0,18 m.h⁻¹ para os grânulos e flocos, respectivamente. Isto implica que um processo com lodo granular necessita de uma menor área para a clarificação em decantadores secundários (uma redução da área do decantador de cerca de sessenta vezes, para uma mesma vazão).



Figura 14 - Grânulos aeróbios obtidos a partir do tratamento de efluente de máquina de papel.

5.5. Fluxo crítico

5.5.1. Concentração de sólidos suspensos totais dos lodos biológicos igual a 2700 mg.L⁻¹.

A Figura 15 apresenta os valores de fluxo e pressão obtidos durante o teste para medição do fluxo crítico do lodo aeróbio granular.

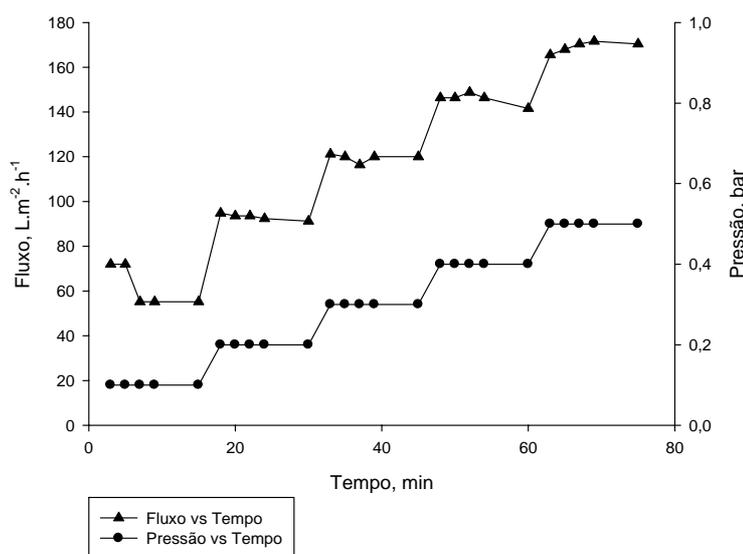


Figura 15 – Fluxo, ao longo do tempo, do sistema com lodo aeróbio granular para diferentes valores de pressão (SST = 2700 mg.L⁻¹).

Como se pode observar na Figura 15, não foi possível aumentar a pressão de forma a obter um fluxo maior do que o fluxo crítico, uma vez que não se obteve uma redução significativa do fluxo ao longo do tempo para nenhum dos valores de pressão fixados. Embora o fluxo não tenha reduzido ao longo do tempo para a diferença de pressão de 0,5 bar, não foi possível aumentar a pressão do sistema.

De acordo com os dados apresentados na Figura 16, pode-se observar que os diversos fluxos medidos ao longo do tempo não apresentaram grande variação, para um mesmo valor de pressão. Além disso, o comportamento do fluxo médio durante os 15 minutos de filtração apresentou comportamento linear com a pressão adotada. Na Figura 16 também são apresentados os fluxos medidos durante a filtração com água destilada, a qual foi realizada anteriormente a cada um dos testes para verificar se a membrana de microfiltração estava limpa.

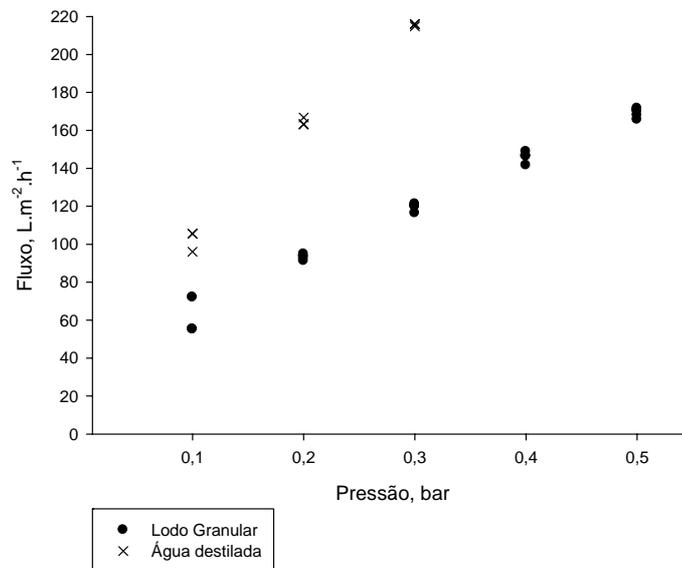


Figura 16 - Fluxos medidos durante a filtração do sistema com lodo aeróbio granular (SST = 2700 mg.L⁻¹).

Os valores de fluxo e pressão obtidos durante o teste para medição do fluxo crítico do lodo floculento são apresentados na Figura 17.

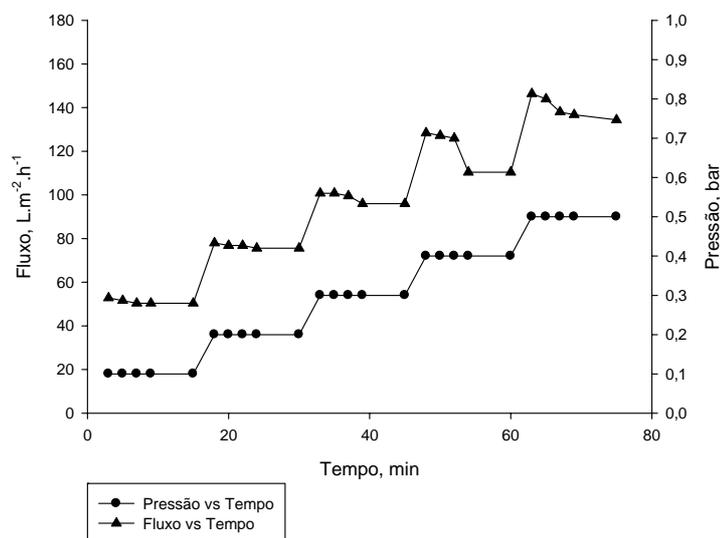


Figura 17 - Fluxo, ao longo do tempo, do sistema com lodo floculento para diferentes valores de pressão (SST = 2700 mg.L⁻¹).

De acordo com os resultados apresentados, o fluxo apresentou uma grande redução no final do período de filtração para a pressão de 0,4 bar e também reduziu com o tempo quando a pressão foi mantida em 0,5 bar. Dessa forma, o fluxo crítico para o lodo biológico estaria localizado entre o valor de fluxo obtido para a pressão de 0,3 bar e para a pressão de 0,4 bar. Por convenção, foi adotado o valor médio entre o intervalo que correspondeu a $113,5 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$.

A Figura 18 apresenta os valores de fluxo medidos ao longo do tempo de filtração do lodo floculento para os diferentes valores de pressão.

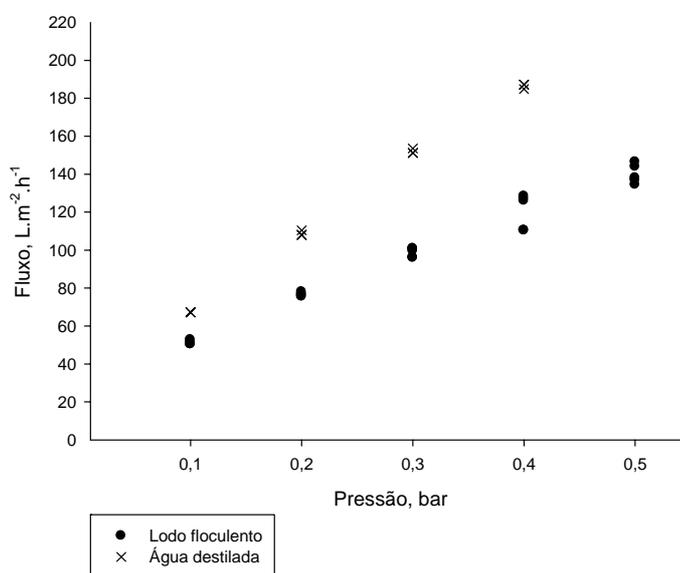


Figura 18 - Fluxos medidos durante a filtração do sistema com lodo floculento ($\text{SST} = 2700 \text{ mg.L}^{-1}$).

De acordo com a Figura 18, pode-se observar que a partir do valor de pressão de 0,4 bar, os valores medidos para o fluxo através da membrana ao longo do tempo de filtração apresentaram maior variação ao longo do tempo do que para as pressões inferiores. Neste ponto, o fluxo já não varia linearmente com a variação da pressão, o que indica que o fluxo superou o valor de fluxo crítico do sistema.

Para comparar o fluxo obtido durante a filtração com o lodo granular e com o lodo floculento, para SST de 2700 mg.L^{-1} , foi construído o gráfico apresentado na Figura 19. Como pode-se observar o fluxo do sistema de lodo granular além de não

ter reduzido ao longo do tempo para nenhum dos valores de pressão utilizados, foi superior ao fluxo do lodo floculento para todos os valores de pressão.

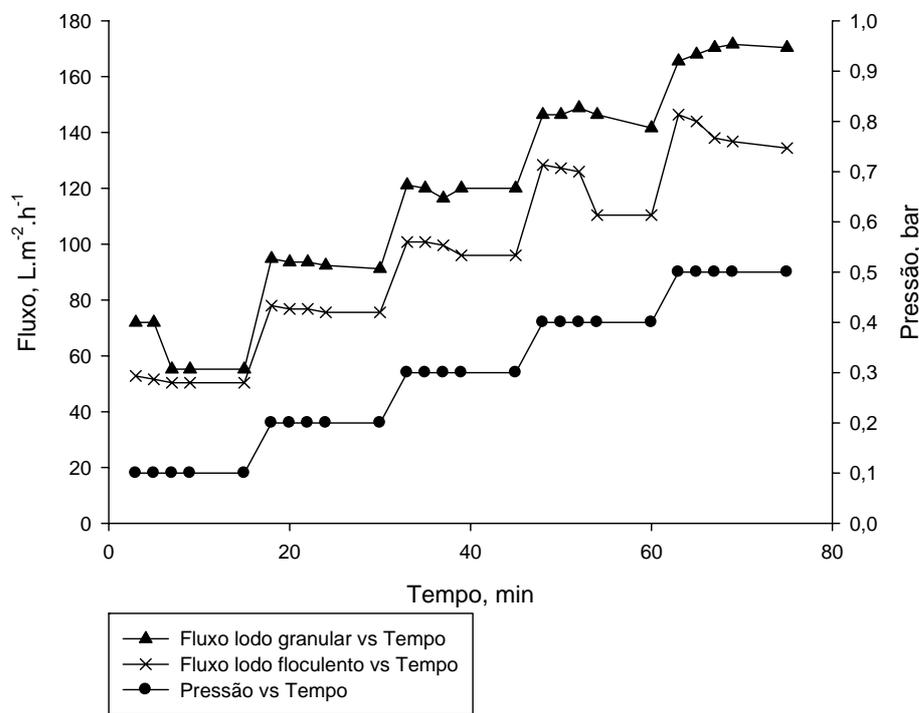


Figura 19 - Fluxo, ao longo do tempo, do lodo granular e floculento a diferentes valores de pressão (SST = 2700 mg.L⁻¹).

5.5.2. Concentração de sólidos suspensos totais dos lodos biológicos igual a 4400 mg.L⁻¹.

Como não foi possível determinar o fluxo crítico para o lodo granular nos testes realizados anteriormente, o procedimento foi repetido utilizando uma concentração de sólidos suspensos totais mais elevada (4400 mg.L⁻¹) para os lodos biológicos. Os resultados são apresentados nas Figuras 20 e 21.

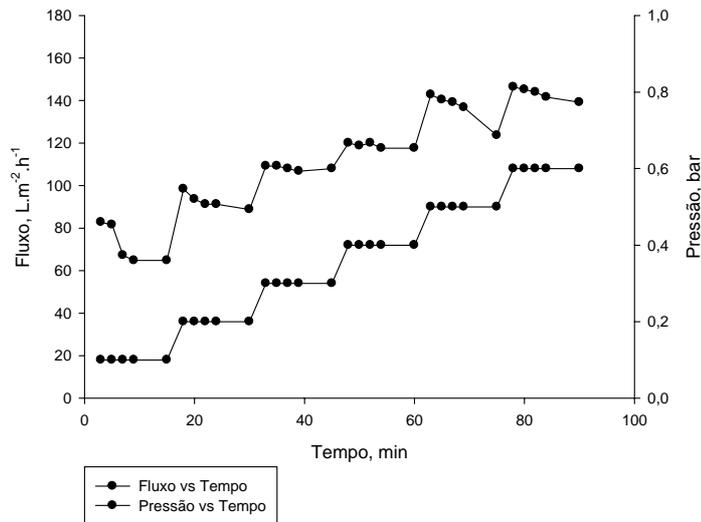


Figura 20 - Determinação do fluxo crítico para o lodo floculento. SST = 4400 mg.L⁻¹.

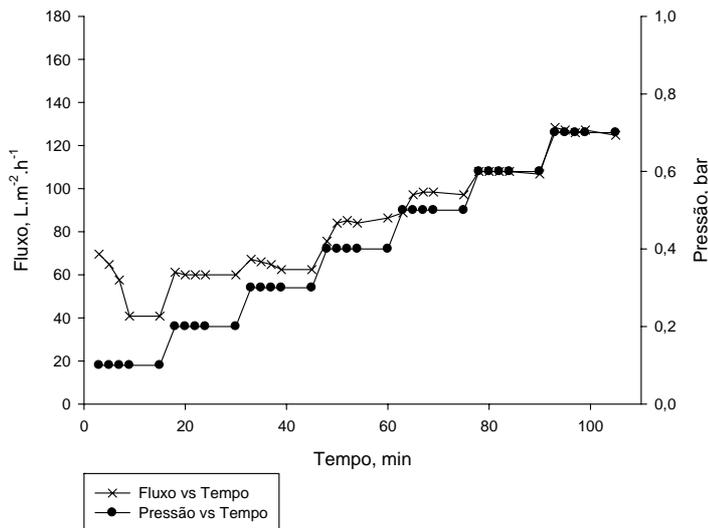


Figura 21 - Determinação do fluxo crítico para o lodo granular. SST = 4400 mg.L⁻¹.

Semelhantemente ao teste com SST igual a 2700 mg.L⁻¹, o lodo granular a 4400 mg.L⁻¹ não foi possível aumentar a pressão de forma a obter um fluxo maior do que o fluxo crítico. Para o lodo floculento, o fluxo apresentou redução ao longo do tempo para pressões acima de 0,5 bar. Dessa forma, o fluxo crítico pode ser obtido pela média do valor inicial de fluxo medido para a pressão de 0,4 bar e para a pressão de 0,5 bar. O fluxo crítico calculado foi de 130,8 L.m⁻².h⁻¹.

Para comparação dos dois lodos biológicos foram construídos gráficos dos valores de fluxo medidos durante os quinze minutos de filtração para os diferentes valores de pressão adotados. Os gráficos apresentados nas Figuras 22 e 23 mostram que, para o lodo floculento, a maior variação nos valores encontradas para um mesmo valor de pressão foi obtida a 0,5 bar.

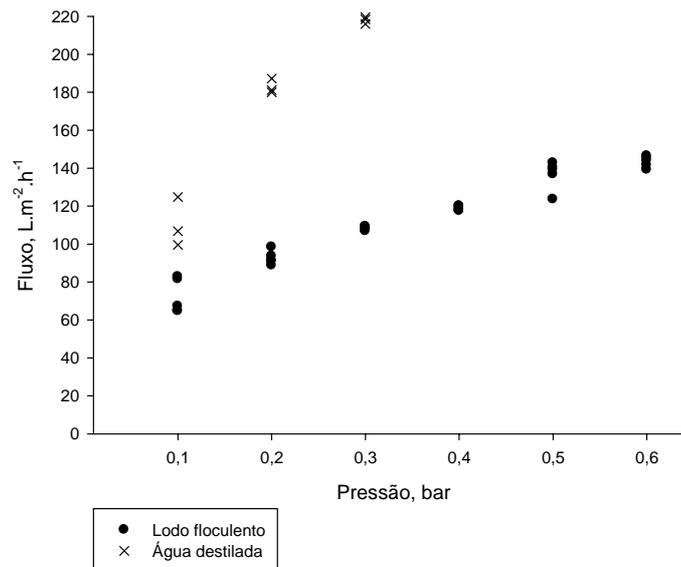


Figura 22 – Fluxos medidos durante a filtração do sistema com lodo floculento SST = 4400 mg.L⁻¹.

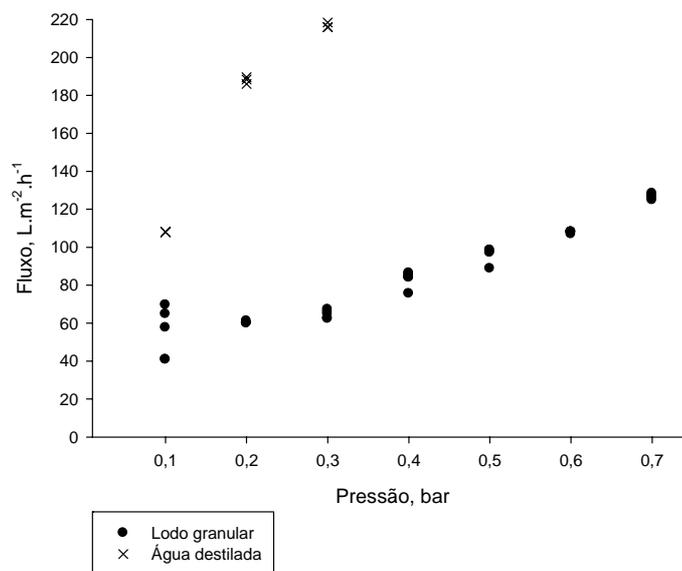


Figura 23 – Fluxos medidos durante a filtração do sistema com lodo granular SST = 4400 mg.L⁻¹.

De acordo com a Figura 24, para a concentração de sólidos suspensos totais de 4400 mg.L⁻¹, o lodo floculento apresentou maior fluxo do que o lodo granular para todos os valores de pressão adotados, atingindo um valor máximo de 143,28 L.m⁻².h⁻¹ para a pressão de 0,6 bar, enquanto o lodo granular o fluxo máximo foi de 126,72 L.m⁻².h⁻¹ à 0,7 bar. Além disso, o fluxo do lodo floculento apresentava um maior aumento do que o fluxo do lodo granular para um mesmo incremento de pressão, indicando uma menor resistência causada pelo lodo floculento.

O comportamento do lodo granular apresentou grande variação para as duas concentrações testadas. Na concentração de sólidos suspensos totais igual a 2700 mg.L⁻¹, o lodo granular apresentou fluxos maiores do que o lodo floculento à mesma concentração. No entanto, para SST de 4400 mg.L⁻¹, os fluxos do lodo granular foram inferiores ao floculento.

Além disso, os fluxos observados pelo lodo floculento mantiveram-se aproximadamente constantes mesmo mudando a concentração de sólidos suspensos totais. Por outro lado, o lodo granular com SST igual a 2700 mg.L⁻¹ apresentou fluxo muito maior do que quando se trabalhou com SST igual a 4400 mg.L⁻¹.

Esta diferença no comportamento do lodo granular pode estar relacionada com a ruptura dos grânulos durante o teste em menor concentração (realizados primeiro). Embora o teste com SST igual a 4400 mg.L^{-1} tenha sido realizado sete dias após o teste com SST igual a 2700 mg.L^{-1} , pôde-se observar que o lodo granular apresentava aparência diferenciada, com maior quantidade de biomassa dispersa, o que pode ter causado a redução do fluxo permeado. O rompimento dos grânulos pode estar relacionado com a natureza complexa do efluente utilizado. Lemaire *et al.* (2008) atribui ao material coloidal e particulado e ao alto nível de gordura, óleos e graxas presentes no efluente de abatedouro a maior limitação na transferência de nutrientes e substratos para o interior dos grânulos. Isto pode ter enfraquecido a estrutura interna dos grânulos e ter sido o motivo dos grânulos crescerem no máximo até 1,5 – 2 mm antes de se quebrarem em grânulos menores e heterogêneos. Estruturas heterogêneas originam-se da desintegração de grânulos maiores e podem crescer novamente para formar grânulos maduros. Entretanto, as propriedades desses grânulos maduros “reciclados” podem diferir dos grânulos maduros iniciais devido à heterogeneidade da estrutura na qual eles se desenvolveram.

Zheng e Yu (2007) encontraram uma correlação positiva entre a bioatividade de grânulos alimentados com acetato e sua porosidade, e reportaram ainda que a porosidade dos grânulos diminuiu com o aumento do tamanho dos agregados. Eles sugeriram que os poros de grânulos maiores são obstruídos mais facilmente por EPS levando à uma redução da atividade biológica devido à falta de nutrientes e transporte de metabólitos.

Dessa forma, além de parâmetros operacionais frequentemente estudados como tempo de sedimentação, força de cisalhamento e carga orgânica, as características da água residuária a ser tratada também podem impactar no tamanho dos grânulos. A natureza complexa dos efluentes reais afeta a estrutura dos grânulos aeróbios e a sua habilidade de remoção de DQO e nutrientes devido à mudanças na comunidade microbiana além da transferência de substrato para o interior do grânulo (LEMAIRE *et al.*, 2008). A resistência mecânica dos grânulos se torna um fator primordial para um bom desempenho de um BRM e um estudo mais profundo se torna necessário para compreensão do comportamento do lodo granular.

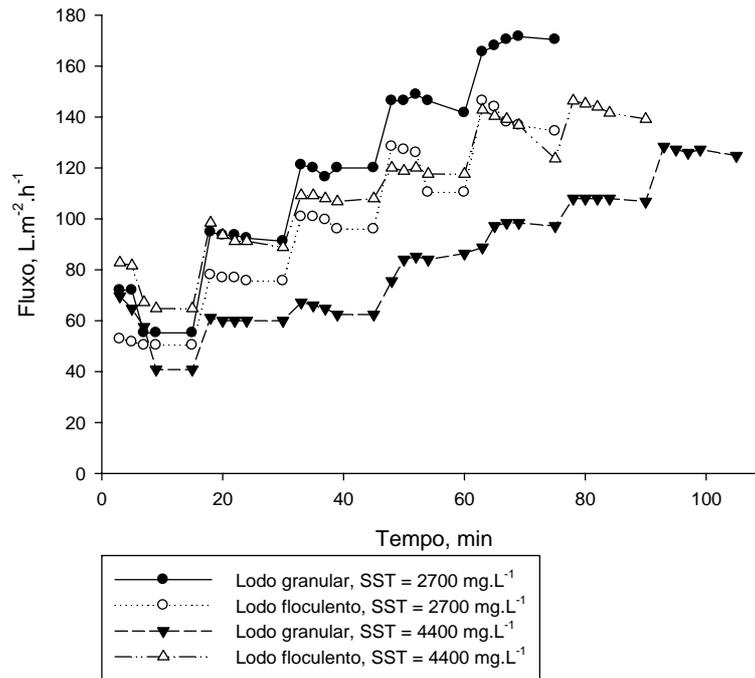


Figura 24 - Valores de fluxo ao longo do tempo para diferentes lodos biológicos com valores de SST de 2700 e 4400 mg.L⁻¹.

6. CONCLUSÕES

- Foi possível formar lodo aeróbio granular em um sistema alimentado com efluente da máquina de papel.
- Os grânulos formados apresentaram alta eficiência de remoção de matéria orgânica, atingindo valores semelhantes aos alcançados pelo reator de lodos ativados convencional. Desta forma, também seria possível produzir com o reator granular um efluente em conformidade com o padrão de lançamento.
- O lodo granular apresentou um menor fluxo em relação ao lodo floculento convencional devido ao rompimento dos agregados.

CAPITULO 2

SELEÇÃO DE LINHAGENS QUE CONTRIBUAM PARA O PROCESSO DE FORMAÇÃO DOS AGREGADOS

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos são encontrados em uma ampla diversidade de ecossistemas formando biofilmes compostos por várias espécies. Biofilmes são consórcios funcionais entre células e possuem uma atividade metabólica maior do que as espécies isoladamente. São comumente encontrados aderidos a substratos ou dispersos em meio líquido dos quais eles obtêm nutrientes (RICKARD *et al.*, 2003a). A força e a especificidade das interações favorecem a sobrevivência das bactérias em ambientes com condições adversas (como forças de cisalhamento e deficiência de nutrientes), possibilitando que bactérias sobrevivam e se proliferem em condições nas quais células não agregadas apresentariam um crescimento reduzido (RICKARD *et al.*, 2003a).

A formação de grânulos aeróbios é fundamental para a sua aplicação em sistemas de tratamento de águas residuárias, uma vez que o processo pode demorar semanas para se iniciar partindo de um inóculo de um sistema de lodos ativados convencional. Diversos fatores podem interferir na formação dos grânulos, tais como: tipo de substrato, carga orgânica, forças de cisalhamento, velocidade de sedimentação e, sobretudo, as culturas microbianas presentes no ambiente (IVANOV *et al.*, 2006; RICKARD *et al.* 2003a).

Do mesmo modo que em outros sistemas de tratamento, a formação de grânulos pode ser obtida pela seleção de culturas microbianas. Quando microrganismos inoculados são incorporados ao lodo, eles podem permanecer no agregado por um longo período, contribuindo para a formação de agregados e mantendo a capacidade de degradação dos mesmos (IVANOV *et al.*, 2006). A adição de linhagens selecionadas ou o enriquecimento de culturas com uma função específica pode ser vantajoso ao sistema de tratamento. Ivanov *et al.* (2006) citam diversos trabalhos que demonstraram uma diminuição significativa do tempo de formação dos grânulos e a formação de grânulos densos com baixos valores de Índice Volumétrico do Lodo (IVL) devido à adição de algumas linhagens.

Uma forma de selecionar culturas de bactérias que formam agregados e examinar a habilidade destas em acelerar o processo de formação dos grânulos é através da seleção de alguns agregados, seguida da desagregação das culturas e, enfim, estudar a re-agregação destas bactérias (IVANOV *et al.*, 2006).

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

As hipóteses deste trabalho são:

- É possível isolar microrganismos que contribuam para a formação de grânulos em menor período de tempo;
- A presença de alguns microrganismos contribui para a formação de agregados com maior resistência ao rompimento com ultra-som.

O objetivo deste capítulo foi verificar quais microrganismos presentes no lodo aeróbio granular contribuem para a agregação microbiana e quais microrganismos prejudicam o processo de formação de agregados.

Como objetivos específicos têm-se:

- Isolar os microrganismos presentes no lodo aeróbio granular;
- Realizar testes de co-agregação para determinação dos isolados que contribuem e/ou que prejudicam o processo de formação de agregados;
- Testar a resistência dos agregados ao rompimento com ultra-som.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A granulação microbiológica difere da floculação pelo fato de que grânulos formados no processo de lodos ativados são agregados de origem microbiana que não coagulam em reduzida força de cisalhamento e sedimentam significativamente mais rápido do que os flocos. Grânulos possuem formato esférico com diâmetro superior a 0,5 mm, enquanto flocos são agregados irregulares com tamanho entre 0,05 e 0,2 mm (IVANOV *et al.*, 2006, Y. LIU *et al.*, 2004).

Grânulos são formados em condições aeróbias devido a fatores de seleção como tempo de sedimentação entre 2 a 10 minutos e uma alta taxa de aeração que proporciona um fluxo ascendente de ar com velocidade da ordem de $1,2 \text{ cm.s}^{-1}$ em um reator em batelada seqüencial (SBR) (IVANOV *et al.*, 2006, REN *et al.*, 2009). O objetivo principal da formação de grânulos resistentes e a aplicação destes no tratamento de águas residuárias industriais e municipais é a possibilidade de diminuição do volume do decantador secundário ou mesmo a sua remoção. Além de apresentarem velocidade de sedimentação superior a 10 m.h^{-1} , os grânulos apresentam diversas vantagens em relação ao floco incluindo alta retenção de biomassa e alta resistência a compostos tóxicos devido à sua estrutura compacta (ADAV *et al.*, 2008, IVANOV *et al.*, 2006, REN *et al.*, 2009, Y. LIU *et al.*, 2004). Desta forma, sistemas de lodos ativados granular estão sendo desenvolvidos para aplicação em locais onde a disponibilidade de área é reduzida.

O processo de formação de grânulos aeróbios é crucial para sua aplicabilidade no tratamento de águas residuárias uma vez que eles podem demorar semanas para serem formados a partir de um sistema convencional de lodos ativados. Diversos estudos estão focados nos aspectos gerais da formação dos grânulos, tais como: efeito do tipo de substrato; carga orgânica; padrão de alimentação do reator; força de cisalhamento; concentração de oxigênio dissolvido; razão DQO/N e velocidade de sedimentação; e características dos grânulos como tamanho; morfologia; índice volumétrico do lodo (IVL); densidade; hidrofobicidade e processos de conversão de diferentes substratos (IVANOV *et al.*, 2006, MALIK *et al.*, 2003a). É sabido também que a agregação de células bacterianas, a formação de flocos e de agregados mais densos pode ser obtida através da adição de coagulantes e floculantes a base de cálcio, alumínio e íons metálicos, mas esta

adição pode ser inviável economicamente além de comprometer o descarte de efluentes contendo floculantes (IVANOV *et al.*, 2006).

Os grânulos aeróbios podem crescer em diferentes fontes de carbono, e serem formados sob diferentes cargas orgânicas (Y. LIU *et al.*, 2004). A co-agregação possibilita diversas vantagens para as bactérias, desde proteção contra predação por protozoários e evitar que sejam arrastadas do sistema; resistência a toxinas; transferência de sinais químicos; troca de informação genética; além de melhor aproveitamento das fontes de carbono e energia (MALIK *et al.*, 2003a, MALIK & KAKII, 2008, NAGAOKA *et al.*, 2008).

Semelhantemente a outros tratamentos, a formação de grânulos pode ser obtida por meio da seleção de culturas microbianas. Quando microrganismos inoculados são incorporados ao lodo, eles podem permanecer no agregado por um longo período, contribuindo para a formação de agregados e mantendo a capacidade de degradação dos mesmos (IVANOV *et al.*, 2006).

Interações físicas entre bactérias agregadas facilitam interações metabólicas, como proteção ao oxigênio (no caso das anaeróbias), comunicação intercelular e trocas genéticas. A agregação normalmente depende de interações lectina-sacarídeo altamente específicas que ocorrem entre os pares e podem ser definidas como interespecíficas (co-agregação) ou intra-específicas (auto-agregação) (LEDDER *et al.*, 2008, RICKARD *et al.*, 2003b, RICKARD *et al.*, 2004).

A co-agregação foi estudada inicialmente entre bactérias isoladas da placa dentária humana e é definida como o processo de adesão entre bactérias geneticamente distintas. Tanto células viáveis quanto células mortas podem co-agregar, indicando que estas interações dependem de moléculas presentes na superfície e não apenas de células viáveis (KOLENBRANDER *et al.*, 1993, LEDDER *et al.*, 2008, NAGAOKA *et al.*, 2008, PHUONG *et al.*, 2009, POSTOLLEC *et al.*, 2005, RICKARD *et al.*, 2002, RICKARD *et al.*, 2003a, RICKARD *et al.*, 2004). Diversos trabalhos publicados na década de 1970 demonstraram que a co-agregação é um fenômeno comum entre vários gêneros da placa dentária. Estas primeiras investigações mostraram que a co-agregação entre pares de bactérias é altamente específica e é tipicamente mediada por uma proteína (lectina) em uma das bactérias e o sacarídeo complementar na outra. Dessa forma, o aumento da temperatura e a adição de açúcares podem reverter o processo por meio da

desnaturação da proteína ou competição entre o açúcar adicionado e o sacarídeo presente na superfície de uma das bactérias envolvidas na co-agregação (KOLENBRANDER *et al.*, 1989, LEDDER *et al.*, 2008, NAGAOKA *et al.*, 2008, POSTOLLEC *et al.*, 2005, RICKARD *et al.*, 2003a, RICKARD *et al.*, 2003b, RICKARD *et al.*, 2004, ROSEN *et al.*, 2008). Este consórcio funcional entre células resulta uma maior atividade metabólica das espécies presentes no agregado. Posteriormente às observações das bactérias da placa dentária, a co-agregação foi observada entre bactérias isoladas de biofilmes do intestino de mamíferos, do trato urogenital humano e de sistemas de abastecimento de água indicando que a adesão de linhagens distintas pode ser um fenômeno generalizado (RICKARD *et al.*, 2003a, ROSEN *et al.*, 2008).

Embora existam muitas semelhanças entre os mecanismos de co-agregação de bactérias da comunidade aquática e da placa dentária, existe uma diferença em relação à expressão da co-agregação entre bactérias destes ecossistemas. A co-agregação entre linhagens que crescem nos corpos d'água apresenta um ponto ótimo durante a fase estacionária de crescimento e células em fase exponencial não formam agregados. Além disso, os pares apresentam ganho e perda de sua habilidade de co-agregação ao longo da fase estacionária, indicando uma forma de controle ambiental da expressão de adesinas ou receptores através da desnutrição e estresse (HIRATSUKAA *et al.*, 2008, LEDDER *et al.*, 2008, MALIK *et al.*, 2003a, MALIK & KAKII, 2008, RICKARD *et al.*, 2002, RICKARD *et al.*, 2003a, RICKARD *et al.*, 2003b, RICKARD *et al.*, 2004). As bactérias da placa dentária, por sua vez, não apresentam tal comportamento uma vez que a perda de adesão pode resultar na ingestão destas devido a forças de cisalhamento presentes na boca. Biofilmes sobre altas forças de cisalhamento estão sujeitos à uma pressão de seleção que favorece a co-agregação. Do mesmo modo, em rios ou córregos caudalosos, organismos suspensos podem ser levados de seus nichos ecológicos e tendem a se agregar (LEDDER *et al.*, 2008, RICKARD *et al.*, 2003a).

As interações de co-agregação contribuem para o desenvolvimento de biofilmes através de duas rotas. A primeira consiste no reconhecimento específico de células isoladas em suspensão e adesão destas às células geneticamente distintas presentes no biofilme. A segunda rota é através de uma co-agregação prévia entre colonizadores secundários em suspensão, seguida por uma subsequente adesão do agregado ao biofilme (RICKARD *et al.*, 2003a). Entretanto,

os mecanismos que controlam as interações em biofilmes contendo várias espécies ainda não são completamente conhecidos (SIMÕES *et al.*, 2007).

A associação entre bactérias é altamente específica e colonizadores primários podem agregar entre si, mas não agregam facilmente com colonizadores secundários. Entretanto, algumas espécies de colonizadores secundários podem agregar tanto com colonizadores primários quanto secundários, agindo como uma espécie de organismo ponte (BUSWELL *et al.*, 1997, MALIK *et al.*, 2003a, NAGAOKA *et al.*, 2008, RICKARD *et al.* 2003a). Na ausência deste tipo de organismo outros colonizadores secundários não conseguem fazer parte do biofilme. No isolamento de linhagens de uma comunidade de água doce realizado por Rickard *et al.* (2003a), a linhagem *Blastomonas natatória 2.1* formou agregado com todas as outras 18 bactérias isoladas, indicando que a *B. natatória 2.1* deve ter a função de organismo ponte no desenvolvimento de biofilme permitindo a adesão entre colonizadores primários e secundários.

Um evento fisiológico importante que pode ocorrer durante o desenvolvimento do biofilme e que contribui para a adesão de colonizadores secundários é o aumento na produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Estes polímeros envolvem as células aderidas, fortalecem a adesão entre as células e o biofilme, e podem agir como receptores de interações de co-agregação. Os EPS apresentam compostos bióticos de secreções bacterianas ou lise celular; e abióticos formados por moléculas encontradas no meio (VILLAIN *et al.*, 2010). Embora seja aceito que os EPS ajam como cimentante durante a formação do biofilme, a função exata destes na co-agregação entre bactérias da fase líquida e do biofilme ainda não foi completamente determinada (ADAV *et al.*, 2008, MCSWAIN *et al.*, 2005, RICKARD *et al.*, 2003a, REN *et al.*, 2009). A análise comparativa dos EPS de bactérias isoladas de um sistema de produção de hidrogênio indicou que proteínas e carboidratos extracelulares apresentam uma função importante na auto-agregação de *E. harbinense*. A auto-agregação de grânulos da linhagem YUAN-3 foi perdida após a digestão de proteínas extracelulares pela proteinase K (REN *et al.*, 2009).

Do ponto de vista de transferência de massa e utilização de substrato, é mais vantajoso para as bactérias envolvidas manterem-se dispersas do que formarem agregados. No entanto, propriedades físico-químicas da superfície celular possuem grandes efeitos na formação de biofilmes. A hidrofobicidade induzida por condições do meio pode funcionar como um fator que desencadeia a granulação aeróbia. À

medida que a célula se torna mais hidrofóbica, é observada maior adesão entre células, ou seja, a hidrofobicidade da superfície celular deve influenciar na habilidade das células de se agregarem. Por outro lado, uma mudança na composição química da água residuária pode provocar a perda do lodo granular estabelecido (Y. LIU *et al.*, 2004).

A hidrofobicidade das células pode ser induzida por condições do meio e possibilitar a agregação célula-célula o que é crucial para a formação dos grânulos biológicos (Y. LIU *et al.*, 2004, EKMEKCI *et al.*, 2009, OLOFSSON *et al.*, 1998, PHUONG *et al.*, 2009, MALIK & KAKII, 2008). Esta característica é citada por inúmeros autores como pré-requisito para a biogranulação (Y. LIU *et al.*, 2004). Malik *et al.* (2003a), combinou trinta e duas linhagens de bactérias isoladas de um sistema de tratamento de efluente sanitário por lodos ativados e observou uma correlação positiva entre a hidrofobicidade da superfície celular e o índice de agregação, além da hidrofobicidade ter se correlacionado positivamente com o tamanho dos agregados para a maioria das combinações utilizadas.

Termodinamicamente, a agregação microbiana é controlada pela redução na energia livre. O aumento na hidrofobicidade das superfícies celulares reduz a energia de Gibbs da superfície, o que promove a interação intercelular e, posteriormente, leva à formação de agregados (Y. LIU *et al.*, 2004). Tay *et al.* (2002) citado por Y. Liu *et al.* (2004) encontraram um valor de hidrofobicidade cerca de duas vezes maior para as bactérias provenientes de grânulos aeróbios do que do lodo disperso. Dentre as combinações realizadas por Malik *et al.* (2003a) entre trinta e duas linhagens de bactérias provenientes de um sistema de lodos ativados, os autores observaram que embora *M. esteraromaticum* S29 e *M. esteraromaticum* S51 foram identificados ao mesmo nível de espécie, a porcentagem de co-agregação com *A. johnsonii* S35 apresentou uma razoável variação (92% e 73%, respectivamente) devido a diferenças nas propriedades da superfície celular. A diferença na hidrofobicidade e morfologia celular levaram a diferentes índices de agregação e tamanho dos agregados. Outra observação importante em relação aos agregados é que índices visuais de co-agregação reduzidos não indicam necessariamente uma interação fraca entre as células (NAGAOKA *et al.*, 2008).

Outro fator que contribui para o aumento da hidrofobicidade é a pressão de seleção hidráulica (MCSWAIN *et al.*, 2005, MALIK & KAKII, 2008, RICKARD *et al.*, 2003b, Y. LIU *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2003) citado por Y. Liu *et al.* (2004), estudou o

efeito de diferentes condições e observou que a hidrofobicidade das células, tanto de bactérias heterotróficas quanto nitrificantes, é sensível a forças de cisalhamento e pressões de seleção hidráulica presentes no reator em batelada seqüencial (RBS). A hidrofobicidade do lodo biológico apresentou um aumento de 20% para 70% em relação a este parâmetro quando um lodo inicial foi submetido à elevada pressão de seleção em função da redução do tempo de sedimentação durante a biogranulação. O efeito do tempo de sedimentação sobre a formação de grânulos foi estudada por McSwain *et al.* (2005) e foi observado que longos tempos de sedimentação não inibiram a formação dos agregados, mas evitaram que os grânulos se tornassem dominantes no reator. Dessa forma, curtos períodos de sedimentação provocam o arraste contínuo de biomassa, afetando a seleção das espécies ao longo do tempo. Além disso, em função do ciclo de operação do RBS, os microrganismos estão sujeitos a períodos de alimentação e de jejum, ou seja, existe uma escassez de alimentos periódica durante o ciclo de operação do reator. Sabe-se que a falta de alimentos pode apresentar um grande impacto sobre as propriedades da superfície, podendo aumentar a hidrofobicidade, o que contribui para a adesão e agregação microbiana (Y. LIU *et al.*, 2004). Além do jejum, outras condições do meio como substrato, pH e temperatura, além de características do organismo em resposta a condições do meio como a taxa de crescimento podem influenciar as propriedades hidrofóbicas da superfície celular (Y. LIU *et al.*, 2004).

Mudanças na hidrofobicidade podem ser respostas das culturas à condições de estresse. Ao serem expostos a um substrato tóxico, os microrganismos são capazes de regular as propriedades da superfície celular, sobretudo a hidrofobicidade (Y. LIU *et al.*, 2004). Isto aumenta a força das interações intercelulares dando origem a uma estrutura microbiana mais resistente, a qual possibilita uma maior proteção às células expostas aos ambientes desfavoráveis (METZGER *et al.*, 2009, Y. LIU *et al.*, 2004). Além disso, Y. Liu *et al.* (2004) afirma que não há efeito significativo sobre a formação de agregado quando a carga orgânica aplicada ao sistema variou entre 1,5 a 9,0 Kg DQO.m⁻³.dia⁻¹.

Tanto a granulação aeróbia quanto a anaeróbia pode ser influenciada pela presença de cálcio. A presença desse íon pode estimular a granulação através da neutralização das cargas negativas presentes nas superfícies bacterianas implicando numa maior força de atração de van der Waals, ou pela formação de pontes catiônicas entre bactérias uma vez que a maior parte dos microrganismos

possuem carga negativa em valores de pH usualmente utilizados nos tratamentos (Y. LIU *et al.*, 2004). A neutralização das cargas negativas também pode ser obtida pela redução do pH do meio. Ekmekci *et al.* (2009) avaliaram o efeito do pH sobre a co-agregação entre a *E.coli* e dezenove linhagens de lactobacilos vaginais. As células bacterianas foram testadas em relação à co-agregação sob diferentes valores de pH entre 3 e 9 e os resultados mostraram que a redução do pH provocou um aumento na atividade de co-agregação.

A ausência de íons cálcio no meio utilizado por Malik *et al.* (2003b) em combinações de linhagens de bactérias de um sistema de lodos ativados, resultou na formação de agregados mais fracos e menos estáveis durante a co-agregação entre *A. johnsonii* S35 e *M. esteraromaticum* S38; e *A. johnsonii* S35 e *M. esteraromaticum* S51. Entretanto, a adição de 3 mM de Ca^{++} à estas combinações, implicou em um aumento no índice de co-agregação a valores próximos aos observados nos controles. Teo *et al.* (2000) citado por Y. Liu *et al.* (2004), associa o efeito positivo do cálcio sobre a granulação devido à desidratação provocada por este íon sobre a superfície celular o que implica em um aumento na hidrofobicidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Plano experimental

Os trabalhos realizados para estudos do processo de formação de agregados foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO). Os experimentos foram realizados em seis etapas visando conhecer melhor o processo possibilitando uma redução no tempo necessário para a formação dos grânulos e a obtenção de agregados mais resistentes, melhorando o funcionamento do biorreator a membranas. A primeira etapa (Etapa 1) consistiu na desagregação dos grânulos obtidos do reator em batelada seqüencial e a obtenção de culturas puras por meio de plaqueamentos e repicagens. Foram obtidas vinte e seis culturas puras denominadas Isolado E1, Isolado E2, sucessivamente até Isolado E26. Observações posteriores indicaram que alguns desses isolados supostamente se tratavam de uma mesma cultura. Dessas possíveis repetições, foi mantida uma cultura e as demais descartadas. Portanto, algumas numerações foram perdidas. Ao final desta etapa, foram feitos estoques das culturas em ultrafreezer a menos oitenta graus Celsius (-80°C).

Na segunda etapa (Etapa 2), foi feita uma combinação, utilizada como controle, formada pela mistura de todos os isolados da Etapa 1. Paralelamente, foram feitas combinações na ausência de cada um dos isolados. Ou seja, uma combinação foi formada pela mistura dos isolados na ausência do Isolado E1, outra combinação foi formada pela mistura na ausência do Isolado E2, e assim sucessivamente. Em algumas dessas combinações, os agregados formados se apresentaram com maiores tamanhos e em maior quantidade do que os agregados controle, indicando que, possivelmente, o isolado ausente nesta combinação prejudica a formação dos grânulos e sua ausência possibilita o crescimento de outros isolados importantes para o processo de agregação. Por outro lado, em algumas combinações os agregados formados foram de menor tamanho e em menor quantidade do que o controle, indicando que o isolado ausente pode ser importante e contribui para a formação dos grânulos.

Na terceira etapa (Etapa 3), para tentar confirmar a importância de alguns isolados na formação de grânulos, foram feitas combinações, aos pares, entre estes isolados e todos os outros isolados obtidos.

Na quarta etapa (Etapa 4) foram selecionados alguns pares com altos índices de co-agregação e introduzidos os isolados que possivelmente prejudicavam o processo de agregação.

Durante a Etapa 3, o Isolado E19 chamou atenção devido ao fato de que em todos os pares nos quais este isolado estava presente, os agregados formados eram muito maiores do que os das demais combinações, com alta resistência ao rompimento, mas, ao invés de sedimentar, os agregados flotavam e permaneciam na superfície do meio de cultura. Dessa forma, a quinta etapa (Etapa 5) consistiu na seleção de pares com altos índices de co-agregação e com boa sedimentabilidade e a introdução do Isolado E19 para verificar se, mesmo na presença de isolados que formavam agregados grandes e que sedimentavam, a presença do Isolado E19 implicaria na flotação dos agregados.

Por fim, na sexta etapa (Etapa 6) foram feitos testes de resistência ao rompimento por ultra-som dos agregados formados em presença do Isolado E19. A Figura 25 apresenta um fluxograma das etapas de trabalho realizadas.

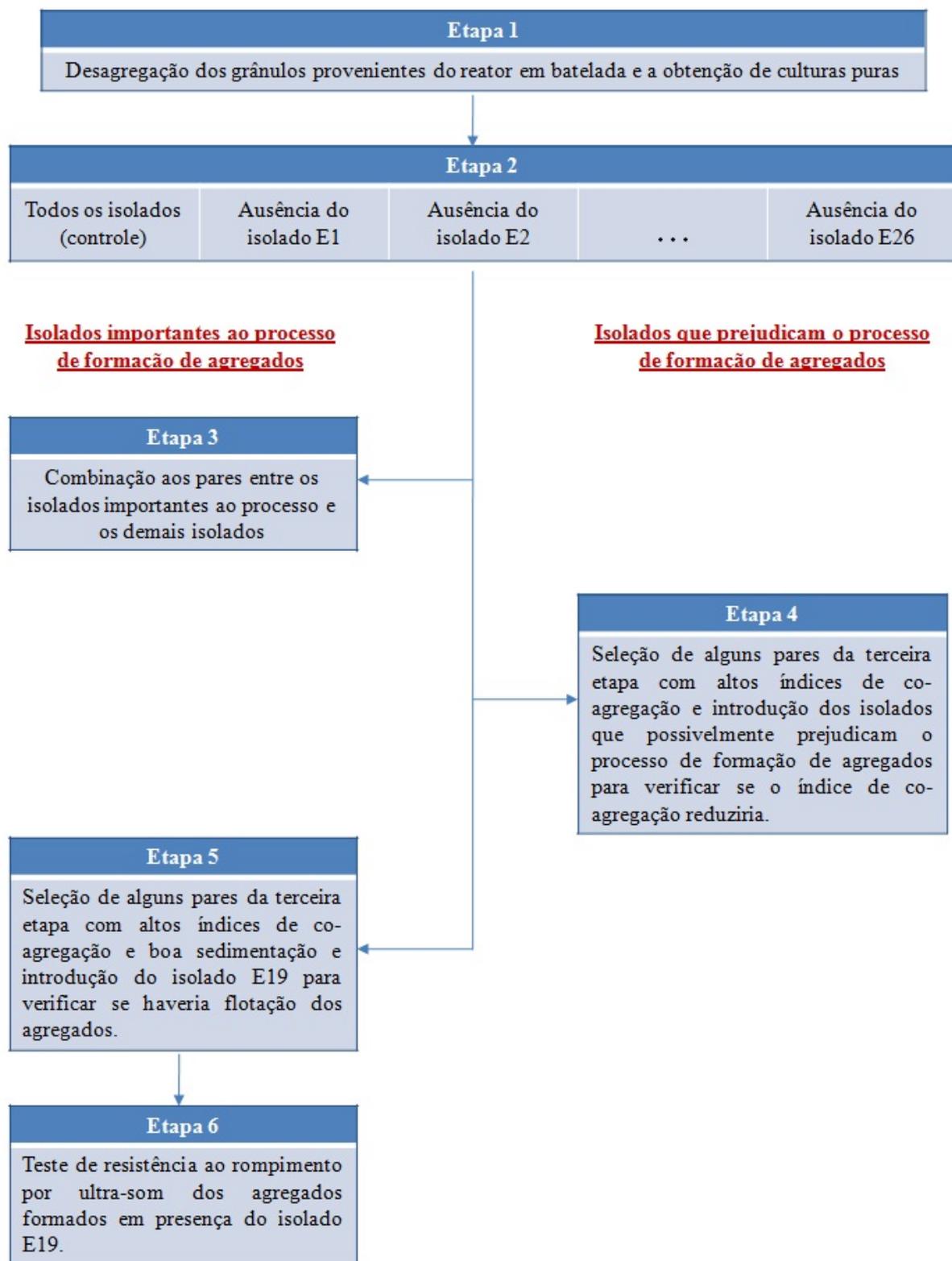


Figura 25 - Fluxograma com as etapas de trabalho realizadas.

4.2. Isolados bacterianos

Os isolados foram obtidos do lodo biológico proveniente de um reator aeróbio granular alimentado com efluente de uma fábrica de papel reciclado. Foram retirados

cinco mililitros do lodo granular e realizadas três centrifugações a 650 x g (seiscentos e cinqüenta vezes a aceleração da gravidade) por dois minutos. Após cada centrifugação, foi descartado o sobrenadante e o material foi re-suspenso em solução salina 0,85%. Após a terceira re-suspensão, foram realizados fluxos com seringa além de aplicados pulsos em um ultra-som para desagregação do lodo. Foram aplicados quatro pulsos de 20 kilohertz (kHz), com duração de quatro segundos cada. O equipamento de ultra-som utilizado foi o Ultrasonic homogenizer-Cole Parmer Instrument Company 4710 series Chicago Illinois 60648.

Após a desagregação, foi realizada nova centrifugação a 650 x g por dois minutos. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL para realizações de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-9} .

De cada diluição foram feitos plaqueamentos em placas de Petri com alça de Drigalski em quatro meios de cultura diferentes: R2A, 1/10 LB (LB diluído dez vezes), mineral e o próprio efluente autoclavado (solidificado com ágar a 1,5%). As placas foram mantidas em temperatura ambiente. Foram escolhidos quatro meios de cultura diferentes visando isolar o maior número de culturas, uma vez que um microrganismo que não conseguisse crescer em um determinado meio poderia crescer em outro. Além disso, o meio LB diluído dez vezes foi utilizado para reduzir o crescimento de microrganismos com alta taxa de crescimento, permitindo que outros microrganismos com taxas menores pudessem se desenvolver.

Em seguida, foram transferidas colônias com uma alça de repicagem para placas de Petri contendo meio R2A até a obtenção de culturas puras. Posteriormente, cada uma das culturas puras foi colocada para crescer em meio líquido (efluente autoclavado) e feita a estocagem em ultrafreezer.

4.3. Co-agregação na ausência de um único isolado

Com o objetivo de verificar a influência de cada um dos 19 isolados na formação do agregado, foram propostas 20 combinações sendo um controle contendo todos os isolados e outras 19 combinações nas quais eram combinados 18 isolados na ausência de cada um.

Inicialmente, os isolados foram retirados do ultrafreezer e colocados para crescer em placa de Petri contendo ágar nutriente. Em seguida, foram retiradas

colônias com uma alça de repicagem e transferidas para erlenmeyers com 20 mL de caldo nutriente. Os erlenmeyers foram colocados em agitador a 150 rpm por uma hora e trinta minutos. Este tempo foi determinado com base nas curvas de crescimento, onde foi observado que todos os isolados se encontravam em fase exponencial de crescimento após uma hora e trinta minutos de cultivo.

Posteriormente, foi medida a densidade ótica (DO) dos meios de cultura e calculado o volume necessário de cada isolado para se obter uma DO da mistura em 50 mL igual a 0,1. Foi feita a transferência do volume calculado e os erlenmeyers com as combinações foram colocados no agitador a 150 rpm. Foram feitas observações visuais de cada combinação ao longo do tempo.

4.4. Co-agregação entre pares ou trios de agregados

Os resultados da co-agregação na ausência de um único isolado indicaram possíveis isolados importantes para o entendimento da co-agregação. Dessa forma, foram escolhidas combinações entre dois ou três isolados para verificar se eles prejudicavam o processo de agregação ou se contribuíam para a formação de agregados mais resistentes.

Inicialmente, os isolados foram retirados do ultrafreezer e colocados para crescer em placa de Petri contendo ágar nutriente. Em seguida, foram retiradas colônias com uma alça de repicagem e transferidas para erlenmeyers com 20 mL de caldo nutriente. Os erlenmeyers foram colocados em agitador a 150 rpm por uma hora e trinta minutos. De acordo com as curvas de crescimento realizadas, após uma hora e trinta minutos todos os isolados estavam em fase logarítmica de crescimento.

Posteriormente, foi medida a densidade ótica (DO) dos meios de cultura e calculado o volume necessário de cada isolado para se obter uma DO da mistura em 6 mL igual a 0,1. Foi feita a transferência do volume calculado para tubos de vidro com tampas rosqueáveis e colocados em um agitador a 150 rpm. Foram feitas observações visuais de cada combinação ao longo do tempo.

4.5. Critério utilizado para determinação do índice de agregação

Grande parte dos trabalhos encontrados em literatura se baseia praticamente em duas metodologias. A primeira consiste em uma metodologia quantitativa, a qual utiliza técnicas de espectrofotometria e a segunda consiste em uma metodologia semi-quantitativa, baseada em observações visuais.

Na metodologia quantitativa é determinada a absorvância ou densidade ótica (DO) da amostra em comprimento de onda igual a 660 nanômetros. Em seguida, a amostra é centrifugada a 650 x g por dois minutos na temperatura de 25°C e é determinada a absorvância da amostra após centrifugação. O índice de co-agregação é determinado com base na seguinte fórmula:

$$\text{Índice de co - agregação} = \frac{\text{Absorvância}_{\text{inicial}} - \text{Absorvância}_{\text{centrifugada}}}{\text{Absorvância}_{\text{inicial}}} \times 100$$

A metodologia semi-quantitativa é baseada nos critérios propostos por Cisar *et al.* (1979):

- (0) ou ausência de numeração: ausência de agregados visíveis na suspensão de células;
- (1): agregados pequenos e uniformes em suspensão turva;
- (2): agregados facilmente visíveis em suspensão turva;
- (3): agregados facilmente visíveis que sedimentam rapidamente, mas há ainda uma turbidez remanescente no sobrenadante;
- (4): agregados grandes que sedimentam instantaneamente deixando um sobrenadante claro.

Em alguns testes de agregação foi observada a formação de agregados que, ao invés de sedimentar, flotavam e permaneciam na superfície do meio líquido. Como não foi encontrado em literatura nenhum trabalho no qual os agregados tenham apresentado este comportamento e havia a necessidade de diferenciar estes agregados daqueles agregados que sedimentaram, foi adotado o sinal negativo para indicar as combinações nas quais os agregados flotaram.

Dessa forma, o módulo do índice está relacionado ao tamanho dos agregados e o sinal positivo/negativo com a sedimentação/flotação, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Meio de cultura

Após o estoque em ultrafreezer, tentou-se trabalhar com o efluente da máquina de papel como meio de cultura para os experimentos de agregação. No entanto, ao autoclavar o efluente ocorria uma precipitação de alguns compostos os quais ainda conseguiam ser utilizados pelos isolados em meio sólido. Porém, ao trabalhar com meio líquido o precipitado interferia na leitura de absorbância além de dificultar a visualização de agregados formados. Dessa forma, tentou-se remover este precipitado tanto por filtração quanto por sedimentação, mas os microrganismos não cresceram neste efluente clarificado.

Outra tentativa de esterilizar o efluente da máquina de papel foi a filtração em membrana de porosidade igual a 0,22 μm . No entanto, foi observada uma turvação do meio vinte e quatro horas após a filtração e uma observação microscópica indicou o crescimento microbiano de alguma espécie que passou através dos poros da membrana.

Dessa forma, optou-se por utilizar caldo nutriente como meio líquido e Agar-nutriente como meio sólido durante todos os testes de co-agregação. O uso de meios complexos pode não simular as condições naturais do ambiente presente na planta de tratamento, no entanto, estes meios foram utilizados por diversos autores (BUSWELL *et al.*, 1997; MALIK & KAKII, 2008; RICKARD *et al.*, 2003b) e foi a opção encontrada já que não foi possível obter uma esterilização adequada do efluente da máquina de papel.

5.2. Escolha da metodologia para determinação do índice de co-agregação

Após os plaqueamentos com alça de Drigalski as colônias foram numeradas e, inicialmente, foram identificadas vinte e seis colônias diferentes. Quando estas colônias que estavam em meios de cultura diferentes foram repicadas para um mesmo meio (R2A), foi observado que algumas daquelas colônias supostamente diferentes se tratavam de uma mesma cultura. Dessa forma, alguns números foram perdidos, restando dezenove das vinte e seis colônias iniciais. Por exemplo, vimos que a colônia que tinha recebido a numeração “E10” era a mesma da “E21”, o

mesmo aconteceu para “E22” e a “E24”. Dessa forma, excluímos E21 e E22, assim como foi feito para algumas outras colônias.

Além de definir os experimentos necessários para determinar quais isolados contribuíam para uma melhor formação dos grânulos foi necessário definir qual metodologia utilizar para quantificação da co e autoagregação. Os trabalhos encontrados em literatura se baseiam praticamente em duas metodologias: uma metodologia visual (semi-quantitativa) determinada por Cisar *et al.*, (1979) e outra metodologia espectrofotométrica (quantitativa) que consiste na determinação da absorbância ou densidade ótica (DO) a comprimentos de onda em torno de 660 nanômetros (nm) da amostra antes e após centrifugação a uma velocidade que cause sedimentação dos agregados. Com estes valores é calculada a porcentagem da absorbância removida com a centrifugação e este valor é utilizado como o índice de agregação (IA) ou porcentagem de agregação.

De acordo com Buswell *et al.* (1997), embora, em geral, a metodologia espectrofotométrica seja mais sensível, a reprodutibilidade entre experimentos é mais problemática para certos pares de isolados. Os valores de absorbância de suspensões de culturas puras podem variar consideravelmente entre diferentes isolados, interferindo no cálculo das porcentagens de co-agregação. Uma comparação entre o método visual e espectrofotométrico para a determinação da co-agregação entre pares de bactérias aquáticas demonstrou que o método por espectrofotometria foi mais sensível. Uma alta porcentagem (82,2%) dos pares apresentaram resultado positivo através deste método, em comparação com 48,9% dos mesmos pares detectados pelo método visual. Entretanto, os resultados do método espectrofotométrico foram mais variáveis entre os experimentos. Dessa forma, como o método visual além de ser mais simples apresentou resultados mais consistentes e foi sensível o suficiente para detectar interações maiores, este método foi escolhido para os experimentos realizados pelo autor (BUSWELL *et al.*, 1997).

Além do trabalho de Buswell *et al.* (1997) diversos estudos sobre co-agregação entre bactérias da cavidade oral utilizaram o método visual semi-quantitativo (LEDDER *et al.*, 2008). Nagaoka *et al.* (2008) fizeram uma relação entre as duas metodologia para isolados de bactérias da cavidade oral e encontraram a seguinte relação: a mistura de suspensão de células manteve-se inalterada quando o percentual de co-agregação foi inferior a 10%. Pequenos agregados dispersos em

um meio turvo foram observados visualmente quando o percentual estava entre 10% e 30%. Uma co-agregação aparente, com a formação de pequenos agregados que sedimentam foram observados entre 30% e 40%. Forte co-agregação com agregados grandes que sedimentam foram observados quando a porcentagem de co-agregação estava acima de 40%.

Com o objetivo de determinar a melhor metodologia a ser utilizada para quantificar a co-agregação entre pares da coleção de isolados obtida, foi montado um experimento com vinte combinações entre os isolados.

Após 54 horas de incubação, foram retiradas amostras das combinações e diluídas para obter uma absorbância inicial a 660nm em torno de 0,3. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, em triplicata, e o índice de co-agregação foi determinado.

Os resultados obtidos nos testes de comparação das metodologias para determinação do índice de co-agregação são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores das absorbâncias, após 54 horas de incubação, antes e após centrifugação para determinação da porcentagem de co-agregação e classificação por ordem decrescente de co-agregação

Isolado ausente	Leituras		Índice de Co-agregação	Classificação	Índice visual*
	Inicial	Centrifugada			
Nenhum (controle)	0,3477	0,2487	28,48	7	1
E1	0,2264	0,1628	28,09	8	1
E2	0,2775	0,2110	23,96	14	1
E3	0,3351	0,2311	31,04	4	1
E4	0,3013	0,1994	33,83	1	1
E5	0,3420	0,2337	31,67	2	1
E7	0,3782	0,2912	23,00	16	1
E8	0,3235	0,2385	26,29	10	2
E9	0,3006	0,2216	26,29	11	1
E10	0,3533	0,2439	30,96	5	1
E11	0,3729	0,2939	21,19	18	4
E13	0,3015	0,2195	27,20	9	1
E14	0,3536	0,2644	25,22	13	1
E15	0,3273	0,2683	18,04	19	1
E18	0,3658	0,2713	25,82	12	1
E19	0,3437	0,2950	14,17	20	1
E23	0,3634	0,2826	22,24	17	1
E24	0,3515	0,2483	29,35	6	1
E25	0,3616	0,2753	23,86	15	1

E26	0,3414	0,2344	31,34	3	3
-----	--------	--------	-------	---	---

*(0) ausência de agregados visíveis; (1) agregados pequenos e uniformes em suspensão turva; (2) agregados facilmente visíveis em suspensão turva; (3) agregados facilmente visíveis que sedimentam deixando um sobrenadante claro (4) agregados que sedimentam quase instantaneamente deixando um sobrenadante claro.

Na coluna à direita (classificação) pode-se observar a classificação por ordem decrescente do índice de co-agregação para as combinações testadas. De acordo com a Tabela 6, o maior índice de co-agregação foi apresentado pela combinação na ausência do Isolado E4 e o menor índice apresentado pela combinação onde estava ausente o Isolado E19. Por outro lado, na observação visual a combinação que apresentou a maior quantidade e maior tamanho de agregados foi a combinação com ausência de E11, seguida pela ausência de E26 e posteriormente a combinação sem o Isolado E8. Estas combinações ficaram classificadas em décima oitava, terceira e décima colocação, respectivamente, de acordo com a Tabela 6. Isto mostra que, apesar de ser mais sensível que o método visual, os resultados obtidos para combinações semelhantes apresentaram índices muito diferentes através do método espectrofotométrico. Isto pode estar relacionado com problemas na reprodutibilidade deste método ou por erros na leitura da absorbância inicial devido à rápida sedimentação dos agregados maiores que acabam não sendo contabilizados e interferem nos resultados. Tais limitações do método espectrofotométrico também foram observadas por Buswell *et al.* (1997).

5.3. Avaliação da ausência de cada um dos isolados

Para avaliar o efeito de cada isolado na formação dos agregados foram realizadas 20 combinações entre os 19 isolados obtidos, sendo uma combinação controle onde estavam presentes todos os isolados e outras dezenove combinações formadas pela mistura de 18 isolados na ausência de cada um deles. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do teste inicial para verificar o efeito da ausência de cada um dos isolados na formação dos agregados. Cada tratamento corresponde à combinação de 18 dos 19 isolados obtidos, exceto aquele isolado indicado no tratamento

Isolado ausente	Tempo de incubação					
	5,00 h	6,50 h	8,83 h	21,25 h	54,00 h	76,60 h
Nenhum (Controle)	1	1	1	1	1	1

E1	1	1	1	2	1	2
E2	1	1	1	1	1	0
E3	1	1	1	3	1	2
E4	3	4	4	4	1	0
E5	1	1	1	4	1	2
E7	0	0	0	1	0	0
E8	1	1	1	1	2	2
E9	1	1	1	2	1	1
E10	2	2	2	2	1	2
E11	1	1	1	2	3	2
E13	1	1	1	1	1	0
E14	2	2	2	2	1	1
E15	1	1	1	2	1	2
E18	2	2	2	2	1	0
E19	0	0	0	2	1	0
E23	1	2	2	2	1	0
E24	1	1	1	2	1	0
E25	1	1	1	1	1	1
E26	3	3	3	3	3	2

(0) ausência de agregados visíveis; (1) agregados pequenos e uniformes em suspensão turva; (2) agregados facilmente visíveis em suspensão turva; (3) agregados facilmente visíveis que sedimentam deixando um sobrenadante claro (4) agregados que sedimentam quase instantaneamente deixando um sobrenadante claro.

Diferentemente do que se esperava, foi observada a formação de agregados em todas as combinações, não se podendo atribuir o fenômeno de agregação à presença de uns ou outros poucos isolados. Semelhantemente ao observado em estudos anteriores, a formação de agregados foi dependente da fase de crescimento havendo casos em que houve um aumento do índice de co-agregação ao longo do tempo, outros em que os índices mantiveram-se praticamente constantes durante todo o período de observação e, por fim, houve combinações que apresentaram um aumento inicial seguido de uma perda na habilidade de co-agregação. Estes comportamentos também foram observados por Rickard *et al.* (2000) ao estudar a co-agregação entre linhagens de bactérias aquáticas. Em todos os seis pares de co-agregação foi observado um ciclo de surgimento e desaparecimento da habilidade de co-agregação. *B. natatoria* 2.1 e *M. luteus* 2.13 formaram agregados durante a fase exponencial, mas atingiram um nível máximo na fase estacionária. Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos realizados por Rickard *et al.* (2003b) e Malik *et al.* (2003a). Por outro lado, *M. luteus* 2.13 e *B. natatoria* 2.8 formaram agregados apenas na fase estacionária inicial, enquanto *B. natatoria* 2.1 e *B.*

natatoria 2.8, somente co-agregaram após cento e quarenta e quatro horas de incubação, já na fase estacionária tardia (RICKARD *et al.*, 2000). Do mesmo modo, a porcentagem de co-agregação das combinações selecionadas por Buswell *et al.* (1997) aumentou com o tempo. A porcentagem máxima foi obtida mais rapidamente em algumas combinações do que em outras e a progressão da co-agregação com o tempo foi diferente para os diferentes pares de isolados. Os padrões de co-agregação diferem, sobretudo, devido a mudanças na composição das espécies e densidade dos biofilmes em função dos nutrientes presentes e das características químicas do meio (BUSWELL *et al.*, 1997).

As adesinas são proteínas do tipo lectina e os receptores são sacarídeos como, por exemplo, galactose, galactosamina ou lactose. Estudos indicam que a co-agregação atinge o máximo quando ambas as espécies estão na fase estacionária. Entretanto, a contribuição de cada linhagem neste ciclo de ganho e perda não é conhecida. Por exemplo, a adesina de uma linhagem e o receptor na linhagem parceira podem não serem expressos simultaneamente durante todo o tempo. Dessa forma, a agregação entre os pares pode ser dependente de mudanças na habilidade de co-agregação de uma ou de ambas as linhagens (RICKARD *et al.*, 2004).

A ausência do isolado E4, resultou em uma maior formação de agregados em relação ao controle até 21,25 horas de incubação, seguido por uma perda nos níveis de co-agregação. Este resultado pode indicar que, devido à alta taxa de crescimento do isolado E4, este isolado apresenta um crescimento rápido e possivelmente inibe o crescimento de outras bactérias que podem ser importantes para o processo de formação de grânulos. Uma maior formação de agregados em relação ao controle também foi observada nas combinações nas quais estavam ausentes os isolados E10, E14, E18 e E26, o que pode indicar que tais isolados contribuem negativamente para o processo e, na ausência destes, as bactérias importantes para o processo conseguem se desenvolver, levando à maior formação de agregados.

Por outro lado, a ausência do isolado E7 resultou na ausência de agregados visíveis durante a maior parte do tempo. Além desta combinação, as combinações na ausência dos isolados E2, E9, E13 e E25 apresentaram pequena formação de agregados, semelhantemente ao controle. Este fato indica que estes isolados podem ser importantes para o processo e a presença deles pode contribuir para a formação dos grânulos aeróbios.

Com o objetivo de confirmar os comportamentos apresentados pelas combinações apresentadas na Tabela 7 foram selecionadas algumas combinações para repetição do experimento em triplicata. Os resultados são apresentados na Figura 26 e Tabela 8.

Tabela 8 - Repetição de algumas combinações utilizadas para verificar o efeito da ausência de cada um dos isolados na formação dos agregados

Isolado ausente	Tempo de incubação						
	3,00 h	5,00 h	6,50 h	8,83 h	21,25 h	54,00 h	76,60 h
E4		2	2	2	2	2	3
E7		1	1	1	2	3	2
E9		1	1	1	2	2	2
E10		2	1	1	2	2	3
E19					1	2	1
E25		1	1	1	1	2	2

Os resultados para as combinações na ausência dos isolados E9, E10, E19 e E25, apresentados na Tabela 8, foram relativamente semelhantes aos da Tabela 7. A ausência do isolado E4 não implicou em perda na habilidade de co-agregação e os índices observados foram inferiores aos do primeiro experimento. Por outro lado, a ausência do isolado E7 apresentou maiores índices de co-agregação do que os observados anteriormente.

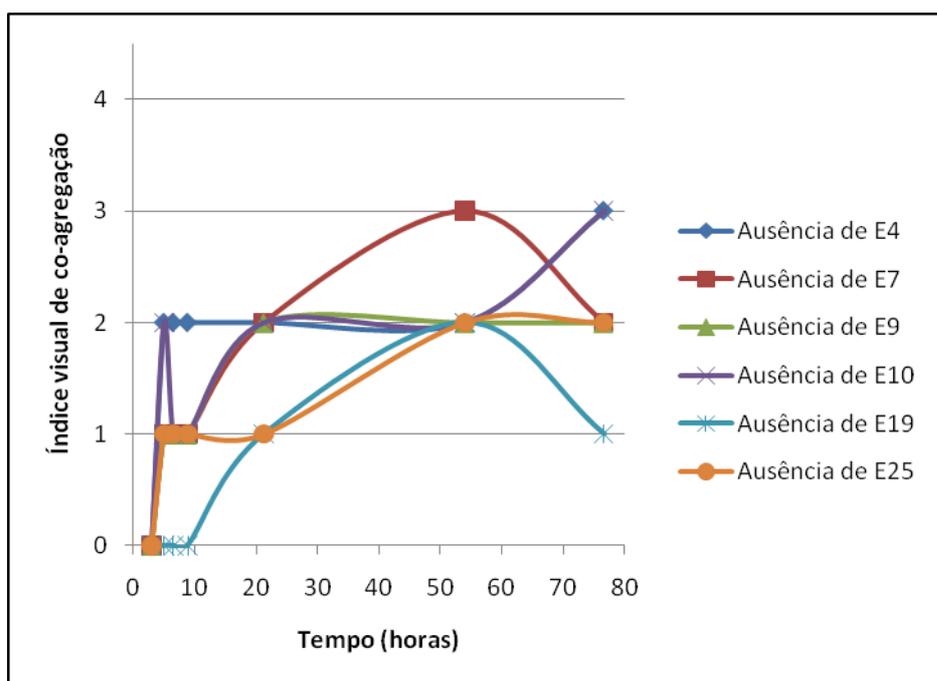


Figura 26 - Combinações entre isolados na ausência de um deles.

5.4. Combinação aos pares entre os isolados E2, E7, E9, E13 e E25 e todos os outros isolados

Os resultados obtidos no primeiro experimento indicaram que alguns isolados podem ser importantes para o processo e, quando ausentes, a formação de agregados não ocorre ou ocorre em menor intensidade. Para tentar confirmar a importância dos isolados E2, E7, E9, E13 e E25 no processo de formação de agregados, foram feitas combinações entre cada um destes isolados e os dezenove isolados obtidos. As combinações foram realizadas aos pares e os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados do teste de formação de agregados entre pares de isolados

Pares de isolados	Tempo de incubação						
	3,00 h	5,00 h	6,50 h	8,83 h	21,25 h	54,00 h	76,60 h
E2 + E1							1
E2 + E2						1	1
E2 + E3						1	1
E2 + E4							
E2 + E5						2	2
E2 + E7						4*	4*
E2 + E8						4*	4*
E2 + E9						1	1

E2 + E10								
E2 + E11					4	3	3	
E2 + E13						2	2	
E2 + E14						1	1	
E2 + E15						1	1	
E2 + E18						4*	4*	
E2 + E19						4*	4*	
E2 + E23						3*	3*	
E2 + E24						1	1	
E2 + E25						1	1	
E2 + E26						2	2	
E7 + E1					3*	3	3	
E7 + E3						3	3	
E7 + E4								
E7 + E5						2	2	
E7 + E7						3	3	
E7 + E8					3*	3	3	
E7 + E9						2	2	
E7 + E10								
E7 + E11	2	3	3	3	2	3	3	
E7 + E13						2	2	
E7 + E14					1	3	3	
E7 + E15					1	3	3	
E7 + E18						3	3	
E7 + E19					4*	4*	4*	
E7 + E23						3	3	
E7 + E24						4*	4*	
E7 + E25					1	3	3	
E7 + E26						2*	2*	
E9 + E1					2	3	3	
E9 + E3						2*	2*	
E9 + E4								
E9 + E5						2	2	
E9 + E8					2	3	3	
E9 + E9					2	3	3	
E9 + E10								
E9 + E11	1	2	2	2	2	3	3	
E9 + E13					2	3*	3*	
E9 + E14					2	4*	4*	

E9 + E15					2	3	3
E9 + E18					2	3	3
E9 + E19					4*	4*	4*
E9 + E23					2	3	3
E9 + E24						3	3
E9 + E25						3	3
E9 + E26							1
E13 + E1							
E13 + E3					1	1	1
E13 + E4							
E13 + E5							
E13 + E8					1	3*	0
E13 + E10							
E13 + E11	1	3	3	3	4	3	3
E13 + E13					1	3	3
E13 + E14						1	1
E13 + E15						3	3
E13 + E18					1	3	3
E13 + E19					3*	3*	3*
E13 + E23						3	3
E13 + E24						3	3
E13 + E25						3*	3*
E13 + E26						1	1
E25 + E1					2	4*	4*
E25 + E3						2*	2*
E25 + E4					2	3	3
E25 + E5						3*	3*
E25 + E8					2	3	3
E25 + E10							
E25 + E11	2	3	3	3	4	3	3
E25 + E14							
E25 + E15					1	3	3
E25 + E18					1		2
E25 + E19						3*	3*
E25 + E23						3	3
E25 + E24						1	1
E25 + E25						1	1
E25 + E26	1					1	1

* observada presença de agregados que, ao invés de sedimentar, flotavam e mantinham-se na superfície do meio líquido.

(0) ausência de agregados visíveis; (1) agregados pequenos e uniformes em suspensão turva; (2) agregados facilmente visíveis em suspensão turva; (3) agregados facilmente visíveis que sedimentam deixando um sobrenadante claro (4) agregados que sedimentam quase instantaneamente deixando um sobrenadante claro.

De acordo com a Tabela 9, todos os pares nos quais estava presente o isolado E11 apresentaram agregados facilmente visíveis e que apresentam uma boa velocidade de sedimentação. Além disso, na maioria das vezes, a formação de agregados visíveis podia ser observada já nas primeiras horas de incubação. Por outro lado, as combinações que continham o isolado E19 apresentaram uma tendência de formação de agregados que permaneciam na superfície do meio líquido e, após a agitação manual dos frascos, os agregados flotavam e retornavam para a superfície. Este fenômeno foi observado isoladamente em outras combinações, mas somente o E19 apresentou tal comportamento com todos os cinco isolados testados.

A Tabela 10 apresenta uma síntese dos resultados apresentados na Tabela 9. As combinações que apresentaram formação de agregados independentemente do período de incubação receberam um sinal positivo "+", por outro lado, as combinações nas quais não foi observado nenhum agregado visível durante todo o período do experimento receberam um sinal negativo "-".

Tabela 10 - Indicação das combinações que formaram ou não formaram agregados durante o experimento

Isolados	Isolados																			(%)*
	E1	E2	E3	E4	E5	E7	E8	E9	E10	E11	E13	E14	E15	E18	E19	E23	E24	E25	E26	
E2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	89,47
E7	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	89,47
E9	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	89,47
E13	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	73,68
E25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	89,47
(%)*	80		100	20	80		80		0	100		80	100	100	100	100	100	100	100	

* representa a porcentagem de combinações que apresentaram a formação de agregados em algum momento do experimento. Exemplo: das dezenove combinações contendo o isolado E2, dezessete combinações apresentaram agregados visíveis; por outro lado, das cinco combinações contendo o isolado E4 apenas uma combinação apresentou agregados visíveis.

De acordo com a Tabela 10, pode-se observar que os isolados testados (E2, E7, E9, E13 e E25) apresentaram um alto percentual de agregação com os demais isolados, variando entre 73,68 % entre as combinações do isolado E13 com os demais isolados e 89,47 % para as outras combinações. Estes valores de porcentagem foram obtidos pela razão entre o número de combinações positivas dividido pelo total de combinações nas quais o isolado estava presente. Por exemplo, o isolado E13 estava presente em dezenove combinações (incluindo uma combinação com ele mesmo, ou seja, uma auto-agregação) e em quatorze delas foi observada a formação de agregados.

Esta alta porcentagem de combinações nas quais foram observados agregados confirma a importância dos isolados E2, E7, E9, E13 e E25 no processo, seja pela agregação com outros isolados ou por funcionarem como organismo ponte, facilitando a associação de outras espécies que não agregam diretamente entre si.

Por sua vez, o isolado E10 não formou agregado com nenhum dos cinco isolados testados e o E4 só formou agregado em combinação com E25. Porém, foi observada a auto-agregação dos isolados E2, E7, E9, E13 e E25 (ou seja, houve a formação de agregados na combinação E2+E2; E7+E7 etc.). Dessa forma, além de não formar agregados com os outros isolados, E4 e E10 prejudicaram a auto-agregação das culturas testadas. Este fato reforça a hipótese levantada com os resultados da Tabela 7 de que estes isolados podem contribuir negativamente com o processo de formação dos grânulos.

5.5. Avaliação do efeito dos isolados E4 e E10 na formação dos agregados

Os testes realizados anteriormente indicaram que a presença dos isolados E4 e E10 contribui negativamente para a formação de agregados. Para confirmar a hipótese de que a presença destes agregados é ruim para o processo, foi proposto um novo experimento no qual foram formadas combinações entre três isolados, sendo dois isolados que apresentaram elevados índices de co-agregação no experimento entre pares de bactérias e o terceiro isolado representado por E4 ou E10. Como controles, foram utilizados os respectivos pares de isolados com elevada co-agregação. As combinações foram realizadas em triplicata e os resultados das

médias dos níveis de co-agregação de cada uma delas são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Efeito da presença dos isolados E4 e E10 na formação de agregados

Combinação	Tempo de incubação						
	3,00 h	5,00 h	6,50 h	8,83 h	21,25 h	54,00 h	76,60 h
E7+E11+E4	3	2	2	1	2	2	2
E7+E11+E10		3	3	1	2	2	2
E7+E11 (controle)	2	3	3	3	2	2	2
E9+E11+E4					2	2	1
E9+E11+E10	1	2	2	1	2	2	2
E9+E11 (controle)	1	1	1	1	2	2	2
E25+E11+E4					2	1	0
E25+E11+E10	2	4	4	4	2	4	4
E25+E11 (controle)	2	4	4	4	4	4	4
E13+E11+E4				1	2	1	2
E13+E11+E10	1	2	2	2	2	2	2
E13+E11 (controle)	2	4	4	4	4	4	3

Resultados representam a média dos resultados em triplicata das combinações.

De acordo com a Tabela 11, a presença do isolado E4 nas combinações E9+E11+E4, E13+E11+E4 e E25+E11+E4 resultou na formação de agregados somente após 21,25 horas, tempo muito superior ao tempo necessário para as primeiras observações de agregados nos controles. Além disso, nas combinações E13+E11+E4 e E25+E11+E4 os índices observados foram menores do que o controle ao longo de todo o período de observação. Na combinação E9+E11+E4 os resultados foram semelhantes ao controle (E9+E11) no final do período de incubação (três últimas observações), embora não foram observados agregados visíveis até 21,25 horas após o início do experimento. Somente a combinação E7+E11+E4 apresentou resultados semelhantes ao controle, indicando que a presença de E4, neste caso, não atrapalhou a formação de agregados.

Por outro lado, nas combinações com a presença do isolado E10, somente a combinação E13+E11+E10 apresentou resultados inferiores ao controle. Na combinação E7+E11+E10 houve um retardo em relação ao controle, sendo observados agregados somente após 5 horas de incubação. As combinações

E9+E11+E10 e E25+E11+E10 foram semelhantes aos respectivos controles durante quase todo o tempo de observação.

Portanto, os resultados mostram que os isolados E4 e E10 prejudicam o processo de formação de agregados, provocando um aumento no tempo necessário para o início da observação do fenômeno ou reduzindo o índice de co-agregação da combinação, embora o efeito negativo do isolado E10 tenha sido observado em uma menor quantidade de combinações do que o isolado E4. Estes dados coincidem com as mesmas tendências observadas na Tabela 7, onde o efeito da presença do isolado E4 foi mais intenso que o efeito da presença do isolado E10.

Para facilitar a observação do aumento e redução do índice de co-agregação ao longo do tempo foram construídos gráficos com os resultados da Tabela 11. Os gráficos são apresentados na Figura 27.

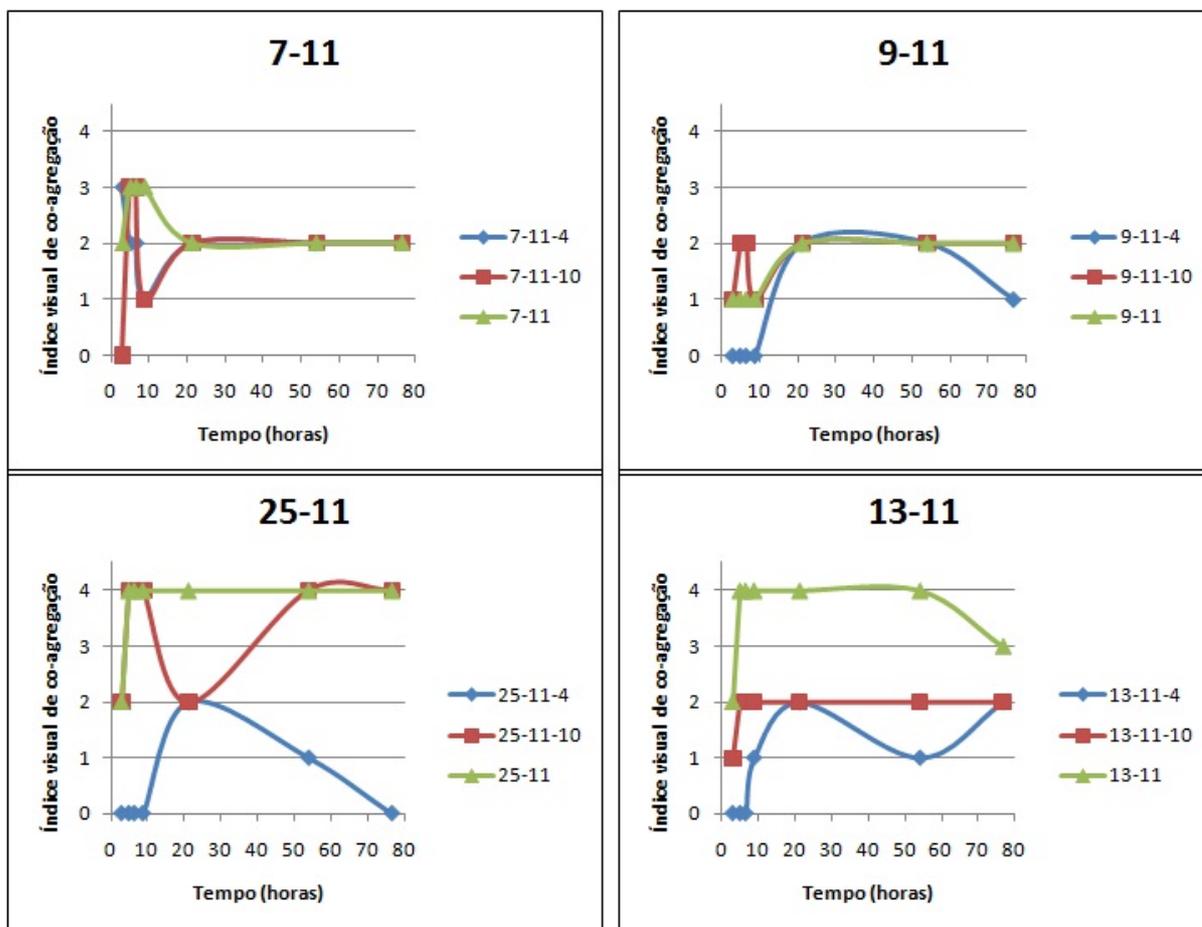


Figura 27 - Efeito da introdução dos isolados E4 e E10 em combinações de pares de isolados.

5.6. Avaliação do efeito do isolado E19 na formação dos agregados

Outro isolado que chamou atenção em relação à observação visual dos resultados do segundo experimento (combinação aos pares cujos resultados foram apresentados na Tabela 9) foi o isolado E19. Os agregados formados nas combinações com presença desta cultura foram maiores do que os demais agregados e, na maioria dos casos, tais agregados flotavam, ao invés de decantar (Figura 28). Além do tamanho dos agregados, estes não se rompiam após a agitação manual do frasco contendo a combinação.

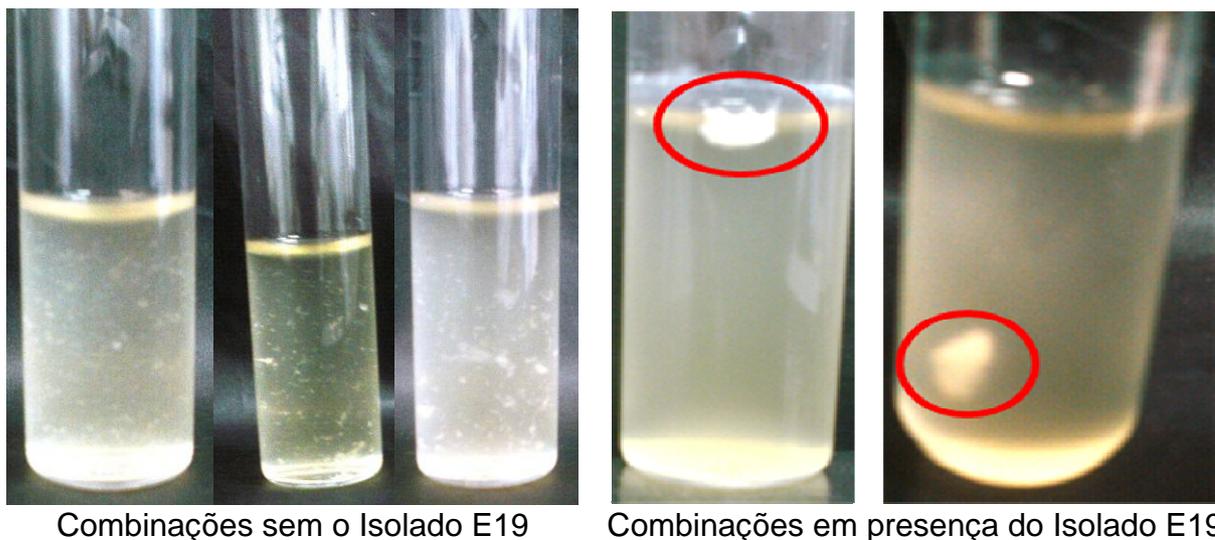


Figura 28 - Agregados formados em presença e na ausência do Isolado E19.

Nos testes de determinação do fluxo crítico do lodo aeróbio granular realizados no Laboratório de Celulose e Papel (LCP), apresentados no Capítulo 1 dessa dissertação, os grânulos testados se romperam ao serem submetidos a elevadas pressões transmembranas. Isto resultou em uma rápida colmatação das membranas, reduzindo o fluxo de permeado e prejudicando o sistema. A formação de grânulos mais resistentes pode ser benéfica ao biorreator a membranas por reduzir o rompimento dos grânulos e, possivelmente, diminuir a colmatação das membranas. Dessa forma seria possível a permanência de fluxos mais elevados por maiores períodos de tempo. Por outro lado, a flotação dos agregados formados em presença do isolado E19 deve ter menor importância em um BRM do que em um sistema de lodos ativados convencional no qual a separação da biomassa do efluente tratado é feita em decantadores, onde uma boa sedimentabilidade do lodo é fundamental.

Para avaliar se presença do isolado E19 causa flotação, mesmo em presença de outros isolados que formaram agregados com boa sedimentabilidade, foram selecionados alguns pares do segundo experimento e introduzido o E19 como um terceiro isolado. Os controles foram realizados com os pares de isolados na ausência de E19. Foi avaliado o tamanho dos agregados, a resistência ao rompimento por agitação manual e o comportamento em relação à sedimentação/flotação. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da introdução do isolado E19 em combinações que formavam grandes agregados com boa sedimentabilidade

Combinação	Tempo de incubação						
	3,00 h	5,00 h	6,50 h	8,83 h	21,25 h	54,00 h	76,60 h
E13+E11+E19		1	2	2	4*	4	4
E13+E11	2	4	4	4	4	4	3
E13+E13+E19		1	2	2	4*	4*	4*
E13+E13 ⁽¹⁾					2	2	1
E13+E23+E19		3	3	3	4	4*	4*
E13+E23		3	3	3	3	2	1
E13+E15+E19					1	1	2
E13+E15					2	2	2
E7+E13+E19				1	2	2	1
E7+E13		1	1	1	2	2	2
E25+E11+E19		1	2	2	4*	3*	3*
E25+E11	2	4	4	4	4	4	4
E2+E11+E19		3	3	2	4*	4*	4
E2+E11		3	3	3	4	4	4

* observada presença de agregados que, ao invés de sedimentar, flotavam e mantinham-se na superfície do meio líquido.

⁽¹⁾ Auto-agregação. Foi adicionado o dobro do volume calculado de inoculo do isolado E13 no meio de cultura para obter o mesmo valor de densidade óptica inicial das demais combinações.

Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que a presença do E19 produziu agregados que flotavam em quase todas as combinações testadas, exceto na E13+E15+E19 e na E7+E13+E19. Além disso, em todas as combinações nas quais foi observada flotação, foram formados agregados grandes com índices de co-agregação igual a 4, sendo que nas combinações E13+E13+E19 e E13+E23+E19 os agregados formados foram maiores do que nos controles (E13+E13 e E13+E23, respectivamente). Os índices de co-agregação não indicam, necessariamente, a

força relativa das interações entre as diferentes células. O tamanho e a densidade dependem do tamanho e morfologia das bactérias envolvidas além da intensidade das interações da superfície bacteriana. Menores índices de co-agregação, entretanto, não indicam necessariamente interações fracas entre as células (BUSWELL *et al.*, 1997).

Entretanto, os agregados formados em tais combinações contendo E19 não se romperam após agitação manual dos frascos utilizados no experimento e podem indicar que as interações envolvendo este isolado são interações fortes que podem contribuir para a formação de grânulos tão grandes quanto os usados nos testes de filtrabilidade; e que não sejam desagregados tão facilmente.

Por outro lado, na combinação E13+E15+E19 os resultados foram semelhantes ao controle e não foram observados grandes agregados nem mesmo a flotação destes. Este mesmo comportamento foi apresentado pela combinação E7+E13+E19. Como estas combinações diferem da E13+E13+E19 pela presença dos isolados E15 e E7, respectivamente, e na combinação E13+E13+E19 os agregados observados foram maiores e mais resistentes, pode se concluir que a presença dos isolados E7 e E15 inibem o crescimento do isolado E19 ou os fenômenos de interação entre as superfícies, prejudicando o tamanho dos agregados. Estes resultados podem ser observados nos gráficos da Figura 29. Como se pode observar, as curvas destas combinações atingem valores abaixo dos observados para as demais combinações. Os índices das combinações que apresentaram agregados que flotaram foram representados no eixo negativo. Este critério foi adotado para diferenciar algumas combinações dos controles que sedimentaram. Dessa forma, o módulo do índice está relacionado ao tamanho dos agregados e o eixo positivo/negativo com a sedimentação/flotação, respectivamente. Portanto, uma combinação com o índice “-4” indica a presença de agregados facilmente visíveis com um meio de cultura com baixa turbidez (semelhante às combinações com índice “+4”), mas que flotaram quando deixados em repouso.

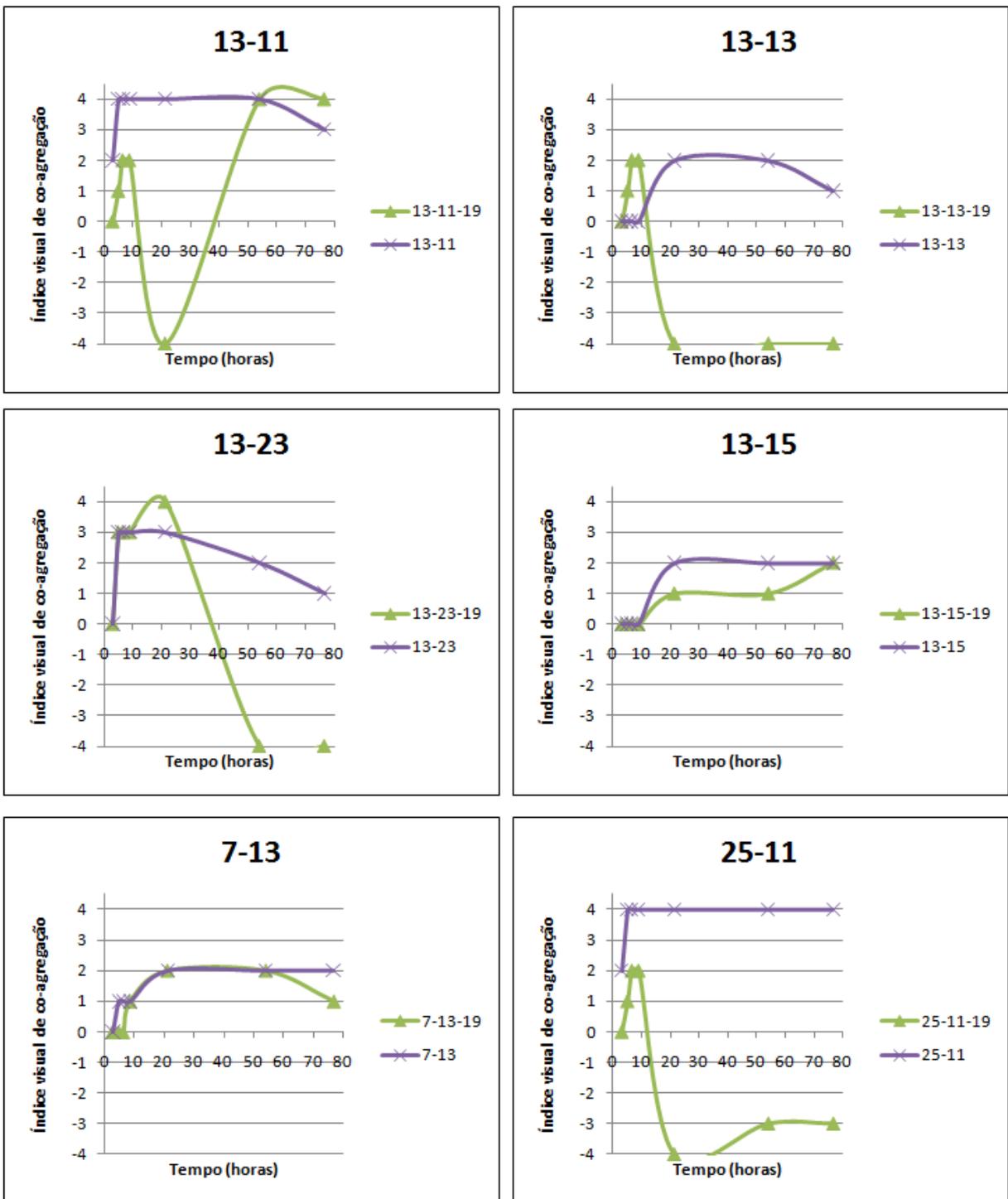
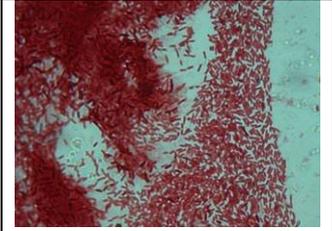
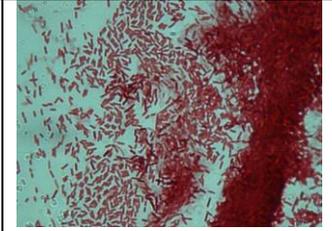
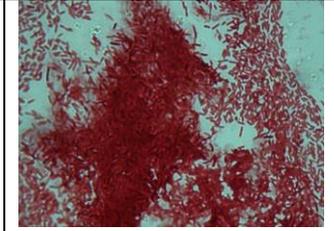
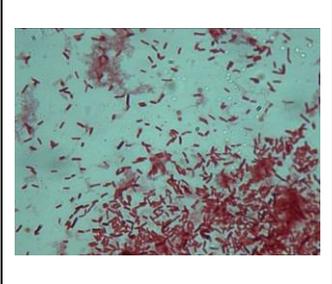
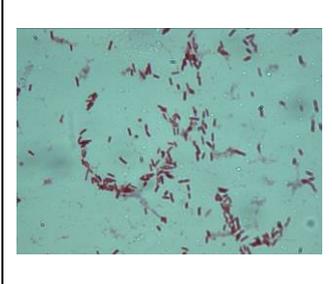
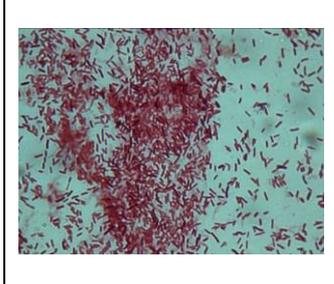
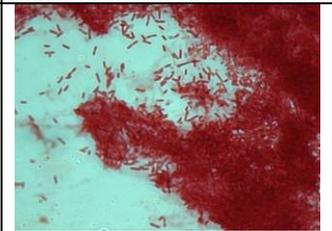
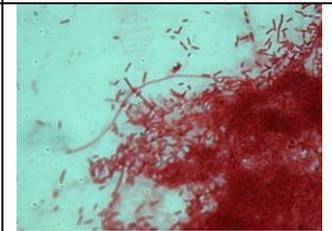
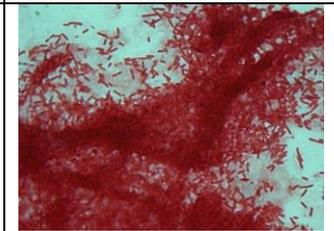
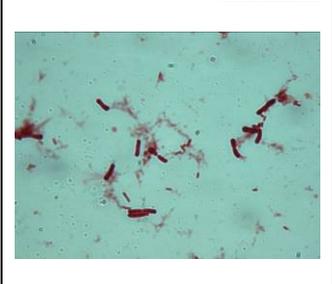
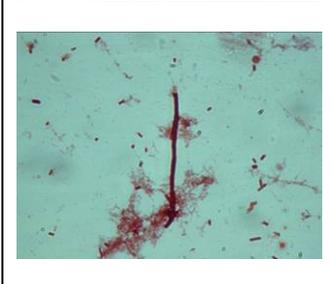
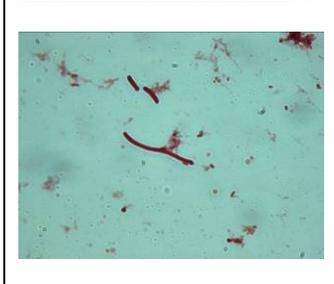
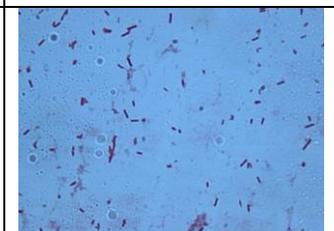
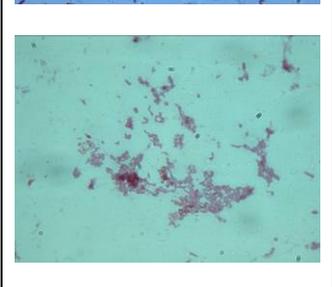
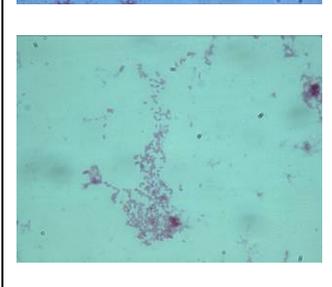
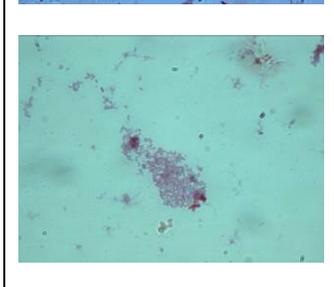


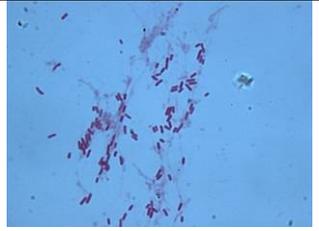
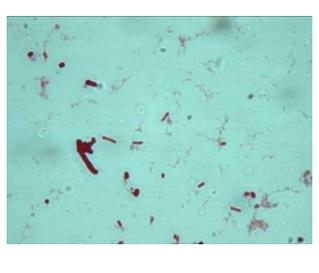
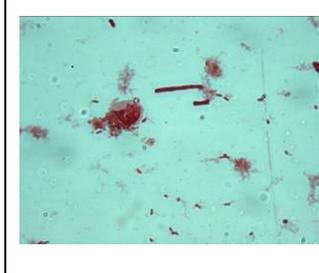
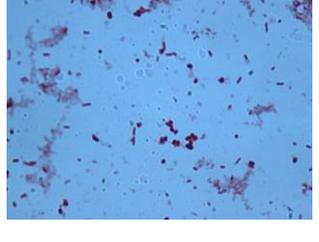
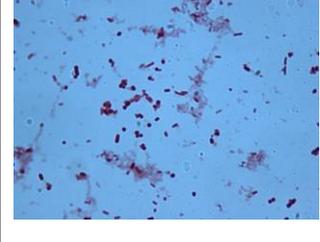
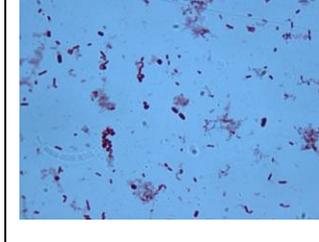
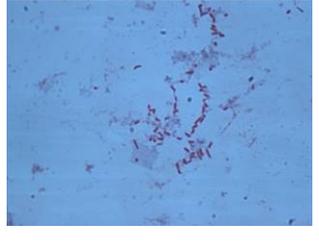
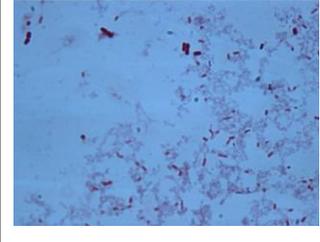
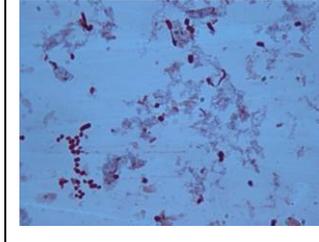
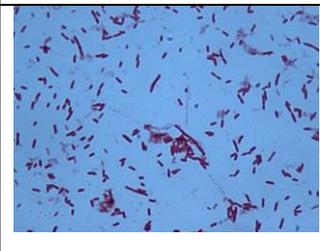
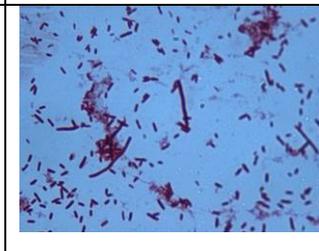
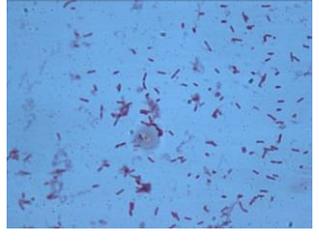
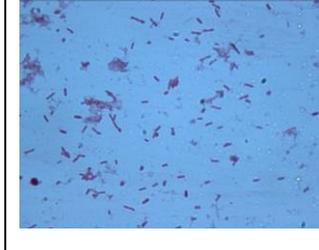
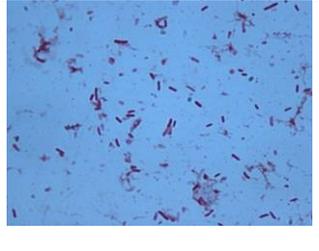
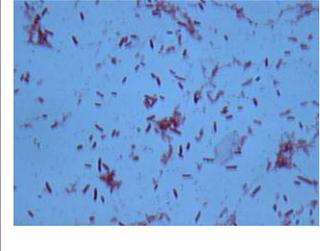
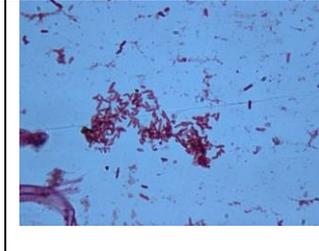
Figura 29 - Efeito do isolado E19 em combinações de pares de isolados.

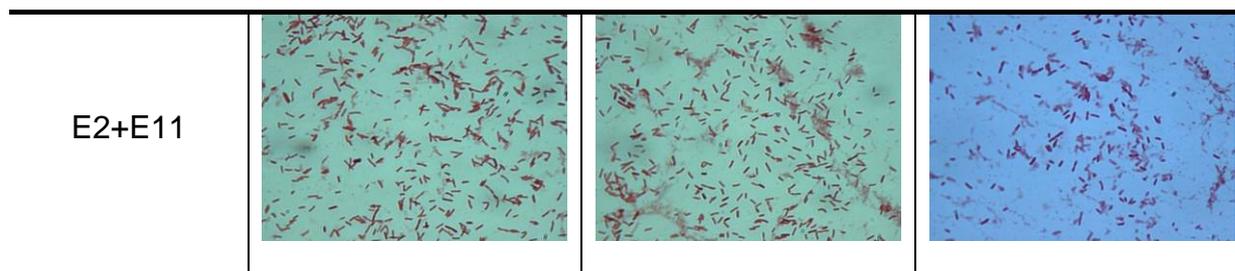
Após 31,5 horas de incubação, foram retiradas amostras das combinações para realização de esfregaço em lâmina, fixação dos microrganismos à lâmina e coloração com fucsina. Os resultados são apresentados na Tabela 13 e confirmam o comportamento apresentado na Figura 29. Ou seja, dentre os pares comparados, a combinação com maior índice de co-agregação apresentou maior quantidade de células do que a outra combinação. Por exemplo, as imagens da combinação E13+E13+E19 mostram uma maior quantidade de células e uma maior agregação destas em comparação com as imagens da combinação E13+E13. Do mesmo

modo, as imagens das combinações E7+E13+E19 e E7+E13 confirmam o comportamento apresentado na Figura 29, onde não foram observadas grandes diferenças entre tais combinações.

Tabela 13 - Imagens microscópicas das combinações em presença e ausência do Isolado E19 após 31,5 horas de incubação. Aumento 1000x

Combinação	Fotos		
E13+E11+E19			
			
E13+E13+E19			
			
E13+E23+E19			
			

E13+E15+E19			
E13+E15			
E7+E13+E19			
E7+E13			
E25+E11+E19			
E25+E11			
E2+E11+E19			



5.7. Teste de resistência dos agregados ao rompimento com ultra-som

Nos experimentos anteriores, foram observados que os agregados formados em presença da bactéria E19 apresentaram uma maior resistência ao rompimento quando submetidos à agitação manual dos frascos. Entretanto, este tipo de agitação não é padronizado e não serve como comparação da resistência entre diferentes agregados. Com o objetivo de comparar a resistência destes agregados entre si e com a resistência dos grânulos utilizados inicialmente para isolamento das culturas utilizadas nos testes de agregação (ou seja, os grânulos do sistema de tratamento montado em escala de bancada no LCP), foi proposto um teste padronizado utilizando um equipamento de ultra-som. Para o teste, foram repetidas algumas das combinações contendo o isolado E19 e, após 21,25 horas de incubação, o material foi levado ao equipamento e foram aplicados pulsos de 20 kilohertz (kHz) com duração de quatro segundos cada um até o completo rompimento dos agregados. As combinações utilizadas e os índices de co-agregação alcançados durante a incubação (antes de serem submetidos ao ultra-som) são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Combinações contendo o isolado E19 antes do teste ao rompimento com ultra-som

Combinação	Tempo de incubação				
	3,00 h	5,00 h	6,50 h	8,83 h	21,25 h
E13+E13+E19		1	1	1	4*
E13+23+E19	3	3	3	3	4
E25+E11+E19	2	2	2	2	4*
E2+E11+E19	3	3	3	3	4*

* observada presença de agregados que, ao invés de sedimentar, flotavam e mantinham-se na superfície do meio líquido.

De acordo com a Tabela 14, após 21,25h de incubação todas as combinações selecionadas apresentavam grandes agregados que não se romperam após agitação manual, embora na combinação E13+E23+E19 os agregados não flotaram.

Para testar a resistência dos agregados formados nas combinações apresentadas na Tabela 14, as amostras foram transferidas para tubos plásticos com fundo cônico e aplicados pulsos de ultra-som. Em seguida, foi realizada a observação visual do material. Caso os agregados não tenham sido rompidos, foram aplicados novos pulsos, sob as mesmas condições anteriores e realizada uma nova observação visual. Este procedimento foi repetido até a ausência de agregados visíveis no meio líquido. Os resultados do teste são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Média e desvio padrão da quantidade de pulsos necessários para o rompimento dos agregados presentes nas combinações

Combinação	Média (\pm Desvio padrão)
E2+E11+E19	6,33 (\pm 1,53)
E25+E11+E19	6,67 (\pm 2,08)
E13+E13+E19	10,00 (\pm 2,00)
E13+E23+E19	8,67 (\pm 1,15)

* média e desvio padrão das amostras em triplicata.

Os resultados da Tabela 15 mostram que a maior quantidade média de pulsos necessária para o rompimento completo dos agregados visíveis foi alcançada pelos testes com a combinação E13+E13+E19. No entanto, considerando o desvio padrão das médias não há diferença significativa entre esta combinação e as combinações E25+E11+E19 e E13+E23+E19.

Antes do início dos testes de agregação apresentados neste capítulo, foi retirada uma amostra contendo grânulos do reator biológico instalado no LCP. A

amostra foi centrifugada e em seguida, aplicados pulsos sob as mesmas condições utilizados neste experimento e foram necessários quatro pulsos para a completa desagregação dos grânulos (procedimento realizado para a etapa de isolamento das culturas). Dessa forma, para todas as combinações apresentadas na Tabela 15, a quantidade média de pulsos necessários para o rompimento completo dos agregados foi maior do que a quantidade utilizada para o rompimento dos grânulos presentes no lodo biológico. Isto indica que os agregados formados por estas combinações são mais resistentes ao tratamento com ultra-som do que o grânulo do qual as culturas foram isoladas inicialmente.

Portanto, o isolado E19 pode contribuir para a formação de grânulos mais resistentes e pode impedir que estes sejam rompidos durante o processo de filtração por membranas, embora os mecanismos relacionados ao rompimento com ultra-som sejam bastante diferentes dos mecanismos que causam a desagregação durante a filtração. De acordo com Ekmekci *et al.* (2009) o ultra-som remove estruturas da superfície da parede celular importantes para a co-agregação. A ação da diferença de pressão na filtração com membranas deve ser diferente, embora não tenha sido encontrado nada na literatura a respeito desse mecanismo. De qualquer forma, os testes realizados indicam uma tendência de maior resistência em relação ao grânulo inicial e a comprovação destes resultados poderia ser feita por meio da realização de testes de determinação do fluxo crítico com as combinações da Tabela 15.

Durante os estudos de co-agregação, os isolados foram misturados em fase exponencial e colocados para crescer juntos, diferentemente de diversos trabalhos nos quais os isolados eram colocados para crescer separadamente e, após um determinado período de incubação, era feita a mistura em solução salina, onde eram feitas as medições de agregação. O crescimento em conjunto dos isolados apresenta uma dinâmica diferente, onde alguns isolados podem ser inibidos ou beneficiados pelo crescimento dos demais isolados. Esse ambiente se assemelha aos biorreatores nos quais as diferentes linhagens crescem em um mesmo meio.

Diversos fatores podem interferir no processo de formação de agregados como a composição do meio de cultura e as condições de operação (velocidade do agitador, oxigênio dissolvido, pH etc.). Estes fatores não foram estudados detalhadamente neste trabalho e podem ser objeto de estudos em trabalhos futuros.

6. CONCLUSÕES

- As espécies presentes no lodo interferem no tempo necessário para a formação dos grânulos.
- Alguns isolados presentes nos grânulos contribuem para o processo de co-agregação, enquanto outros prejudicam o processo.
- O isolado E19 formou agregados com maior resistência do que os agregados formados pela combinação de todos os outros isolados.

7. REFERÊNCIAS

ADAV, S. S.; LEE, D. J.; LAI, J. Y. Intergeneric coaggregation of strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, p. 657-661, 2008.

ADAV, S. S.; LEE, D.-J.; LAI, J.-Y.. Treating Chemical Industries Influent Using Aerobic Granular Sludge: Recent Development. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 333–336, 2009.

AL-AHMAD, M.; ABDUL ALEEM, F.A.; MUTIRI, A.; UBAISY, A. Biofouling in RO membrane systems Part 1: Fundamentals and control, **Desalination**, v. 132, p. 173-179, 2000.

AMARAL, M. C. S. **Tratamento de efluente de branqueamento de pasta celulósica empregando sistema de microfiltração conjugado com bioreator com membranas**. Tese Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington: APHA, AWWA, WEF. 20.ed., 1998.

BEUN, J. J.; HENDRIKS, A.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; MORGENROTH, E.; WILDERER, P. A.; HEIJNEN, J. J. Aerobic Granulation in a Sequencing Batch Reactor. **Water Research**, v. 33, n. 10, p. 2283-2290, 1999.

BEUN, J.J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J.J. Aerobic Granulation in a Sequencing Batch Airlift Reactor. **Water Research**, v. 36, p. 702–712, 2002.

BRAGHETTA, A., DIGIANO, F.A., BALL, W.P. Nanofiltration of natural organic matter: pH and ionic strength, **Journal of Environmental Engineering**, July, p. 628-641, 1997.

BUSWELL, C.M.; HERLIHY, Y.M.; MARSH, P.D.; KEEVIL, C.W.; LEACH, S.A. Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 477-484, 1997.

CHEN, V.; FANE, A. G.; MADAENI, S.; WENTEN, I. G. Particle deposition during membrane filtration of colloids: transition between concentration polarization and cake formation. **Journal of Membrane Science**, v. 125, p. 109-122, 1997.

CISAR, J. O., KOLENBRANDER, P. E., MCINTIRE, F. C. Specificity of coaggregation reactions between human oral Streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. **Infection and Immunity**. v.24, p.742 – 752, 1979.

COMSTOCK, D. Testing the membrane plugging factor in reverse osmosis, **Research and Technology**, v. 74, p. 486-490, 1982.

EKMEKCI, H.; ASLIM, B.; OZTURK, S. Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. **Microbiology and Immunology**, v. 53, p. 59-65, 2009.

FIELD, R. W.; WU, D.; HOWELL, J. A.; GUPTA, B. B. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 100, p. 259-272, 1995.

GOOSEN, M.F.A., SABLANI, S.S., AL-HINAI, H., AL-OBEIDANI, S., AL-BELUSHI, R., JACKSON, D. Fouling of reverse osmosis and ultrafiltration membranes: a critical review, **Separation Science and Technology**, v. 39, 10, p. 2261-2297, 2004.

HIRATSUKAA, K.; HAYAKAWAA, M.; KIYAMA-KISHIKAWAA, M.; SASAKIA, Y.; HIRAI, T.; ABIKO, Y. Role of the hemin-binding protein 35 (HBP35) of *Porphyromonas gingivalis* in coaggregation. **Microbial Pathogenesis**, v.44, p. 320-328, 2008.

IVANOV, V.; WANG, X. H.; TAY, S. T. L.; TAY, J. H. Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 374-381, 2006.

JARUSUTTHIRAK, C., AMY, G., CROUÈ, J-P. Fouling characteristics of wastewater effluent organic matter (EfOM) isolates on NF and UF membranes, **Desalination**, v. 145, p. 247-255, 2002.

JENKINS, D.; RICHARD, M.G.; DAIGGER, G. T. **Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming**. 2nd ed. Michigan, U.S.A.: Lewis Publisher. 2003.

JIANG, H.L.; TAY, J.H.; TAY, S.T.L. Aggregation of Immobilized Activated Sludge Cells into Aerobically Grown Microbial Granules for the Aerobic Biodegradation of Phenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 439–445, 2002.

KILDUFF, J.E., MATTARAJ, S., ZHOU, M., BELFORT, G. Kinetics of membrane flux decline: the role of natural colloids and mitigation via membrane surface modification, **Journal of Nanoparticle Research**, v. 7, p. 525-544, 2005.

KOLENBRANDER, P. E.; ANDERSEN, R. N.; MOORE, L. V. H. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with Strains from 11 Genera of Oral Bacteria. **Infection And Immunity**, v. 57, p. 3194-3203, 1989.

KOLENBRANDER, P. E.; GANPSHKUMAR, N.; CASSEIS, P. J.; HUGHES, C. V. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. **FASEB Journal**, v. 7, p. 406-413, 1993.

KREUK, M.K.; PRONK, M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Formation of aerobic granules and conversion processes in anaerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. **Water Research**, v.39, p. 4476–4484, 2005.

LEDDER, R. G.; TIMPERLEY, A. S.; FRISWELL, M. K.; MACFARLANE, S.; MCBAIN, A. J. Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, p. 630-636, 2008.

LEMAIRE, R.; WEBB R. I; YUAN, ZHIGUO. Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v.2, p. 528-541, 2008.

LI, X.; GAO, F.; HUA, Z.; DU, G.; CHEN, J. Treatment of Synthetic Wastewater by a Novel MBR with Granular Sludge Developed for Controlling Membrane Fouling. **Separation and Purification Technology**, v. 46, p. 19–25, 2005.

LI, Z.H.; KUBA, T.; KUSUDA, T. The Influence of Starvation Phase on the Properties and the Development of Aerobic Granules. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 670–674, 2006.

LIU, Y.; WANG, Z.-W.; QIN, L.; LIU, Y.-Q.; TAY, J.-H. Selection Pressure-driven Aerobic Granulation in a Sequencing Batch Reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 26–32, 2005.

LIU, Y.-Q. e TAY, J.-H. Influence of Starvation Time on Formation and Stability of Aerobic Granules in Sequencing Batch Reactors. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 980–985, 2008.

LIU, Y.; TAY, J.H. State of the Art of Biogranulation Technology for Wastewater Treatment. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 533–563, 2004.

LIU, Y.-Q.; WU, W.-W.; TAY, J.-H.; WANG, J.-L. Starvation is not a Prerequisite for the Formation of Aerobic Granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 211–216, 2007.

LIU, Y.; YANG, S.-F.; TAY, J.-H.. Improved Stability of Aerobic Granules by Selecting Slow-growing Nitrifying Bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 108, p. 161–169, 2004.

LOURES, A. P. S. “**Tratamento anaeróbio de efluentes de máquina de papel por biorreator convencional e biorreator de membranas**”. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia Florestal – Universidade Federal de Viçosa. 2007

MALIK, A.; KAKII, K. Novel coaggregating microbial consortium: Testing strength for field applications. **Bioresource Technology**, v.99, p. 4627-4634, 2008.

MALIK, A.; SAKAMOTO, M.; HANAZAKI, S.; OSAWA, M.; SUZUKI, T.; TOCHIGI, M.; KAKII, K. Coaggregation among Nonflocculating Bacteria Isolated from Activated Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6056-6063, 2003a.

MALIK, A.; SAKAMOTO, M.; ONO, T.; KAKII, K.; LEACH, S.A. Coaggregation between *Acinetobacter johnsonii* S35 and *Microbacterium esteraromaticum* Strains Isolated from Sewage Activated Sludge. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 10-15, 2003b.

MCSWAIN, B. S.; IRVINE, R. L.; HAUSNER, M.; WILDERER, P. A. Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1051-1057, 2005.

MEMBRANE DIAGRAM.JPG. Altura: 428 pixels. Largura: 283 pixels. 17Kb. Formato JPEG Image. **Disponível em:** http://www.zenon.com/image/resources/membrane_diagram.jpg. Acesso em: 17 de março de 2009.

METCALF e EDDY. **Wastewater engineering- Treatment, disposal, reuse**. 4th ed. New York : McGraw-Hill, 2003. 1819 p.

METZGER, Z.; BLASBALG, J.; DOTAN, M.; TSEHIS, I.; WEISS, E. I. Characterization of Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 with Six *Porphyromonas gingivalis* Strains. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 50-54, 2009.

MISHIMA, K. e NAKAMURA, M. Self-immobilization of Aerobic Activated Sludge - a Pilot Study of the Aerobic Upflow Sludge Blanket Process in Municipal Sewage Treatment. **Water Science and Technology**, v. 23, p. 981–990, 1991.

MORGENROTH, E.; SHERDEN, T. I.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J.; WILDERER, P. A. Aerobic Granular Sludge in a Sequencing Batch Reactor. **Water Research**, v. 31, n. 12, p. 3191-3194, 1997.

MOY, B.Y.P.; TAY, J.H.; TOH, S.K.; LIU, Y.; TAY, S.T.L. High Organic Loading Influences The Physical Characteristics of Aerobic Granules. **Letters In Applied Microbiology**, v. 34, p. 407–412, 2002.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. Norwel, MA, U.S.A.: Kluwe Academic Publisher, Philip Drive, 1991. 101p.

NAGAOKA, S.; HOJO, K.; MURATA, S.; MORI, T.; OHSHIMA, T.; MAEDA, N. Interactions between salivary *Bifidobacterium adolescentis* and other oral bacteria: in vitro coaggregation and coadhesion assays. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281, p. 183-189, 2008.

OLOFSSON, A. C.; ZITA, A.; HERMANSSON, M. Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. **Microbiology**, v. 144, p. 519-528, 1998.

PHUONG, K.; KAKII, K.; NIKATA, T. Intergeneric coaggregation of non-flocculating *Acinetobacter spp.* isolates with other sludge-constituting bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, p. 394-400, 2009.

POSTOLLEC, F.; NORDE, W.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Microcalorimetric study on the influence of temperature on bacterial coaggregation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.287, p. 461-467, 2005.

RAMESH, A.; LEE, D.J.; WANG, M.L.; HSU, J.P.; JUANG, R.S.; HWANG, K.J.; LIU, J.C.; TSENG, S.J. Biofouling in Membrane Bioreactor. **Separation Science And Technology**, v. 41, p. 1345, 2006.

RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HANDLEY, P.S. Influence of growth environment on coaggregation between freshwater biofilm bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1367-1373, 2004.

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, p. 94-100, 2003a.

RICKARD, A. H.; LEACH, S. A.; BUSWELL, C. M.; HIGH, N. J.; HANDLEY, P. S. Coaggregation between Aquatic Bacteria Is Mediated by Specific-Growth-Phase-Dependent Lectin-Saccharide Interactions. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, p. 431-434, 2000.

RICKARD, A. H.; LEACH, S. A.; HALL, L. S.; BUSWELL, C. M.; HIGH, N. J.; HANDLEY, P. S. Phylogenetic Relationships and Coaggregation Ability of Freshwater Biofilm Bacteria. **Applied And Environmental Microbiology**, v.68, p. 3644-3650, 2002.

RICKARD, A. H.; MCBAIN, A. J.; LEDDER R. G.; HANDLEY, P. S.; GILBERT, P. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 133-140, 2003b.

REN, N.; XIE, T.; XING, D. Composition of extracellular polymeric substances influences the autoaggregation capability of hydrogen-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5109-5113, 2009.

ROSEN, G.; GENZLER, T.; SELA, M. N. Coaggregation of *Treponema denticola* with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* is mediated by the major outer sheath protein of *Treponema denticola*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 289, p. 59-66, 2008.

SADR GHAYENI, S.B.; BEATSON, P.J.; SCHNEIDER, R.P.; FANE, A.G. Water reclamation from municipal wastewater using combined microfiltration-reverse osmosis (MF-RO): Preliminary performance data and microbiological aspects of system operation, **Desalination**, v. 116, p. 65-80, 1998

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Biofilm Interactions between Distinct Bacterial Genera Isolated from Drinking Water. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6192-6200, 2007.

SOUZA, C. A. “**Tratamento Termofílico Aeróbio de Efluente de Máquina de Papel Utilizando Biorreator a Membranas**”. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia Florestal – Universidade Federal de Viçosa. 2008.

STORK, D. “**An Investigation into Membrane Fouling from Algae-containing Waters**”. Tese de mestrado. School of Civil, Environmental and Chemical Engineering College of Science, Engineering and Technology - RMIT University, Melbourne, Australia. 2008.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**. n. 147, p. 3-9, 2001.

TAY, J. H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 22(7), p. 533-563, 2004.

TAY, J.-H.; LIU, Q.-S.; LIU, Y. The Role of Cellular Polysaccharides in the Formation and Stability of Aerobic Granules. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 222-226, 2001.

TAY, J.H.; YANG, P.; ZHUANG, W.Q.; TAY, S.T.L.; PAN, Z.H. Reactor Performance and Membrane Filtration in Aerobic Granular Sludge Membrane Bioreactor. **Journal of Membrane Science**, v. 304, p. 24–32, 2007.

TIJHUIS, L.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Formation and Growth of Heterotrophic Aerobic Biofilms on Small Suspended Particles in Airlift Reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 595–608, 1994.

TRUSSELL, R. S.; MERLO, R. P.; HERMANOWICZ, S. W.; JENKINS, D. Influence of Mixed Liquor Properties and Aeration Intensity on Membrane Fouling in a Submerged Membrane Bioreactor at High Mixed Liquor Suspended Solids Concentrations. **Water Research**, v. 41, p. 947 – 958, 2007.

VILLAIN, M.; SIMON, S.; BOURVEN, I.; GUIBAUD, G. The use of a new mobile phase, with no multivalent cation binding properties, to differentiate extracellular polymeric substances (EPS), by size exclusion chromatography (SEC), from biomass used for wastewater treatment. **Process Biochemistry**, 2010, doi:10.1016/j.procbio.2010.05.018.

VON SPERLING, M. **Princípios de Tratamento Biológico de Águas Residuárias - Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2 ed., Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. v. 1, 243p.

VON SPERLING, M. **Princípios de Tratamento Biológico de Águas Residuárias - Lodos Ativado**s. 2 ed. ampliada. Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, DESA, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. v. 4, 428p.

WANG, Q.; DUA, G.; CHEN J. Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 557–563, 2004.

WANG, J.; WANG, X.; ZHAO, Z.; LI, J. Organics and nitrogen removal and sludge stability in aerobic granular sludge membrane bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 679-685, 2008.

XU, H. e LIU, Y. Mechanisms of Cd²⁺, Cu²⁺ and Ni²⁺ Biosorption by Aerobic Granules. **Separation and Purification Technology**, v. 58, p. 400, 2008.

Y. LIU; YANG, S. F.; TAY, J. H.; LIU, Q. S.; QIN, L.; Y. LI. Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 371-379, 2004.

YANG, S.F.; LIU, Q.S.; TAY, J.H.; LIU, Y. Growth Kinetics of Aerobic Granules Developed in Sequencing Batch Reactors. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 106–112, 2004.

YARLAGADDA, V. N.; JOSHI, H. M.; MOHAN, T. V. K.; VENUGOPALAN, V. P.; NARASIMHAN, S. V. Formation of Aerobic Granules in the Presence of a Synthetic Chelating Agent. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 37-43, 2008.

ZHENG, Y. M.; YU, H. Q. Determination of the pore size distribution and porosity of aerobic granules using size-exclusion chromatography. **Water Research**, v.41, p. 39-46, 2007.

ZULARISAM, A.W., ISMAIL, A.F., SALIM, R. Behaviors of natural organic matter in membrane filtration for surface water treatment - a review, **Desalination**, v. 194, p. 211-231, 2006.

ANEXOS

ANEXO A – MEIOS DE CULTURA

Tabela A 1 - Composição do meio mineral

Componente	Unidade	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	g.L ⁻¹	2,8
KH ₂ PO ₄	g.L ⁻¹	2,0
Extrato de levedura	g.L ⁻¹	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	g.L ⁻¹	1,0
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	g.L ⁻¹	0,05
Citrato de Fe (III) amoniacal	g.L ⁻¹	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	g.L ⁻¹	0,02
Glicose	%	1,5

Tabela A 2 - Composição do meio caldo nutriente

Componente	Unidade	Quantidade
Peptona	g.L ⁻¹	5
Extrato de carne	g.L ⁻¹	3
NaCl	g.L ⁻¹	8

Tabela A 3 - Composição do meio R2A

Componente	Unidade	Quantidade
Extrato de levedura	g.L ⁻¹	0,5
Peptona proteose	g.L ⁻¹	0,5
Casaminoácidos	g.L ⁻¹	0,5
Glicose	g.L ⁻¹	0,5
Amido solúvel	g.L ⁻¹	0,5
K ₂ HPO ₄	g.L ⁻¹	0,3
Piruvato de sódio	g.L ⁻¹	0,3
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	g.L ⁻¹	0,05

Tabela A 4 - Composição do meio caldo LB

Componente	Unidade	Quantidade
Bacto triptona	g.L ⁻¹	10
Extrato de levedura	g.L ⁻¹	5
Cloreto de sódio	g.L ⁻¹	10

ANEXO B – MANUTENÇÃO DAS CULTURAS NO ULTRAFREEZER

- Com uma alça de repicagem, transferir uma colônia isolada para um tubo de rosca estéril, contendo 2 mL de meio de cultura apropriado. Misturar e incubar por aproximadamente 12 horas. Verificar turvação do meio.
- A um tubo de eppendorf estéril e devidamente identificado, adicionar 400 µL de glicerina estéril a 80% e 600 µL da cultura.
- Misturar em vórtex e congelar em nitrogênio líquido. Estocar a -80°C.