



UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

**Biorreatores de Grânulos Aeróbios para
Tratamento de Águas Residuais Têxteis**

Ana Maria Álvares Tavares da Mata

Orientadora: Doutora Helena Maria Rodrigues Vasconcelos Pinheiro

Co-Orientadora: Doutora Nídia Dana Mariano Lourenço de Almeida

**Tese aprovada em provas públicas para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia
do Ambiente**

Qualificação atribuída pelo Júri : Aprovada com Muito Bom com Distinção

Júri

Presidente: Presidente do Conselho Científico do IST

Vogais:

Doutora Isolina Maria da Silva Cabral Gonçalves

Doutora Helena Maria Rodrigues Vasconcelos Pinheiro

Doutora Ana Cristina Anjinho Madeira Viegas

Doutora Gilda de Sousa Carvalho Oehmen

2015

(intencionalmente em branco)



UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

**Biorreatores de Grânulos Aeróbios para
Tratamento de Águas Residuais Têxteis**

Ana Maria Álvares Tavares da Mata

Orientadora: Doutora Helena Maria Rodrigues Vasconcelos Pinheiro

Co-Orientadora: Doutora Nídia Dana Mariano Lourenço de Almeida

**Tese aprovada em provas públicas para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia
do Ambiente**

Qualificação atribuída pelo Júri : Aprovada com Muito Bom com Distinção

Júri

Presidente: Presidente do Conselho Científico do IST

Vogais:

Doutora Isolina Maria da Silva Cabral Gonçalves, Professora Associada da
Universidade da Beira Interior

Doutora Helena Maria Rodrigues Vasconcelos Pinheiro, Professora Auxiliar do
Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa

Doutora Ana Cristina Anjinho Madeira Viegas, Professora Auxiliar do Instituto
Superior Técnico da Universidade de Lisboa

Doutora Gilda de Sousa Carvalho Oehmen, Investigadora Pós-Doc da Faculdade de
Ciências e Tecnologia

2015

(intencionalmente em branco)

RESUMO

A presente tese pretende contribuir para a prevenção da poluição associada às águas residuais da indústria têxtil. Desenvolveu-se um método para a quantificação da biodescoloração reductiva de corantes azo por lamas ativadas, tendo em vista a seleção dos corantes mais suscetíveis a esta transformação. Estudou-se a aplicabilidade de lamas granulares aeróbias ao tratamento de efluentes têxteis. A granulação foi conseguida num reator descontínuo sequencial não tubular inoculado com lamas em flocos, operado num ciclo de 6 h em regime aeróbio total, com 3 minutos de sedimentação e com um derivado de amido usado na encolagem como substrato carbonáceo. Os grânulos armazenados durante 7 meses mantiveram bons níveis de integridade e viabilidade. A experiência foi repetida no mesmo reator, introduzindo-se uma fase anaeróbia de 3 h e um corante azo. O nível de biodescoloração obtido ultrapassou 80% mas a granulação foi incompleta, com acumulação de exopolímeros na forma dispersa. A granulação foi favorecida pela presença do corante e pela opção por um ciclo reacional com arejamento intermitente. Foram testados pós-tratamentos ao efluente do biorreator usando ozonização e radiação UV, obtendo-se bons resultados na conversão dos metabolitos da biodescoloração. O terceiro ensaio no biorreator foi inoculado com grânulos aeróbios já desenvolvidos em ETAR, com redução da duração da fase anaeróbia em 50%. A idade de lamas foi determinante, dado que valores elevados da mesma permitiram a conversão de metabolitos na fase aeróbia obtendo-se a eliminação de amins aromáticas recalcitrantes. Os resultados apontam para um excelente potencial dos biorreatores com grânulos aeróbios no tratamento de efluentes têxteis.

Palavras Chave: Lamas aeróbias granulares; biodegradação de corantes azo; biorredução; inibidores; regime de alimentação; reator descontínuo sequencial, água residual têxtil, ozonização, irradiação UV, reator não-tubular

ABSTRACT

The present work aims to contribute to pollution prevention in relation to textile wastewaters. A method to quantify the reductive biodecoloration of azo dyes by activated sludge was developed, enabling the choice of dyes with higher susceptibility for this conversion. The treatment of simulated textile effluents with aerobic granular sludge was tested. Granulation was obtained in a non-tubular, sequential batch reactor seeded with flocculent sludge, operated on a 6-h, fully aerated cycle, with 3 minutes of settling and a starch derivative used in sizing as carbon substrate. The obtained granules maintained good integrity and viability levels after a 7-month storage period. The experiment was replicated in the same bioreactor, introducing a 3-h anaerobic phase and an azo dye. Biodecoloration yields above 80% were obtained but granulation was incomplete, with accumulation of dispersed exopolymers. Granulation was favored by the presence of dye and the use of intermittent aeration in the reaction cycle. Ozonation and UV irradiation were applied to the reactor's effluent, with good results in the conversion of the biodecoloration metabolites. A third bioreactor experiment was inoculated with aerobic granules developed in a full-scale plant, with the anaerobic phase duration reduced by 50%. The sludge age was determinant since high values allowed the conversion of metabolites in the aerobic phase resulting in the removal of recalcitrant aromatic amines. The results indicate an excellent potential of aerobic granule bioreactors for the treatment of textile wastewaters.

Key words: Aerobic granular sludge; azo dye biodegradation; bioreduction; inhibitors; feeding regime; sequencing batch reactor; textile wastewater; ozonation, UV irradiation, non-tubular reactor.

AGRADECIMENTOS

À Professora Helena Pinheiro por me ter aceitado como sua orientanda apesar de saber das dificuldades adicionais envolvidas, pelo facto do tempo disponível para a sua realização ter de ser conciliado com as atividades de docência. Agradeço ainda todo o seu apoio, sempre positivo e motivador em todo o decurso do trabalho, e a sua excelente orientação científica.

À Doutora Nídia Lourenço agradeço o facto de me ter incluído no seu projeto BIOTEXTILE no âmbito do qual decorreu este trabalho de doutoramento e de onde vieram os meios para a sua concretização. Agradeço a sua co-orientação científica, toda a partilha de conhecimentos, o apoio e ajuda prestada, e toda a amizade ao longo destes anos. A sua maneira alegre e entusiasta de viver a ciência é contagiante para todos nós!

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) agradeço a bolsa PROTEC (SFRH/BD/49432/2009) e ao Instituto Politécnico de Setúbal agradeço a manutenção das condições PROTEC inicialmente suportadas pela FCT em termos de propinas e redução do serviço docente. Sem a dispensa de 50% do serviço docente concedida pelo IPS teria sido impossível concretizar este trabalho, pois os reatores biológicos em contínuo necessitavam de uma disponibilidade diária total (a parte laboratorial foi sempre realizada no semestre de dispensa).

Agradeço à Royal Haskoning DHV e SIMTEJO por gentilmente nos terem cedido o inóculo de grânulos aeróbios proveniente da ETAR de Frielas utilizados na última experiência de granulação. Agradeço ainda à SIMTEJO, na pessoa da Eng^a Isabel Bronze, a total disponibilidade para as várias recolhas de lamas ativadas que foram efetuadas ao longo deste trabalho na ETAR de Chelas.

À Manuela (Manú) agradeço o apoio na realização dos testes *life/dead* bem como o seu sentido de humor único. À Rita (Franca) agradeço todo o trabalho laboratorial realizado na experiência com os grânulos da ETAR de Frielas que orientei. A sua enorme capacidade de trabalho e dedicação fizeram com que os resultados obtidos em todo o processo fossem excelentes.

Agradeço à Carla Carvalho as imagens por ela obtidas no que respeita à observação dos grânulos após aplicação do *kit* de coloração para aos estudos de viabilidade.

A todos os colegas do laboratório agradeço o óptimo ambiente existente que tornou mais leve todo este tempo de trabalho. Obrigada pela amizade, pela ajuda que me deram sempre que necessitei, relativamente ao laboratório ou outras questões. Obrigada por todas as gargalhadas que dei convosco, ou por vossa causa, os vários bolos de aniversário e muitos outros convívios. Um especial agradecimento à Renata, grande companheira de laboratório e gabinete.

Ao meu colega da ESTSetúbal Professor Ricardo Salgado agradeço o apoio prestado de tão diferentes maneiras, mas em especial na ajuda pessoal na manutenção da minha dispensa de serviço docente no 2º semestre durante estes anos. E à Engª Dina, a nossa inestimável garante do laboratório em Setúbal, agradeço todo o trabalho e dedicação posta na manutenção e seguimento do reator que por lá estive uns meses.

À minha mãe que tanto se preocupou com o meu doutoramento. Agradeço todo o apoio que me deu, como sempre, bem como o apoio ao resto da família que me tiveram menos.

Ao Carlos. Por toda a compreensão durante estes anos pelas ausências físicas e não só, apoiando-me e incentivando-me incondicionalmente. Por todos os muitos dias, e muitas vezes seguidos, em que foi pai solteiro sem um queixume. Sem ele este trabalho não existiria.

À minha filha Teresa que disse uma vez que eu gostava mais dos meus bichos do técnico do que dela, porque até ao fim de semana ia para lá. Meu amor, tu sabes que és sempre o mais importante para mim.

ABREVIATURAS

AGS - Lamas Ativadas Granulares

ALE – Polímeros do tipo alginato (*Alginate-Like Exopolymers*)

AOP – Processos Avançados de Oxidação (*Advanced Oxidation Processes*)

AR14 – corante Acid Red 14 (Chromotrope FB)

4A1NS – 4-amino-1-naftaleno-sulfonato

2A4H1NS - 2-amino-4-hidroxi-1-naftaleno-sulfonato

4H1NS – 4-hidroxi-1-naftaleno-sulfonato

CBO₅ – Carência Bioquímica de Oxigênio aos 5 dias

COD – Carência Química de Oxigênio (*Chemical Oxygen Demand*)

EPS – Substâncias Poliméricas Extra-celulares (*Extracellular Polymeric Substances*)

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

F/M – Razão alimento/microrganismos (*Food-to-Microorganism Ratio*)

HPLC – Cromatografia de Alta Pressão

MLVSS – Sólidos Suspensos Voláteis no Licor Mão

OUR – Taxa de Consumo de Oxigênio (*Oxygen Uptake Rate*)

QS – *Quorum Sensing*

RSD - Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)

SBR – Reactor Descontínuo Sequencial (*Sequential Batch Reactor*)

SBAR - Reactor Descontínuo Sequencial Agitado por Ar (*Sequencing Batch Airlift Reactor*)

SOUR – Taxa Específica de Consumo de Oxigênio (*Specific Oxygen Uptake Rate*)

TSS – Sólidos Suspensos Totais (*Total Suspended Solids*), neste trabalho todos os sólidos medidos no reator e efluente para avaliação da biomassa são TSS (a menos que devidamente especificado)

SVI – Índice de Volume de Lamas (*Sludge Volume Index*)

FISH – Hibridização fluorescente *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

TOC – Carbono Orgânico Total (*Total Organic Carbon*)

SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento (*Scanning Electron Microscopy*)

STD - Desvio Padrão (*Standard Deviation*)

MLVSS – Sólidos Suspensos Voláteis no reator (*Mixed Liquor Volatile Suspended Solids*),

(intencionalmente em branco)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Enquadramento e relevância do tema	3
1.2	Objetivos da dissertação.....	3
1.3	Estrutura da Dissertação.....	3
2	ÁGUAS RESIDUAIS TÊXTEIS E SEU TRATAMENTO.....	7
2.1	Resumo.....	8
2.2	Águas Residuais Têxteis.....	9
2.2.1	A indústria têxtil e o seu impacto no ambiente.....	9
2.2.2	Quantidades e caracterização	9
2.2.3	Corantes azo	14
2.2.3.1	Utilizações e estruturas químicas	14
2.2.3.2	Perigos para a saúde humana e o ambiente associados a corantes azo	18
2.2.4	Normas aplicáveis à indústria têxtil e seus efluentes na União Europeia	23
2.4	Remoção de corantes azo de efluentes de indústrias têxteis	26
2.4.1	Introdução.....	26
2.4.2	Processos físico-químicos	26
2.4.3	Remoção biológica de corantes azo.....	29
2.4.3.1	Visão Geral	29
2.4.3.2	Degradação de corantes por bactérias em condições aeróbias	32
2.4.3.3	Degradação de corantes por bactérias em condições anaeróbia	33
2.4.3.4	Degradação de corantes por bactérias em sistemas anaeróbios/aeróbios.....	35
2.4.4	Processos combinados físico-químicos e biológicos	38
2.4.5	Mecanismos de degradação de corantes azo	40
2.4.5.1	Mecanismos de redução anaeróbia de corantes azo.....	40
2.4.5.2	Mecanismo da oxidação aeróbia de aminas provenientes da redução de corantes azo	44
3	BIORREATORES DE GRÂNULOS AERÓBIOS	47
3.1	Resumo.....	48
3.2	O processo de lamas ativadas: grânulos versus flocos	49
3.3	Características dos grânulos aeróbios	52
3.3.1	Definição de grânulo aeróbio.....	52
3.3.2	Mecanismo de formação dos grânulos aeróbios	52
3.3.3	Funções biológicas	53
3.4	Fatores que influenciam a formação de grânulos aeróbios.....	54
3.4.1	Configuração do biorreator	55
3.4.2	Tempo de sedimentação	57

3.4.3	Tensão de corte (Shear stress)	57
3.4.4	Tempo de retenção hidráulico	58
3.4.5	Oxigênio dissolvido e temperatura.....	59
3.4.6	Tipo de substrato e carga orgânica alimentada	60
3.4.7	Formação de polímeros extra celulares (EPS)	61
3.4.8	Hidrofobicidade celular	62
3.4.9	Fase aeróbia de fome (ausência de substrato).....	63
3.4.10	Seleção de organismos de crescimento lento com acumulação anaeróbia de substrato no interior das células.....	64
3.4.11	Quorum-sensing.....	66
3.5	Tratamento de águas residuais industriais com grânulos aeróbios	67
3.6	Aplicação de SBR de grânulos aeróbios no tratamento de efluentes têxteis	71
4	DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE BIODESCORAÇÃO DE CORANTES AZO	75
4.1	Resumo.....	76
4.2	Introdução.....	77
4.3	Materiais e métodos.....	79
4.3.1	Soluções, substratos e Inóculos	79
4.3.2	Sistema Experimental.....	81
4.3.3	Métodos Analíticos	83
4.3.4	Estratégia Experimental.....	83
4.4	Resultados e Discussão.....	85
4.4.1	Robustez do inóculo	85
4.4.1.1	Inóculo fresco e utilizado após sujeito a um regime de fome.....	85
4.4.1.2	Influência de diferentes inóculos e da disponibilidade da fonte de carbono	86
4.4.2	Adsorção à biomassa	88
4.4.3	Desenvolvimento do controlo abiótico	89
4.4.3.1	Inibição por azida de sódio e dicumarol	89
4.4.3.2	Estudo da Inativação física por autoclavagem, sonicação, ou microondas combinada ou não com a presença de inibidores.....	94
4.4.3.3	Estudo da influência da inativação física por autoclavagem e da presença de inibidores na adsorção de corantes azo à biomassa.....	97
4.5	Resumo do método biodescoloração proposto e suas vantagens.....	98
4.6	Conclusões	99
5	DESENVOLVIMENTO DE BIOMASSA AERÓBIA GRANULAR NUM REATOR NÃO TUBULAR AREJADO E SUA REATIVAÇÃO APÓS ARMAZENAGEM.....	101
5.1	Resumo.....	102
5.2	Introdução.....	103

5.3	Materiais e Métodos.....	104
5.3.1	Inóculo e substratos.....	104
5.3.2	Sistema Experimental.....	105
5.3.3	Métodos Analíticos	106
5.3.4	Estratégia Experimental.....	108
5.4	Resultados e Discussão.....	111
5.4.1	Primeira experiência - Propriedades de sedimentação, concentração da biomassa e morfologia da biomassa	111
5.4.2	Primeira experiência - Eficiência do tratamento.....	119
5.4.3	Segunda experiência - Propriedades de sedimentação, concentração e morfologia da biomassa	123
5.4.4	Segunda Experiência - Eficiência do tratamento	129
5.5	Conclusões	131
6	 GRANULAÇÃO DE LAMAS ATIVADAS NUM SBR ANAERÓBIO-AERÓBIO USADO NO TRATAMENTO DE UM EFLUENTE TÊXTIL SIMULADO.....	133
6.1	Resumo.....	134
6.2	Introdução	135
6.3	Materiais e Métodos.....	136
6.3.1	Inóculo e substratos.....	136
6.3.2	Sistema Experimental.....	137
6.3.3	Métodos Analíticos	138
6.3.4	Estratégia Experimental.....	140
6.4	Resultados e Discussão.....	143
6.4.1	Concentração da biomassa, propriedades de sedimentação e morfologia	143
6.4.2	Eficiência do tratamento	150
6.4.2.1	Transformação da fonte de carbono	150
6.4.2.2	Consumo específico de oxigênio e pH.....	153
6.4.2.3	Descoloração do corante	155
6.4.2.4	Potencial de oxidação redução (ORP).....	159
6.5	Conclusões	162
7	 TRATAMENTO DUM EFLUENTE TÊXTIL SIMULADO EM BIORREATOR LABORATORIAL INOCULADO COM GRÂNULOS AERÓBIOS DA ETAR DE FRIELAS	165
7.1	Resumo.....	166
7.2	Introdução	167
7.3	Materiais e Métodos.....	167
7.3.1	Inóculo e substratos.....	168
7.3.2	Sistema Experimental.....	169
7.3.3	Métodos Analíticos	170
7.3.4	Estratégia Experimental.....	172

7.4	Resultados e Discussão.....	174
7.4.1	Influência das condições hidrodinâmicas do SBR não tubular na integridade dos grânulos aeróbios 174	
7.4.2	Evolução da biomassa e eficiências de remoção de corante e carga orgânica.....	176
7.4.3	Descoloração e seus metabolitos.....	179
7.5	Conclusões.....	185
8	OZONIZAÇÃO E IRRADIAÇÃO UV DE UM EFLUENTE TÊXTIL SIMULADO APÓS BIOTRATAMENTO EM SBR.....	187
8.1	Resumo.....	188
8.2	Introdução.....	189
8.3	Materiais e Métodos.....	189
8.3.1	Amostra de efluente de SBR em estudo.....	189
8.3.2	Descrição de processos de oxidação avançada (AOP) utilizados.....	190
8.3.2.1	Ozonização.....	190
8.3.2.2	Irradiação UV.....	190
8.3.3	Ensaio de tratamento biológico após aplicação de AOP.....	191
8.3.4	Métodos Analíticos.....	192
8.4	Resultados e Discussão.....	194
8.4.1	Ozonização.....	194
8.4.2	Irradiação UV.....	197
8.4.3	Efeito do tratamento biológico após aplicação de AOP.....	198
8.4.4	Comparação entre os AOP aplicados e a degradação biológica aeróbia obtida em SBR com inóculo AGS da ETAR de Frielas.....	200
8.5	Conclusões.....	201
9	CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO.....	203
9.1	Conclusões.....	205
9.2	Perspetivas de trabalho futuro.....	207
	BIBLIOGRAFIA.....	209
	ANEXO Produção científica no âmbito do doutoramento.....	22123

1 INTRODUÇÃO

(intencionalmente em branco)

1.1 Enquadramento e relevância do tema

Em termos ambientais, as águas residuais da indústria têxtil são das mais poluentes e levam em muitos casos à degradação da qualidade dos meios hídricos recetores, ou seja, têm um impacto ambiental muito negativo a nível mundial. A indústria têxtil gera elevadas quantidades de águas residuais, com elevadas cargas orgânicas e cor, esta última conferida na larga maioria dos casos por corantes azo (por vezes também denominados corantes azóicos). O tratamento destas águas residuais em termos de custo e qualidade do efluente final coloca um desafio importante e atual na proteção do meio ambiente.

1.2 Objetivos da dissertação

Pretende-se com esta dissertação contribuir para a proteção do meio ambiente estudando a aplicabilidade das lamas aeróbias granulares no tratamento biológico de efluentes têxteis contendo corantes azo. A tecnologia de granulação aeróbia utiliza reatores sequenciais descontínuos (SBR), que podem ter fases anaeróbias e aeróbias, com ciclos usualmente curtos e tempos de sedimentação de poucos minutos. Se for aplicada com sucesso ao tratamento de efluentes têxteis constitui uma solução economicamente vantajosa para o tratamento destes efluentes.

1.3 Estrutura da Dissertação

A presente dissertação é composta por nove capítulos. O capítulo 1 refere-se ao enquadramento e estrutura da tese. Os capítulos 2 e 3 fazem uma revisão de conhecimentos em dois aspetos da tese. Nos capítulos 4 a 8 apresenta-se o trabalho experimental, os seus resultados e a respetiva discussão. O capítulo 9 reúne as conclusões principais do trabalho desenvolvido e perspectivas para a sua continuação.

O presente capítulo 1 é dedicado ao enquadramento e explicação da relevância do tema da dissertação, referindo os objetivos principais e a estrutura do trabalho.

O capítulo 2 está subdividido em dois temas principais. No primeiro aborda-se o impacto da indústria têxtil no ambiente no que respeita às águas residuais por ela geradas, suas quantidades e caracterização e é apresentada uma revisão mais aprofundada sobre corantes têxteis do tipo azo. É também efetuado o enquadramento legal, referindo-se as disposições regulamentares europeias e nacionais aplicáveis neste âmbito. O segundo tema

constitui uma revisão de conhecimentos sobre as tecnologias disponíveis para o tratamento de efluentes têxteis, em particular no que diz respeito à remoção de corantes. São revistos os processos de tratamento físico-químicos e biológicos, bem como as alternativas de combinação dos dois. É ainda abordado de forma mais detalhada o mecanismo de biorredução de corantes.

O capítulo 3 reporta-se à revisão do estado actual de conhecimentos sobre biorreatores de lamas granulares aeróbias. As suas vantagens face aos processos convencionais de lamas ativadas são aqui apresentadas, bem como as suas características, abordando-se a definição de grânulo aeróbio, os seus mecanismos de formação e funções biológicas. São apresentados os vários fatores que podem influenciar a formação e o desempenho de grânulos aeróbios e são resumidos exemplos típicos da sua aplicação ao tratamento de águas residuais industriais e em particular de efluentes têxteis.

No capítulo 4 apresentam-se os ensaios de biodescoloração anaeróbia de corantes azo por lamas ativadas desenvolvidos para a conceção de um teste rápido para a seleção de corantes mais amigos do ambiente. Estes testes incluíram aspetos de robustez face à variabilidade do inóculo, de presença ou ausência de fonte de carbono, e de desenvolvimento do controlo abiótico, com estudos na presença de inibidores (azida de sódio e dicumarol) e envolvendo inativação física da biomassa (autoclavagem, aplicação de microondas, sonicação).

No capítulo 5 apresenta-se o primeiro ensaio de aplicação de grânulos aeróbios ao tratamento dum efluente têxtil simulado, ainda na ausência de corante. Foi estudado o desenvolvimento de lamas granulares aeróbias a partir de lamas ativadas de morfologia em flocos num reator sequencial descontínuo (SBR) com um valor de razão altura/diâmetro de 2,5, uma geometria não tubular diferente da usualmente reportada na literatura. O reator foi operado com ciclos de 6 h, com fase de reação totalmente aeróbia (5 h) e uma renovação de volume por ciclo de 50%. A fonte de carbono alimentada foi um derivado de amido usado em encolagem de têxteis. Foi ainda estudada a robustez da biomassa granular obtida face a um armazenamento prolongado, utilizando-a para reinício da operação do biorreator após um período de paragem de 7 meses.

No capítulo 6 apresenta-se o segundo ensaio em biorreator SBR com o objetivo de estudar a possibilidade de desenvolvimento de grânulos aeróbios na presença de um efluente têxtil simulado contendo o corante azo *Acid Red 14*, bem como o desempenho do sistema de tratamento desenvolvido. Também aqui se partiu de lamas ativadas em flocos e o biorreator SBR foi operado nas mesmas condições do ensaio anterior, tendo-se introduzido uma fase

anaeróbia de 3 h na etapa reacional de 5 h. Testou-se a alternativa de operação desta etapa reacional em regime de arejamento intermitente.

No capítulo 7 apresenta-se o terceiro ensaio em SBR com grânulos aeróbios. O objetivo deste trabalho foi estudar este sistema partindo de um inóculo de grânulos aeróbios já formados, provenientes da ETAR de Frielas (Loures), no tratamento de um efluente têxtil simulado contendo o corante azo *Acid Red 14*. A duração da fase de reação anaeróbia do ciclo foi reduzida para 1,5 h com vista a favorecer a estabilidade dos grânulos, tendo em conta os resultados do ensaio anterior. Estudou-se o desempenho do sistema com um valor de idade de lamas elevado, bem como o efeito do ajuste do valor desta para gamas usualmente reportadas no tratamento destes efluentes com lamas ativadas em flocos.

No capítulo 8 apresentam-se os estudos da aplicação de processos de oxidação avançada, nomeadamente ozonização e irradiação na gama ultravioleta (UV), ao efluente têxtil pré-tratado em SBR. O objetivo foi conseguir-se a eliminação da amina 4-amino-1-naftaleno-sulfonato (4A1NS), um dos metabolitos primários resultantes da biorredução do corante AR14, cuja persistência no efluente tratado em SBR tinha sido constatada. Os testes foram seguidos por análises em HPLC e espectrométricas pretendendo-se averiguar a extensão da eliminação de metabolitos detetáveis por estes métodos analíticos.

No capítulo 9 apresentam-se as conclusões principais do trabalho desenvolvido e perspectivas de trabalho futuro.

O documento principal é completado com a lista de bibliografia referida.

No anexo 1 apresenta-se a produção científica resultante deste trabalho de doutoramento.

(intencionalmente em branco)

2 ÁGUAS RESIDUAIS TÊXTEIS E SEU TRATAMENTO

2.1 Resumo

Neste capítulo apresenta-se uma revisão da informação disponível sobre a indústria têxtil e suas águas residuais e em seguida discutem-se as possibilidades conhecidas para o tratamento destas últimas. Este capítulo está, assim, subdividido em dois temas. No primeiro, aborda-se o impacto da indústria têxtil no ambiente no que respeita às águas residuais por ela geradas, suas quantidades e caracterização. É também apresentada uma revisão mais aprofundada sobre um grupo específico de constituintes destes efluentes, os corantes azo, cobrindo a sua utilização, estruturas químicas, toxicidade e bioacumulação. É também apresentado o presente enquadramento legal, referindo-se as disposições regulamentares europeias e nacionais aplicáveis. O segundo subcapítulo constitui uma revisão do conhecimento presente sobre as tecnologias disponíveis para o tratamento de águas residuais têxteis. São revistos os processos de tratamento físico-químicos e biológicos, bem como a combinação dos dois. É ainda abordado, de forma mais detalhada, o conhecimento atual sobre mecanismos de redução de corantes do tipo azo por via biológica.

2.2 Águas Residuais Têxteis

2.2.1 A indústria têxtil e o seu impacto no ambiente

A indústria têxtil consome grandes volumes de água e produtos químicos nos seus processos de manufatura. São utilizados produtos químicos com composições diversas, desde compostos inorgânicos, a polímeros e outros compostos orgânicos (Robinson et al. 2001). Destes últimos destacam-se os corantes. Com o aumento da procura de produtos têxteis a nível mundial, a indústria têxtil e respetivas águas residuais têm aumentado proporcionalmente a sua relevância (dos Santos et al. 2007). Esta indústria gera assim elevadas quantidades de águas residuais, em geral apresentando cor e elevadas cargas orgânicas, que causam um impacto ambiental muito negativo. O seu tratamento em termos de custo e qualidade do efluente final coloca um desafio importante e atual na proteção do meio ambiente.

2.2.2 Quantidades e caracterização

Sendo a água um recurso cada vez mais escasso em termos de qualidade ou mesmo de quantidade em certas zonas do globo, um dos aspetos ambientais relevantes da indústria têxtil é o seu elevado consumo de água. Isto por sua vez, conjugado com a utilização de diversos produtos químicos nos diferentes processos têxteis gera o aspeto ambiental mais importante que é a deterioração da qualidade dos recursos hídricos a jusante da zona de implantação destas indústrias. Tal pode mesmo, conduzir à inviabilização total da utilização destes recursos (especialmente em países menos desenvolvidos) devido à carga poluente aí introduzida pela descarga dos efluentes têxteis.

Na Europa é estimado um consumo de água pelo setor têxtil entre os 50 a 240 m³/ton de produto têxtil (EWA 2005) e em Portugal os dados dum estudo envolvendo 34 empresas apontam para valores semelhantes de 35 a 325 m³/ton (Citeve 2012). Na Tabela 2.1 são apresentadas estimativas de água consumida e carga orgânica gerada por etapa de processo de ultimização. Esta tabela foi elaborada com base em dados fornecidos por empresas têxteis da Itália e da Bélgica e foi considerada representativa da indústria têxtil na Europa (EWA 2005).

Verifica-se que existem grandes variações de concentração e composição entre os efluentes têxteis, não apenas entre tipos diferentes de processos, mas também para processos semelhantes quando utilizam diferentes fibras têxteis (EWA 2005), o que torna difícil tipificar a composição destes efluentes.

Tabela 2.1 Consumo de água e produção de carga orgânica no efluente têxtil dum conjunto de empresas Italianas e Belgas, por etapa de processo de ulimação (adaptado de EWA, 2005).

	Média do Consumo de água (% relativamente ao consumo total de água da empresa)	Média da Carga Orgânica gerada (% relativamente à carga orgânica total produzida na empresa)
Instalações gerais	14	2
Preparação	36	61
Tingimento	29*	23*
Estamparia	55*	59*
Secagem	0,4	0,1
Lavagem	28	13
Acabamento	1	3

* valores médios incluindo apenas as empresas que possuíam processos de tingimento e estamparia

Os aspetos ambientais são mais significativos nas empresas com processos produtivos de ulimação (que inclui a preparação, tingimento, estamparia e acabamento) em que se utiliza uma grande quantidade e diversidade de produtos químicos. Processos como a fiação, tecelagem ou confeção utilizam apenas quantidades marginais de produtos químicos. O processo de pré-tratamento e lavagem da lã virgem é aquele que gera águas residuais com maior carga orgânica (Correia et al. 1994, Citeve 2012), podendo atingir os 60000 mgO₂/L de CBO₅ (Bisschops e Spanjers 2003). Da mesma forma, a preparação e lavagem do algodão é também para esta fibra o processo que gera maior carga orgânica nas águas residuais (Bisschops e Spanjers 2003).

Os produtos químicos utilizados podem-se agrupar resumidamente em 3 grupos: corantes, outras substâncias químicas e produtos auxiliares. Na Tabela 2.2, estes grupos e os seus respetivos consumos específicos encontram-se descritos de acordo com dados de Citeve (2012).

Tabela 2.2 Produtos químicos utilizados nos processos têxteis. Adaptado de Citeve (2012).

Produtos químicos utilizados nos processos têxteis			
Corantes	Ácidos, reativos, diretos, dispersos, etc.	Dependem da fibra Dependem do tipo de tingimento ou estamparia pretendido	Consumo específico de corantes: 7 - 90 kg/ton
Outras substâncias químicas	Soda cáustica (NaOH), peróxido de hidrogénio, sal (cloreto de sódio), hidrossulfito de sódio, ácido acético, carbonato de sódio, ureia, etc.	Dependem to tipo de fibra e tratamento que se pretende realizar	Consumo específico de outras substâncias químicas e auxiliares: 100 – 700 kg/ton
Produtos auxiliares	Tensioativos, sequestrantes, estabilizantes, molhantes, amaciadores, agentes ignifugos, aromas, etc.	São normalmente misturas de substâncias químicas Muito variáveis em função do processo e produto pretendido	

O efluente têxtil típico é maioritariamente resultante dos processos de tingimento e estamparia e tem como principal característica a cor e a elevada carga orgânica, e no geral apresenta baixas concentrações de metais pesados. A composição dos efluentes têxteis, como já referido é muito variável, como se pode observar na Tabela 2.3. Nesta são apresentadas gamas de valores de composição de efluentes descarregados em Portugal em coletor (Citeve 2012), valores para o “efluente médio” das indústrias do Vale do Ave (Silva 1999); gamas de valores para efluentes têxteis provenientes de diferentes processos (Correia et al. 1994) e valores característicos de um efluente têxtil de carga média indicados por Lin e Peng (1994).

Em geral verifica-se que devido às características dos respetivos processos os efluentes gerados pela indústria têxtil algodoeira apresentam valores de pH na gama alcalina e os efluentes gerados pela indústria têxtil laneira apresentam valores de pH de gama ácida (Lourenço 2003).

Relativamente à cor, é difícil encontrar reportados valores típicos para o seu teor em efluentes têxteis, dada a sua extrema variabilidade. Nas referências à cor nas normas de descarga após pré-tratamento ou tratamento do efluente, esta é expressa usualmente em termos de obrigatoriedade da sua ausência a um determinado grau de diluição.

(intencionalmente em branco)

Tabela 2.3 Exemplos de caracterização de efluentes líquidos têxteis.

Parâmetro	Efluentes líquidos de empresas têxteis com ulimação (Citeve 2012)	Efluente médio das indústrias do Vale do Ave (Silva 1999)	Média de valores para efluentes têxteis (adaptado de Correia et al. 1994) ⁽¹⁾	Água residual típica de carga média (Lin e Peng 1994)
pH	5 - 12	10	7 - 11	9
Temperatura (°C)	16 - 41	---	20 - 62	28
Carência bioquímica de oxigênio (CBO ₅) (mg/L O ₂)	9 - 2 600	200	250 - 350	270
Carência química de oxigênio (COD) (mg/L O ₂)	100 - 11 000	680	800 - 1200	970
Sólidos suspensos totais (TSS) (mg/L)	3 - 2500	55	75 - 300	137
Condutividade (mS/Cm)	0,2 - 11,9	---	---	2,5
Óleos e gorduras (mg/L)	11 - 137	---	14 - 53	21
Carbono Orgânico Total (COT) (mg/L)	140 - 170	---	---	---
Azoto Total (mg/L N)	3 - 73	---	---	---
Azoto amoniacal (mg/L NH ₄)	0,2 - 50	---	---	---
Nitratos (mg/L NO ₃)	27 - 35	---	---	---
Nitritos (mg/L NO ₂)	0,0 - 3,6	---	---	---
Fósforo Total (mg/L P)	2,0 - 5,6	---	---	---
Sulfatos (mg/L SO ₄)	18 - 38	---	---	---
Hidrocarbonetos totais (mg/L)	2 - 140	---	---	---
Cloro residual (mg/L Cl ₂)	0,0 - 0,5	---	---	---
Cloretos (mg/L Cl)	20 - 3800	---	---	---
Sulfuretos (mg/L S)	1 - 12	---	0,1 - 8	---
Detergentes aniônicos (mg/L)	0,1 - 8,4	---	---	---
Cianetos totais (mg/L CN)	0,0 - 0,1	---	---	---
Fenóis (mg/L)	< 0,04 - 0,05	---	0,04 - 0,5	---
Ferro (mg/L Fe)	0,2 - 1,4	---	---	---
Cobre (mg/L Cu)	0,1 - 0,4	---	---	---
Alumínio (mg/L Al)	< 1 - 22	---	---	---
Chumbo (mg/L Pb)	0,0 - 0,3	---	---	---
Crómio total (mg/L Cr)	0,03 - 1,40	---	0,01 - 4	---
Crómio hexavalente [mg/L Cr (VI)]	0,0 - 2,0	---	---	---
Crómio trivalente [mg/L Cr (III)]	0,2 - 2,0	---	---	---
Cádmio (mg/L Cd)	0,00 - 0,10	---	---	---
Níquel (mg/L Ni)	0,01 - 0,20	---	---	---
Zinco (mg/L Zn)	< 0,07 - 1,70	---	---	---
Boro (mg/L B)	0,1 - 2,6	---	---	---
Selénio (mg/L Se)	< 0,003 - 0,020	---	---	---

⁽¹⁾ Os valores representam a gama de cada parâmetro das categorias 2 a 6 apresentadas na tabela da página 918 de Correia et al. (1994), que correspondem aos processos de: fiação, tingimento e acabamento de lã, tingimento e acabamento de tecidos, tingimento e acabamento de malhas, fabricação de tapetes e tingimento e acabamento de fibras; a categoria 1 correspondente ao pré-tratamento e lavagem de lã virgem foi excluída, dado que os autores lhe atribuem valores muito diferentes (elevados) de CBO₅, COD, TSS e óleos e gorduras respetivamente 6000, 30000, 8000 e 5500 mg/L.

A cor de um efluente têxtil é muito variada, dado que um simples processo de tingimento pode utilizar vários corantes de diferentes classes químicas e daí tornar-se um parâmetro difícil de medir. A absorção de radiação na zona do visível, característica de qualquer corante, seria o método de eleição, mas este esbarra com o problema prático da existência de vários corantes no mesmo efluente com máximos de absorção a diferentes comprimentos de onda (e absorvências significativas em zonas fora do seu pico característico). Existe o método *ADMI* (*American Dye Manufactures' Institute*) para a determinação da cor, que é no entanto complexo. Envolve a medição da absorvência de 3 a 31 comprimentos de onda diferentes dependendo da precisão pretendida (Bisschops e Spanjers 2003). Estes valores são convertidos através de tabelas (*Munsell values*) e utilizados para obter o valor *DE* (*Colour Difference*) através de uma equação, que por sua vez é convertido no valor *ADMI* (através de uma reta de calibração entre valores *DE* de padrões platina-cobalto e valores *ADMI*). Um valor *ADMI* de 1500 pode considerar-se razoável para a simulação da cor de um efluente têxtil típico (O'Neill et al. 1999).

Entre os escassos dados reportados como típicos para o parâmetro cor O'Neill et al. (1999) apresentam valores de absorvência para um efluente típico, estimados a partir de dados da *Society of Dyers and Colourists (UK)* reportados por Hoyle (1995), que são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Absorvências de um efluente típico de uma zona têxtil, adaptado de O'Neill et al. (1999).

Comprimento de onda (ηm)	400	450	500	550	600	650	700	Média
Efluente têxtil típico	1,423	1,529	1,965	1,715	1,514	0,772	0,620	1,283

Bisschops e Spanjers (2003) reportam valores de *ADMI* para águas residuais da indústria têxtil que variam entre 64 e 47500 conforme a etapa e o tipo de fibra.

Em termos de valores de concentração reportados, a gama é de 0,01 a 0,8 g/L para corantes presentes em efluentes têxteis típicos. No caso de simulação de efluente têxteis contendo corantes ácidos os valores utilizados por vários investigadores vão de 0,02 a 0,5 g/L, e excluindo os extremos, a média encontrada é de 38 mg/L (com base em dados de O'Neill et al. 1999).

É ainda de referir que as queixas públicas sobre deterioração de recursos hídricos por descargas de efluentes têxteis estão mais relacionadas com a coloração vermelha, havendo muito menos queixas relativas a cores como o azul, verde ou castanho por serem cores mais naturais para um rio e por isso menos notadas (O'Neill et al. 1999).

Estima-se que em termos mundiais sejam descarregadas anualmente 280 000 ton de corantes têxteis, dos quais 70% são corantes azo (Maas e Chaudhari 2005). Os principais problemas ambientais causados pela descarga de corantes em águas superficiais são o seu impacto estético negativo, a interferência na fotossíntese (ao obstruir a livre passagem da luz) com efeitos a longo prazo na fauna e flora do meio, e a toxicidade, direta ou causada pelos produtos da sua degradação no ambiente. Entre estes, nomeadamente, contam-se as aminas aromáticas resultantes da redução dos corantes azo (Lourenço et al. 2001, Maas e Chaudhari 2005, Bae e Freeman 2007).

2.2.3 Corantes azo

Os corantes azo representam cerca 70% dos corantes utilizados a nível industrial (Maas e Chaudhari 2005, Jin et al. 2007) . São várias as indústrias que os utilizam, designadamente a indústria têxtil, do papel, alimentar, cosmética, farmacêutica (coloração externa dos medicamentos) e de produção de tintas e vernizes. No entanto a indústria têxtil sozinha é responsável por dois terços do mercado de venda de corantes (ETAD 2003, Pinheiro et al. 2004).

2.2.3.1 Utilizações e estruturas químicas

Os corantes azo caracterizam-se pelo grupo cromóforo conter uma (ou mais) ligação dupla de azoto (-N=N-). Os grupos auxocrómicos usualmente associados são -NH₂, -OH, -SO₃⁻, abarcando uma larga gama de tons. Existem cerca de 3000 estruturas diferentes, incluindo corantes e pigmentos (Greaves et al. 2001, Shore 2002, Pinheiro et al. 2004).

Os corantes são classificados pelo *Color Index* (CI) utilizando dois sistemas. Um é numérico com a atribuição de um número de cinco algarismos, por exemplo CI nº 14720. Outro corresponde à atribuição de um nome que indica o modo de aplicação, a cor e um número de identificação, por exemplo, *Acid Red 14* para o exemplo anterior (Coz 2005, Web-page 2013).

A maior classe do *Color Index* são os corantes azo (dois terços dos listados), que por sua vez estão divididos em quatro secções dependendo do número de grupos azo da molécula. Os corantes azo podem ser não metalizados (a maioria) ou serem complexos metal-azo (um sexto dos listados). A segunda maior classe do *Color Index* é formada por corantes do tipo antraquinona (15%), seguida dos tipos triarilmetano (3%) e ftalocianina (2%). Todas as outras entradas no *Color Index* correspondem a menos de 1% (Shore 2002).

Os corantes são classificados segundo a sua forma de aplicação, e no caso dos corantes azo, a listagem por ordem decrescente de importância é a seguinte: ácidos, diretos, reativos, dispersivos, mordentes, solventes, pigmentos e básicos. As quatro primeiras aplicações correspondem a 72% e 87% dos corantes azo não metalizados e complexos metal-azo respetivamente (Shore 2002), como se pode deduzir da Tabela 2.5, e por essa razão vão ser abordados com mais detalhe.

Tabela 2.5 Distribuição percentual de cada classe química de corantes azo listada no *Color Index* em função do tipo de aplicação, adaptado de Shore (2002)

Corantes Azo - Distribuição por tipo de aplicação (%)									
Classe química	Ácido	Direto	Reativo	Disperso	Solvente	Mordente	Pigmento	Básico	Vat
não metalizados	20	30	10	12	5	12	6	5	---
complexos metal-azo	65	10	12	---	13	--	---	---	---

De realçar que os corantes azo mordentes estão em declínio em termos de utilização pois a fixação do corante azo é feita à base de mordentes de crómio (Shore 2002). Na Europa deixaram de poder ser utilizados a partir de 2002 (CE/371/2002) pois o crómio é um metal muito tóxico.

Um dos mais importantes grupos de corantes é o dos **corantes azo ácidos**. O termo “corante ácido” advém dos banhos ácidos que se utilizam para a coloração das fibras. Os corantes ácidos são definidos como compostos aniónicos com grande afinidade para as fibras proteicas, ligando-se a estas através grupos amina terminais, na lã, na poliamida (nylon) e na seda. Também são importantes na coloração do couro, papel, juta, madeira e alumínio anodizado (Shore 2002). Estes corantes eram inicialmente destinados apenas ao tingimento da lã e outras fibras, mas alguns deles são agora permitidos na indústria alimentar e cosmética. Os corantes azo ácidos não metalizados correspondem a 48% e os complexos metal-azo a 31% de todos os corantes ácidos (Shore 2002). Na Figura 2.1 podem ver-se estruturas químicas do primeiro corante ácido sintetizado em 1876 (*Acid Orange 20*) e do corante ácido utilizado como modelo neste trabalho (*Acid Red 14*).

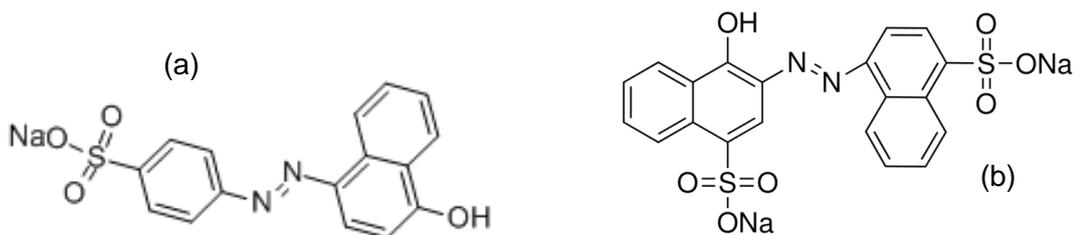


Figura 2.1 – Estruturas moleculares dos corante (a) *Acid Orange 20* e (b) *Acid Red 14*

O grau de fixação típico deste corante ao nylon e lã é de 80 a 93%, correspondendo a uma perda para os efluentes de 7-20% do corante utilizado (EPA 1997). Os corantes ácidos são recicláveis pois não sofrem modificações da estrutura química durante a aplicação. Também a água de processo e químicos auxiliares podem ser reciclados para o banho de tingimento aplicando processos adequados (por exemplo filtração com membranas). A adsorção destes corantes à biomassa durante o tratamento biológico varia com o seu grau de sulfonação; nomeadamente corantes ácidos com elevada solubilidade aquosa (maior grau de sulfonação) exibem um baixo grau de adsorção, enquanto corantes mais hidrofóbicos são bioeliminados por esta via numa extensão muito maior (Shore 2002).

Os **corantes azo diretos** são definidos como corantes aniônicos com afinidade para as fibras celulósicas e são aplicados diretamente através dum banho contendo um eletrólito. Ligam-se às fibras através de pontes de hidrogénio, forças entre dipolos e interações hidrofóbicas não específicas que dependem da estrutura química e polaridade do corante, mas esta ligação pode ser reversível. Para além da utilização na indústria têxtil são utilizados no couro e em processos de tingimento contínuos na indústria do papel (Shore 2002).

Pelo menos, cerca de 70% dos corantes diretos são corantes azo não metalizados e em contraste com todas as outras aplicações, a maioria apresenta estruturas do tipo diazo (amarelos brilhantes a azuis) ou poli-azo (verdes, castanhos, cinzentos e preto) (Shore 2002). Na Figura 2.2 pode ver-se o exemplo do corante tri-azo *Direct Black 38*.

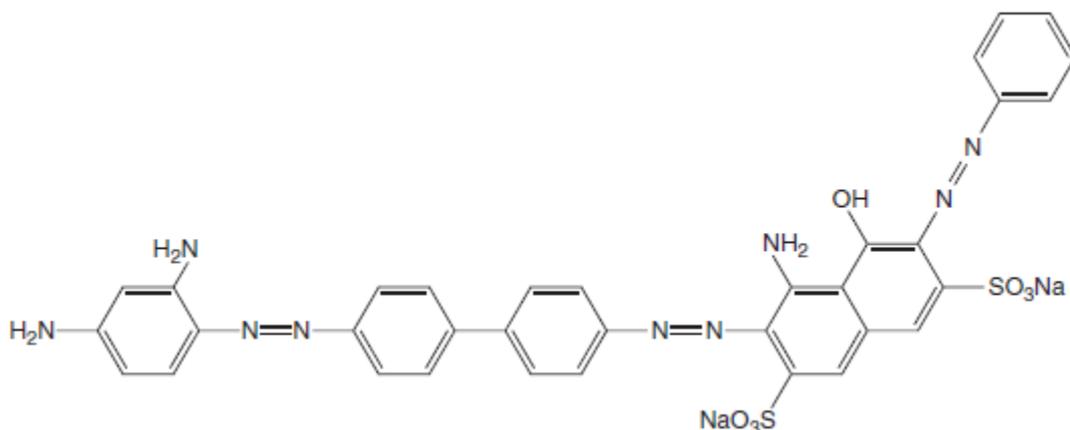


Figura 2.2 - Estrutura molecular do corante *Direct Black 38*

O grau de fixação deste tipo de corante ao algodão ou outras fibras celulósicas é de 70 a 95%, correspondendo a uma perda para os efluentes de 5 a 30% do corante utilizado (EPA 1997). Como usualmente não há alteração da estrutura química dos corantes diretos durante a sua aplicação, os seus banhos de tingimento são passíveis de ser reciclados.

Durante o tratamento biológico dá-se uma elevada bioeliminação do corante por adsorção à biomassa que não é dependente do seu grau de sulfonação (Shore 2002).

Os **corantes reativos** foram introduzidos no fim dos anos cinquenta, sendo que 95% dos cromóforos são corantes do tipo azo. Consistem em moléculas com um ou mais grupos reativos (um grupo vinil insaturado ou um substituinte halogenado) capazes de reagir quimicamente formando ligações covalentes com os grupos amina, hidroxilo ou sulfidrilo de fibras têxteis (Shore 2002). Estes corantes são utilizados para colorir fibras celulósicas (algodão) e sedas, lãs ou poliamidas (nylon) e são amplamente utilizados na produção de vestuário (Shore 2002, Coz 2005). As moléculas que não participam na reação com o substrato são hidrolisadas nas condições de tingimento, o que faz com que este seja um dos processos de coloração que mais cor residual deixa nos seus efluentes. Pela mesma razão não é possível a reciclagem das águas contendo estes corantes. O grau de fixação deste tipo de corantes ao algodão ou outras fibras celulósicas é de 60 a 90%, correspondendo a uma perda para os efluentes de 10 a 40% do corante utilizado (EPA 1997). A bioadsorção também é ineficaz, independentemente do grau de sulfonação do corante (Shore 2002). Na Figura 2.3 encontra-se a estrutura molecular do corante azo reativo *Reactive Orange 4*.

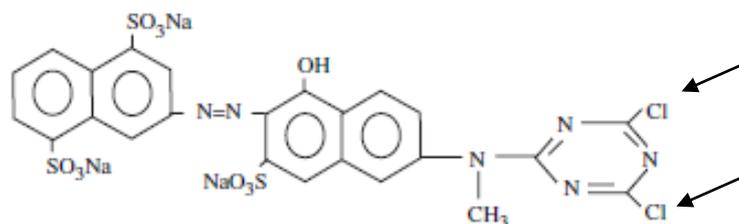


Figura 2.3 – Estrutura molecular do corante *Reactive Orange 4*. As setas indicam os dois substituintes halogenados (Cl) que vão sofrer substituição nucleofílica ao formar-se a ligação covalente à fibra.

Os **corantes dispersivos** (ou plasto-solúveis) são parcialmente solúveis em água e são utilizados para colorir fibras sintéticas como poliéster, polimetilmetacrilato (acrílico), acetato de celulose e raramente nylon. Não são empregues para tingir fibras naturais. Estes corantes (dos quais 60% são azo) têm afinidade para fibras hidrofóbicas. A fibra adsorve o corante da solução aquosa diluída que é continuamente reabastecida pela rápida dissolução do corante a partir da reserva que se encontra em suspensão (dispersão). Em alternativa os corantes dispersivos podem ser adsorvidos a partir duma fase de vapor (método utilizado em processos operados em contínuo) (Shore 2002). Na Figura 2.4 encontra-se a estrutura do um corante dispersivo, o *Dispersive Red 1*.

O grau de fixação deste tipo de corantes a fibras de poliéster, acetato ou outros materiais sintéticos é de 80 a 92%, correspondendo a uma perda para os efluentes de 8 a 20% do

corante utilizado (EPA 1997). A reutilização destes corantes é possível apesar de não estar suficientemente demonstrada. A bioacumulação destes corantes na biomassa é moderada a elevada quando os efluentes que os contêm sofrem tratamento biológico (Shore 2002).

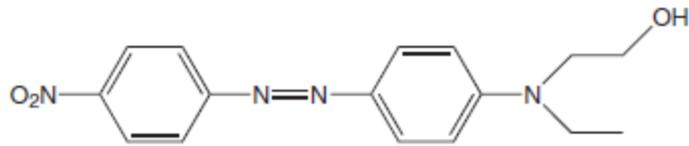


Figura 2.4 – Estrutura molecular do corante *Dispersive Red 1*

2.2.3.2 Perigos para a saúde humana e o ambiente associados a corantes azo

Os corantes utilizados pelas várias indústrias devem idealmente ser seguros, não devendo apresentar toxicidade, carcinogenicidade e alergenicidade. No entanto, grande parte dos efeitos secundários indesejados provocados pelo vestuário na **saúde humana** são causados pelos corantes neles presentes e, mesmo no domínio da alimentação, alguns corantes anteriormente utilizados, como o *Butter Yellow* são agora conhecidos por serem cancerígenos. Devido a estas questões a Europa e os Estados Unidos da América proibiram o uso de vários corantes que apresentam efeitos tóxicos (alérgenos, cancerígenos e mutagénicos). No entanto, esta medida positiva pode ser contrabalançada pela importação de toneladas de produtos de países menos regulamentados, com a agravante da composição química do vestuário não ser de declaração obrigatória como no caso dos cosméticos ou alimentos.

Em termos da saúde humana os dados existentes indicam que apenas 1% dos 4450 corantes comerciais analisados têm um valor de LD₅₀ (dose letal para 50% da população estudada) menor que 250mg/kg para ensaios efetuados em ratinhos (Clarke e Anliker 1980, Lourenço 2003), o que corresponde à categoria 3 em termos de toxicidade humana (CE 1272/2008 16 de Dezembro de 2008), ou seja, os restantes 99% não apresentam toxicidade aguda. Valores de LD₅₀ entre 100 e 2000 mg/kg de peso foram reportados por Zaharia (2012) que se baseou em dados de Börnick & Schmidt (2006).

O problema mais comum causado pelos corantes corresponde à ocorrência de dermatites através do contacto com o vestuário. Foram detetados inúmeros casos e existe uma lista de 43 corantes associados a esta reação alérgica (Coz 2005). A maioria das dermatites está

relacionada com corantes azo dispersivos como o *Dispersive Blue 124*, *Dispersive Blue 106*, *Dispersive Orange 3*, e *Disperse Red 1* (Coz 2005).

Hoje em dia a preocupação relativamente aos corantes azo é essencialmente dirigida para a toxicidade associada às aminas aromáticas resultantes da redução da molécula por quebra da ligação azo. Está demonstrado que esta redução pode ocorrer em variadas condições ecológicas, incluindo as da micro flora intestinal de mamíferos ou as das enzimas hepáticas. Assim os efeitos podem acontecer no intestino, fígado e aparelho urinário e na pele, no caso de migração do corante pelo uso de vestuário colorido (Coz 2005).

Nos países da União Europeia já foi proibido o uso dos corantes azo que por clivagem redutiva libertem uma ou mais aminas tóxicas e carcinogénicas em teores detetáveis, ou seja, com valores superiores a 30 ppm nos artefactos acabados ou nas suas partes tingidas. Os mesmos não podem ser utilizados em artigos têxteis ou de couro, suscetíveis de entrarem em contacto direto e prolongado com a epiderme ou a cavidade oral humanas. Estas aminas estão listadas no apêndice 8 do regulamento CE 1907/2006 de 18 de Dezembro de 2006 relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH) e podem ser encontradas na Tabela 2.6. A lista inclui 22 aminas, das quais três são substâncias carcinogénicas de categoria 1 (Cat.1: Perigo, pode causar cancro), como a benzidina (associada, por exemplo aos corantes *Direct Black 38* e *Direct Blue 6*), a 2-naftilamina e o 4-aminobifenilo (xenilamina). As restantes aminas são carcinogénicas de categoria 2 (Cat.2: Atenção, suspeito de provocar cancro), como é o caso do *o*-aminoazotolueno (associado, por exemplo ao *Yellow Butter*).

Recentemente, de acordo com uma decisão da ECHA (Agência Europeia de Substâncias Químicas) em 18 de Dezembro de 2012 (*European Chemicals Agency*, ED/169/2012) foram recomendadas para a inclusão na lista das substâncias sujeitas a autorização (Anexo XIV do REACH) oito destas aminas, especificamente, 4-aminobifenilo, *o*-aminoazotolueno, 4,4'-metilenodi-*o*-toluidina, 6-metoxi-*m*-toluidina *p*-cresidina, 4,4'-oxidianilina, *o*-toluidina, 4-metil-*m*-fenilenodiamina e 4-aminoazobenzeno.

Tabela 2.6 - Apêndice 8 do regulamento CE 1907/2006 de 18 de Dezembro de 2006, lista de amins aromáticas tóxicas e carcinogénicas geradas por clivagem redutiva de corantes azo proibidos na União Europeia.

Ponto 43 — Corantes azóicos

Lista de amins aromáticas

	Número CAS	Número de identificação	Número CE	Substâncias
1.	92-67-1	612-072-00-6	202-177-1	Bifenil-4-ilamina 4-aminobifenilo xenilamina
2.	92-87-5	612-042-00-2	202-199-1	Benzidina
3.	95-69-2		202-441-6	4-Cloro-o-toluidina
4.	91-59-8	612-022-00-3	202-080-4	2-Naftilamina
5.	97-56-3	611-006-00-3	202-591-2	o-Aminoazotolueno 4-amino-2',3-dimetilazobenzeno 4-o-tolilazo-o-toluidina
6.	99-55-8		202-765-8	5-Nitro-o-toluidina
7.	106-47-8	612-137-00-9	203-401-0	4-Cloroanilina
8.	615-05-4		210-406-1	4-Metoxi-m-fenilendiamina
9.	101-77-9	612-051-00-1	202-974-4	4,4'-Metilendianilina 4,4'-diaminodifenilmetano
10.	91-94-1	612-068-00-4	202-109-0	3,3'-Diclorobenzidina 3,3'-diclorobifenil-4,4'-ilenodiamineno
11.	119-90-4	612-036-00-X	204-355-4	3,3'-Dimetoxibenzidina o-dianisidina
12.	119-93-7	612-041-00-7	204-358-0	3,3'-Dimetilbenzidina 4,4'-bi-o-toluidina
13.	838-88-0	612-085-00-7	212-658-8	4,4'-Metilendi-o-toluidina
14.	120-71-8		204-419-1	6-Metoxi-m-toluidina p-cresidina
15.	101-14-4	612-078-00-9	202-918-9	4,4'-Metileno-bis-(2-cloro-anilina) 2,2'-dicloro-4,4'-metileno-dianilina
16.	101-80-4		202-977-0	4,4'-Oxidianilina
17.	139-65-1		205-370-9	4,4'-tiodianilina
18.	95-53-4	612-091-00-X	202-429-0	o-Toluidina 2-aminotolueno
19.	95-80-7	612-099-00-3	202-453-1	4-Metil-m-fenilendiamina
20.	137-17-7		205-282-0	2,4,5-Trimetilanelina
21.	90-04-0	612-035-00-4	201-963-1	o-Anisidina 2-metoxianilina
22.	60-09-3	611-008-00-4	200-453-6	4-Aminoazobenzeno

Para uma substância ser classificada em termos de **perigo para o ambiente**, vários fatores têm de ser tidos em conta, não só a sua toxicidade (toxicidade aguda para o ambiente aquático), mas também a sua degradabilidade e o potencial de bioacumulação.

Existem duas classificações para as substâncias em termos ambientais e são dadas de forma independente: toxicidade aguda (tem apenas a categoria 1) e toxicidade crónica (inclui as categorias 1, 2, 3 e 4). Uma substância pode apresentar toxicidade aguda (tóxica para os organismos aquáticos em concentrações muito baixas) mas só exibirá também toxicidade crónica se se acumular nos organismos (bioacumulação) e for dificilmente biodegradável. Isto significa que uma substância mesmo sendo tóxica para os organismos aquáticos, se for biodegradável e não tiver potencial de bioacumulação não vai ser classificada como perigosa para o ambiente. Por outro lado, existe a classificação chamada de “rede de segurança” para substâncias que apesar de não demonstrarem toxicidade, são pouco solúveis, não se degradam rapidamente, e têm potencial de bioacumulação. Estas serão classificadas como substâncias com toxicidade crónica da categoria 4 (CE 1272/2008 16 de Dezembro de 2008).

A bioacumulação de substâncias nos organismos aquáticos pode provocar efeitos tóxicos a longo prazo, mesmo quando a concentração destas substâncias na água é baixa. O potencial de bioacumulação das substâncias orgânicas é normalmente avaliado pelo valor do seu coeficiente de partição no sistema octanol/água (K_{ow}), geralmente expresso como $\log K_{ow}$ (a fase de octanol simula aqui a capacidade de solubilização da substância nos lípidos do organismo). A correlação entre o valor de $\log K_{ow}$ de uma substância orgânica e a sua bioconcentração, medida pelo fator de bioconcentração em peixes (BCF - razão entre mg de substância por kg do organismo e mg da substância por litro no meio aquático), encontra substancial apoio na literatura científica. As substâncias com um potencial de bioconcentração significativo apresentam um valor de $\log K_{ow} \geq 4$ e um valor de BFC ≥ 500 (CE 1272/2008 16 de Dezembro de 2008). Como a solubilidade em água da maioria dos corantes azo é elevada estes têm um baixo potencial de bioacumulação.

Devido à referida correlação entre hidrofobicidade e toxicidade crónica tem havido uma tendência recente de desenvolvimento de novas estruturas de corantes através da introdução de grupos polares, como é o caso dos grupos sulfonato. Assim as aminas resultantes da quebra do corante são mais hidrofílicas o que reduz o seu potencial de bioacumulação. Esta alteração reduz também o seu grau de adsorção às lamas durante o tratamento biológico (bioadsorção).

Relativamente à biodegradabilidade, os corantes são compostos recalcitrantes devido à presença da ligação azo e dos grupos sulfonato, que tornam estes compostos difíceis de

biodegradar em sistemas convencionais (aeróbios) de tratamento biológico (Pinheiro et al. 2004). No caso de o sistema possuir uma etapa ou zona anaeróbia pode haver remoção de cor por redução da ligação azo com formação das aminas correspondentes e eventualmente ocorrer a degradação das mesmas na zona ou etapa aeróbia subsequente. Apesar de já existir um esforço de investigação significativo para compreender os mecanismos de transformação e biodegradação destas aminas nos sistemas de tratamento biológico, os resultados variam muito consoante a amina estudada. Assim, existe ainda um grande desconhecimento sobre o efeito das mesmas a longo prazo no meio ambiente (Pinheiro et al. 2004).

Num estudo efetuado Gottlieb et al. (2003) foi analisada a toxicidade e genotoxicidade de alguns corantes e seus derivados de redução. Verificou-se que o corante *Acid Orange 7* tem um valor de EC_{50} de 15,7 mg/L (EC_{50} : concentração que induz um efeito em 50% da população testada, neste caso na luminiscência da bactéria *Vibrio fischeri*) e não apresenta genotoxicidade, mas após sofrer redução por *Enterococcus faecalis* torna-se genotóxico e a sua toxicidade aumenta, para um valor de EC_{50} de 0.2 mg/L. Estes níveis de toxicidade e genotoxicidade são conferidos pelo produto de redução 1-amino-2-naftol (EC_{50} de 0,1 mg/L) e não pelo ácido sulfanílico (EC_{50} de 21,5 mg/L). No mesmo estudo verificou-se que as aminas sulfonadas 1-amino-2-naftol-6-sulfonato (derivada da redução do corante *Food Yellow 3*) e 4-amino-1-naftaleno-sulfonato (derivada do corante *Acid Red 14*) têm valores de EC_{50} de 391,0 e 28,3 mg/L respetivamente e não são genotóxicas.

Os resultados de testes efetuados a vários corantes ao longo de vários anos foram reunidos por Clarke e Anliker (1984) e indicam que apenas 2% dos corantes testados apresentam um valor de LC_{50} menor que 1,0 mg/L para os peixes (perigo agudo de categoria 1), 37% possuem valores de LC_{50} (LC_{50} : concentração letal em 50% da população teste) menor que 1,0 mg/L em peixes (perigo agudo de categoria 1), 37% possuem valores de LC_{50} acima de 10 mg/L (perigo crónico de categoria 3 se não forem facilmente biodegradáveis e/ou forem bioacumuláveis) e 59% têm um valor de LC_{50} acima de 100 mg/L (sem toxicidade para o ambiente aquático). Os corantes básicos revelaram-se os mais tóxicos para os peixes (Lourenço 2003, Zaharia e Suteu 2012).

Relativamente à inibição da fotossíntese devido à presença de corantes os testes reportados indicam que tanto o crescimento das algas como a fotossíntese não são em geral inibidos para concentrações abaixo de 1mg/L (Lourenço 2003).

O efeito da toxicidade dos corantes nas bactérias presentes nos sistemas de tratamento biológico foi avaliado e verificou-se que de 200 corantes testados, 18% provocaram inibição da taxa de respiração, sendo estes últimos todos corantes básicos (Zaharia e Suteu 2012).

Pode-se concluir que se for feita *a priori* uma criteriosa seleção de corantes que não exibam toxicidade e que não gerem subprodutos de redução tóxicos (aminas) se está a dar o primeiro passo para a proteção do meio recetor, e este passo já foi dado pela União Europeia e outros países. O segundo passo será conseguir desenvolver processos sustentáveis e económicos para o tratamento dos efluentes que contêm estes corantes, como é o caso da aplicação de tratamentos biológicos. Se forem eficientes têm como vantagem não necessitar de introduzir ainda mais produtos químicos nas águas.

2.2.4 Normas aplicáveis à indústria têxtil e seus efluentes na União Europeia

Em termos de medidas de prevenção de impactos ambientais no sector têxtil, foi já referido o regulamento REACH, que contém no Apêndice 8 a lista de amins aromáticas tóxicas e carcinogénicas geradas por clivagem reductiva de corantes azo, que identifica os que são por isso de utilização proibida em fabrico de vestuário na União Europeia.

Adicionalmente, foram publicadas outras medidas de prevenção da poluição pela Comissão Europeia, no contexto da prevenção e controlo integrados da poluição (PCIP). As melhores técnicas disponíveis (MTD) para o sector têxtil têm como base o documento de referência *BREF - Reference Document on Best Available Techniques for the Textiles Industry*, publicado no Jornal Oficial 170, de 19 de Julho de 2003, que correspondem a um dos pontos importantes a implementar para que as empresas deste sector de forte potencial poluente possam obter a sua licença de operação. Em Portugal, é o Decreto-Lei 173/2008 de 26 de Agosto que transpõe o regime jurídico relativo à prevenção e controlo integrados da poluição (PCIP).

As melhores técnicas disponíveis são bastante abrangentes, indo desde a melhor organização dos procedimentos e formação dos trabalhadores, a indicações específicas de melhoramento dos processos. Na Tabela 2.7 estão seleccionadas e resumidas algumas MTD, especificamente no que respeita à utilização da água e de produtos químicos e ao tratamento de efluentes (adaptado de Citeve 2012).

Tabela 2.7 Melhores técnicas disponíveis (MTD) para o sector têxtil. Adaptado de Citeve (2012).

Melhores Técnicas Disponíveis	
Água	<ul style="list-style-type: none"> - Controlo e monitorização dos consumos de água - Redução do consumo de água - Recuperação e reutilização <i>in loco</i> das águas das várias etapas/banhos
Substâncias químicas	<ul style="list-style-type: none"> - Pedir informação detalhada aos fornecedores sobre as matérias-primas (tipo e quantidade de agentes de preparação e gomas, monómeros residuais, biocidas, etc.) - Minimização do uso de produtos químicos e escolha de produtos alternativos menos poluentes/tóxicos, - Substituição de produtos convencionais (e.g. óleos minerais) por substâncias biodegradáveis (elimináveis por via biológica) - Minimização de pesticidas (provenientes das fibras de lã) - Redução do número de corantes utilizando sistemas tricromáticos - Substituição do uso do hipoclorito de sódio no branqueamento - Otimização do tratamento anti traça (atingir 98% eficiência)
Tratamento de efluentes	<ul style="list-style-type: none"> - Caracterização das diferentes correntes de águas residuais provenientes do processo - Tratamento na fonte de águas residuais concentradas contendo compostos pouco biodegradáveis - Tratamento anaeróbico para remoção de cor (corantes azo) antes do tratamento aeróbio - Tratamento biológico do efluente (no local ou numa unidade municipal) - Utilização de tratamentos terciários após o tratamento biológico (e.g. carvão ativado) - Adoção de vias de reciclagem apropriadas para a lama proveniente dos tratamentos biológicos

Por observação da Tabela 2.7 é de realçar o ênfase na importância da redução e reutilização da água do processo, bem como a promoção do tratamento biológico dos efluentes, apoiado à cabeça pela escolha de substâncias químicas mais biodegradáveis para utilização no processo fabril. É de realçar que devido a estas medidas de poupança de água, os efluentes têxteis produzidos são cada vez mais concentrados, sendo necessário desenvolver tratamentos biológicos robustos capazes de os despoluir.

Em Portugal, a descarga de efluentes têxteis no meio hídrico está sujeita à obtenção de uma licença emitida pela Agência Portuguesa do Ambiente - Administração de Região Hidrográfica (APA-ARH) que define as condições de descarga, ou seja, os valores limites de emissão (VLE) para os diferentes parâmetros. Os VLE seguem normalmente os valores definidos no Anexo XVIII do Decreto- Lei 238/98 para a descarga de águas residuais e/ou a Portaria 423/97, de 25 de Junho relativa às normas de descarga para as indústrias do sector têxtil (menos exigente). No entanto, por exemplo na bacia hidrográfica do vale do Ave, alguns VLE são mais baixos que os definidos no Decreto-Lei 236/98, e o Despacho 27286/2004 (2ª série) de 30 de Dezembro determina que as empresas aí localizadas têm de cumprir os limites estipulados pelo sistema integrado de despoluição do vale do Ave (SIDVA) (Citeve, 2012). Na Tabela 2.8 encontram-se os VLE para alguns parâmetros referidos no normativo aqui referenciado.

Para a descarga de efluentes têxteis em coletor de esgotos a empresa tem de possuir uma autorização emitida pela entidade gestora do sistema de tratamento, que é a responsável por definir os VLE aplicáveis. Muitos dos VLE são superiores aos definidos no Anexo XVIII do Decreto-Lei 238/98 (normas gerais de descarga de águas residuais) em especial no que

respeita aos valores de pH, carência bioquímica de oxigénio aos 5 dias (CBO₅), carência química de oxigénio (COD), sólidos suspensos totais (TSS), azoto e fósforo, visto que o efluente ainda vai sofrer tratamento, mas relativamente aos metais os valores são iguais, sendo uma das maiores exceções o crómio hexavalente, para o qual é permitido um valor de 2,0 mg/L contra apenas 0,1 mg/L na norma geral de descarga.

Tabela 2.8 Valores limite de emissão (VLE) ou valores máximos admissíveis (VMA) para a descarga de efluentes têxteis no meio hídrico e em coletor municipal em Portugal.

Parâmetro	Descarga no meio hídrico			Descarga em coletor	
	Dec. Lei 236/98	Portaria 423/97	Vale do Ave (*)		Vale do Ave
	Anexo XVIII		Estiagem	Normal	SIDVA
pH	6,0 - 9,0	5,5 - 9,0	6,0 - 9,0	6,0 - 9,0	5,5 - 9,5
Temp. (°C)	Aumento de 3°C	---	---	---	65°C
CBO ₅ (mg/L O ₂)	40	100	15	25	500
COD (mg/L O ₂)	150	250	100	125	2 000
TSS (mg/L)	60	---	30	35	1 000
Conductiv. (mS/Cm)	---	---	---	---	3
Azoto _{Total} (mg/L N)	15	---	---	---	(**)
Fósforo _{Total} (mg/L P)	10	---	---	---	---
Cor	Não visível na diluição 1:20	Não visível na diluição 1:40	---	---	---

(*) adaptado de Citeve, 2012; (**) apenas é definido valor para o azoto amoniacal com um VMA de 100 mg/L NH₄

Na Tabela 2.8 também é possível encontrar os VLE relativamente à descarga em coletor no vale do Ave (SIDVA), que define limites para cinco parâmetros (pH, temperatura, CBO₅, COD e TSS). De realçar que as indústrias têxteis pagam uma tarifa mensal relativa à descarga de águas residuais industriais nos sistemas de drenagem e intercetores, calculada com base nos valores de TSS, na concentração média de matérias oxidáveis (CBO₅, COD) e na concentração média de substâncias inibidoras e tóxicas (SIT), que inclui metais pesados, arsénio, cianeto e fenóis. Esta tarifa promove uma maior reutilização da água e implementação de sistemas de pré-tratamento nas empresas, para que o valor a pagar seja reduzido.

Nos subcapítulos seguintes serão abordadas as várias tecnologias existentes para o tratamento dos efluentes têxteis, com especial ênfase no tratamento biológico.

2.4 Remoção de corantes azo de efluentes de indústrias têxteis

2.4.1 Introdução

Apesar de a tendência na indústria têxtil ser a crescente reutilização *in loco* da água residual nas diversas etapas do processo, haverá sempre um efluente final com cor, que necessita de um tratamento apropriado de forma a poder ser descarregado no meio hídrico sem causar efeitos negativos, dando cumprimento às normas aplicáveis.

A remoção de cor das águas residuais pode ser efetuada por vários processos físico-químicos e biológicos que podem ser aplicados no pré-tratamento (antes da descarga em coletor), ou no tratamento primário, secundário ou de afinação (pós-tratamento) realizado antes da descarga em meio hídrico.

2.4.2 Processos físico-químicos

Os processos de filtração com membranas utilizados para o tratamento de efluentes têxteis são maioritariamente a **nanofiltração e a osmose inversa**. Estes processos são especialmente úteis quando aplicados diretamente à saída do processo de tingimento, permitindo a reutilização dos corantes retidos (com exceção dos reativos) e de outros auxiliares químicos, bem como da água purificada recolhida no filtrado. As maiores desvantagens dos métodos de filtração com membranas são o investimento elevado, problemas de colmatação das membranas e, no caso da sua aplicação ao efluente final, a necessidade de tratamento posterior do concentrado (Robinson et al. 2001, dos Santos et al. 2007). A **ultrafiltração** não é efetiva para a remoção de moléculas de corantes, mas permite a eliminação de macromoléculas, podendo ser usada como pré-tratamento para a osmose inversa (Babu et al. 2007).

Os **métodos de adsorção** também são utilizados para a remoção de corantes de águas residuais, sendo os critérios para a sua escolha a afinidade para com os compostos a remover e a possibilidade da regeneração dos adsorventes (Karcher et al. 2001, dos Santos et al. 2007). O mais utilizado é o **carvão ativado**, que tem como desvantagens o preço elevado e a perda de 10 a 15% da sua massa no processo de regeneração, o qual é realizado *offsite*. Babu et al. (2007) indicam que não é possível utilizar o carvão ativado sem um pré-tratamento ao efluente, devido ao rápido entupimento dos canais de escoamento do leito de carvão provocado por sólidos suspensos residuais. Daí que este processo só possa normalmente ser usado em combinação com uma etapa de coagulação-floculação ou de tratamento biológico. Têm sido estudados outros adsorventes de baixo custo tais como turfa,

argila bentonítica, cinzas, madeira laminada, maçarocas de milho e casca de arroz, que podem ser economicamente atrativos quando comparados com o carvão ativado, mas a eficiência destes materiais varia com o tipo de corante (Robinson et al. 2001, dos Santos et al. 2007). Em Portugal um subproduto da indústria alimentar, o resíduo de grãos de cevada oriundo da indústria cervejeira, também foi estudado como adsorvente de corantes azo (Pedro Silva et al. 2004).

Com processos de **permuta iónica** consegue-se uma boa remoção de corantes solúveis, tanto aniónicos como catiónicos, mas a sua maior desvantagem é o custo e a difícil regeneração das resinas (Robinson et al. 2001, dos Santos et al. 2007).

No geral, os processos físico-químicos acima descritos têm a vantagem de remover o corante sem formar outros produtos potencialmente perigosos. No entanto, a sua desvantagem é a necessidade do tratamento posterior dos concentrados gerados ou a regeneração e deposição final dos adsorventes contaminados.

A **coagulação-floculação** é um processo físico-químico dos mais utilizados para as águas residuais têxteis. Os agentes coagulantes mais empregues são sais de ferro e policloreto de alumínio, e os flocos formados são separados por filtração ou sedimentação, podendo ainda ser adicionado um polieletrólito com ação floculante para melhorar a sedimentação. No entanto, este método é eficaz por exemplo para os corantes dispersivos, mas não o é para os corantes ácidos, diretos e reativos (Vandevivere et al. 1998, dos Santos et al. 2007) reduzindo bastante o seu campo de aplicação.

Os **processos avançados de oxidação (AOP)** envolvem o uso de um agente oxidante como o ozono (O_3), ou peróxido de hidrogénio (H_2O_2) para converter os corantes a produtos menos nocivos. Estes processos consistem na aplicação destes oxidantes juntamente com catalisadores (Fe^{2+} , Mn^{2+} , TiO_2) e/ou uma fonte de radiação UV (lâmpadas ou exposição solar) produzindo uma quantidade elevada de radicais hidroxilo ($HO\cdot$), que são os principais agentes de oxidação dos corantes (Solís et al. 2012).

Destes agentes, o **ozono** é o mais amplamente utilizado devido à sua elevada reatividade (potencial de oxidação 2,07 V comparado com o valor de 1,78 V de H_2O_2) e usualmente obtém-se um boa remoção de cor mesmo a baixas dosagens (Robinson et al. 2001, Alaton et al. 2002, dos Santos et al. 2007, Solís et al. 2012). O ozono pode reagir diretamente com as moléculas de corante para além da sua ação via radicais hidroxilo, $HO\cdot$ (potencial de oxidação de 2,8 V, Solís et al. 2012). A dosagem aplicada depende da cor e da carga orgânica a ser removida, e este processo tem a vantagem de não produzir resíduos ou lamas (Robinson et al. 2001). As desvantagens do processo de ozonização são o seu elevado custo devido ao reduzido tempo de meia vida do ozono, e o facto de não ser

eficiente para corantes dispersivos ou insolúveis em água (dos Santos et al. 2007). Outros autores (Solís et al. 2012), indicam que a ozonização tem sido usada com sucesso em conjunto com tratamentos biológicos, quer como pré-tratamento quer como pós-tratamento.

A **reação de Fenton** (H_2O_2 com Fe^{2+} como catalisador) é utilizada para tratar águas residuais industriais resistentes à degradação biológica e pode ser aplicada aos efluentes têxteis. O peróxido de hidrogénio é adicionado à água residual a tratar, previamente acidificada e doseada com iões Fe^{2+} , gerando radicais hidroxilo. No final do tratamento é necessário neutralizar a mistura reacional, e esta elevação do valor de pH provoca a formação de hidróxidos de ferro, que precipitam formando lamas. As maiores desvantagens deste método são, assim, a formação de quantidades elevadas de lamas, as necessidades de ajustes do pH no efluente a tratar e a complexidade dos fenómenos envolvidos, limitando a sua reprodutibilidade (Robinson et al. 2001, Solís et al. 2012). Em termos de custo é um método relativamente barato comparado com a ozonização e apresenta eficiências elevadas de remoção de cor e COD (dos Santos et al. 2007). A variante denominada **foto-Fenton** consiste na promoção da reação de Fenton utilizando irradiação com luz ultravioleta ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{UV}$) e favorece o rendimento e a cinética da degradação de muitos compostos refratários, pois é introduzida uma nova fonte de radicais hidroxilo pela fotólise do complexo $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$. Esta fotólise por sua vez também regenera os iões Fe^{2+} , diminuindo drasticamente o consumo de reagentes no processo (Goi e Trapido 2002). Solís et al. (2012) indicam que estes processos tipo Fenton e foto-Fenton têm também sido utilizados como pré-tratamento em combinação com tratamentos biológicos, obtendo-se uma eficiente remoção de cor e COD.

A **irradiação com luz UV**, para degradação fotoquímica de compostos orgânicos em águas residuais, tem sido estudada em combinação com o agente oxidante H_2O_2 e o catalisador TiO_2 , para a descoloração de corantes azo e baseia-se na formação de dois radicais hidroxilo por cada molécula de H_2O_2 . O sistema $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ tem a vantagem económica de não requerer elevado investimento inicial e não gerar lamas residuais. A principal desvantagem reflete-se nos custos operacionais devido ao elevado consumo de energia. A combinação deste processo com um tratamento biológico pode ser a solução para baixar o seu custo (Solís et al. 2012). Apesar de tudo, num estudo comparativo com a ozonização concluiu-se que este sistema $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ tem custos menores que a ozonização (dos Santos et al. 2007). Os métodos UV baseados na presença de diferentes oxidantes e do catalisador TiO_2 também demonstraram uma eficiência alta de remoção de cor. Foram investigadas diferentes combinações, nomeadamente, O_3/TiO_2 , $\text{O}_3/\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$, mas os resultados revelaram-se muito dependentes do tipo de corante, concentrações de corante e agentes de tratamento e pH. Ultimamente a utilização da radiação solar em substituição da

irradiação com lâmpadas UV tem também atraído as atenções dos investigadores (dos Santos et al. 2007).

A **oxidação eletroquímica** tem também sido aplicada na remoção de compostos orgânicos de águas residuais. Utilizam-se elétrodos imersos no líquido, através dos quais a corrente elétrica aplicada induz reações redox resultando na conversão quase total da carga orgânica a CO_2 e H_2O (Solís et al. 2012). Praticamente não existe consumo de reagentes (Robinson et al. 2001). As desvantagens desta tecnologia são os custos de energia, devido ao elevado potencial que é preciso aplicar, e a sensibilidade do processo ao pH. A formação de compostos organoclorados devido à presença de NaCl nas águas é outra desvantagem. Métodos eletroquímicos combinados com o tratamento biológico demonstraram poder produzir bons resultados (Solís et al. 2012). Carvalho et al. (2007), por exemplo, estudaram com sucesso a aplicação do método eletroquímico como pós-tratamento para a remoção de metabolitos de redução de corantes de corantes azo.

Assim, os métodos de tratamento físico-químicos podem ser efetivos na remoção ou destruição de corantes azo mas no geral envolvem procedimentos complicados e o custo é elevado. Para tratar grandes volumes de efluente têxtil a um custo mais baixo, a alternativa preferível é usar uma combinação destes métodos com o tratamento biológico (Pearce et al. 2003) (ver item 2.4.4).

2.4.3 Remoção biológica de corantes azo

2.4.3.1 Visão Geral

As possibilidades de processos biológicos para remoção de corante de efluentes industriais incluem tratamentos com enzimas, bactérias, fungos e algas. Os mais utilizados e investigados são os tratamentos com bactérias. A biodegradação pode ocorrer em condições aeróbias, anaeróbias e anóxicas, ou em processos de tratamento combinados de forma integrada ou sequencial.

Dos vários processos correntemente aplicados ao tratamento dos efluentes têxteis, os processos biológicos por lamas ativadas têm sido os mais utilizados, devido à larga experiência acumulada sobre este processo a sua eficiência e o seu baixo custo.

Dentro dos processos biológicos, os mecanismos de remoção de corantes podem incluir a adsorção (bioadsorção) e a biodegradação. A biodegradação pode ser parcial, desde a simples quebra da molécula de corante por redução da ligação azo e formação das aminas

correspondentes (compostos sem cor) até à formação de intermediários mais oxidados, ou total, com a mineralização completa dos metabolitos.

Pearce et al. (2003) indicam que a utilização de **enzimas** na remoção de cor em águas residuais contendo corantes não é economicamente sustentável devido aos custos associados à purificação destes biocatalisadores e pelo facto de frequentemente a degradação só ser efetiva se efetuada por um grupo de enzimas que atuam sequencialmente, o que leva a dificuldades na reconstrução deste processo utilizando enzimas puras. Por outro lado, a utilização dos sistemas enzimáticos dentro de células inteiras, viáveis ou em latência, oferece proteção às enzimas em ambientes agressivos (pH, inibidores) como os encontrados em tratamento de águas residuais industriais.

Foram identificadas em bactérias, leveduras e algas várias enzimas que reduzem a ligação azo, especificamente, redutases dependentes de FMN, redutases dependentes de NADH e redutases dependentes de NADH-DCIP (DCIP:diclorofenol indofenol) (DCIP:diclorofenol indofenol) (Solís et al. 2012).

A degradação oxidativa de corantes azo pode ser catalisada por peroxidases e lacases. Estas oxidases são produzidas por fungos filamentosos, bactérias e leveduras. As lacases têm potencial para a biorremediação devido a não necessitarem de cofatores e poderem utilizar o O₂ como aceitador final de eletrões (Solís et al., 2012), enquanto as peroxidases requerem a adição de H₂O₂ ao meio reacional. Os substratos oxidados incluem um largo espectro de compostos orgânicos, especialmente os aromáticos, bem como alguns compostos inorgânicos, através de mecanismos complexos envolvendo radicais livres (Morozova et al. 2007).

Os estudos de **leveduras** na descoloração de corantes ainda não estão muito desenvolvidos e os que já foram reportados focam-se mais na bioadsorção (Saratale et al., 2011). A biodegradação de corantes está associada ao crescimento e ao metabolismo primário das leveduras e requer uma fonte de carbono e de energia facilmente metabolizável como por exemplo a glucose (Solis et al. 2012). O valor de pH influencia muito o processo de biodescoloração. Por exemplo, a levedura *Trichosporon akiyoshidainum* remove os corantes por adsorção a um valor de pH de 2, mas a pH 7 o mecanismo de eliminação principal é a biodegradação (Solis et al. 2012). A degradação de corantes por leveduras pode ser realizada em condições aeróbias ou anaeróbias, no entanto em 12 trabalhos referidos por Solis et al. (2012), dos cinco em que o processo de descoloração foi identificado como biodegradação, apenas um foi realizado em condições anaeróbias. Em ambos os casos as eficiências de remoção são elevadas, em média acima dos 90%. Uma

das espécies mais utilizadas tanto nos estudos de bioadsorção como de degradação é a levedura *Candida tropicalis*.

Foram também utilizadas **algas**, não viáveis e em crescimento ativo, em estudos de remoção de cor de águas residuais, em particular microalgas. Os mecanismos de descoloração podem envolver bioadsorção, biodegradação ou ambas, no caso de utilização de células viáveis (Solis et al. 2012). Várias espécies de *Chorella* e *Oscillatoria* são capazes de degradar corantes azo originando aminas intermediárias, e podem ainda metabolizar estas aminas, resultando em compostos orgânicos mais simples ou na sua mineralização completa. Foi reportado que mais de 30 compostos azo foram biodegradados e descolorizados pelas espécies acima referidas (Saratale et al. 2011). Dos sete estudos com microalgas reportados por Solis et al. (2012), em quatro, a remoção foi obtida por bioadsorção e em 3 por biodegradação. O tratamento com microalgas pode vir a ser uma opção no futuro, especialmente devido ao baixo custo do seu cultivo em condições fotoautotróficas, obtendo a sua energia da luz solar e utilizando carbono inorgânico para crescimento (Solis et al. 2012). Em locais longe dos centros urbanos em que o valor dos terrenos é baixo, as lagoas de maturação com desenvolvimento de microalgas podem ser uma opção para a afinação ou pós-tratamento de efluentes têxteis.

De acordo com Solis et al. (2012) a capacidade dos **fungos filamentosos** para oxidar corantes azo está relacionada com a atuação de exoenzimas tais como as peroxidases e fenol oxidases, tendo-se observado para vários corantes uma completa mineralização, não havendo neste caso acumulação de intermediários potencialmente nefastos. Dentro das fenol oxidases foi identificada a atuação de tirosinases e lacases (Durán e Esposito 2000, dos Santos et al. 2007, Solís et al. 2012).

Solis et al. (2012) identificam 31 estudos com a utilização de fungos filamentosos para a degradação de corantes, com eficiências de remoção de cor próximas de 90%. Nestes estudos os fungos mais utilizados foram *Trametes versicolor*, que é um fungo da podridão branca da madeira, *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus niger*. Em 3 dos estudos o processo estudado foi exclusivamente a bioadsorção e noutros 11 incluiu também a bioadsorção, para além da biodegradação.

No entanto de acordo com Stolz (2001), a utilização à escala real de fungos lenhólitos para o tratamento de águas residuais levanta sérios problemas. Os biorreatores de estações de tratamento de águas residuais (ETAR) não são um habitat natural para os fungos, as enzimas lenhólíticas apenas atuam quando as concentrações de C e N biodisponíveis atingem valores muito reduzidos, a velocidade de degradação é baixa (por exemplo, 50 a 150 mg/L de corante necessitam de 5-10 dias para a sua biodegradação), a reação é

inespecífica, o que em águas residuais industriais complexas faz com que outros compostos oxidáveis por esta via entrem em competição com os corantes, e as peroxidases lenholíticas atuam sobretudo numa gama de pH ácida (4.5-5), que inibe a atuação de outros microrganismos úteis para o tratamento dos efluentes.

As **bactérias** são os microrganismos mais frequentemente utilizados para a remediação dos efluentes têxteis, pois são de crescimento rápido e adaptam-se eficientemente a uma larga gama de condições de tratamento, aeróbias, anaeróbias e facultativas (Solis et al. 2012). A degradação de corantes azo é geralmente realizada por culturas mistas e muitos autores indicam que as eficiências de biodegradação e mineralização são favorecidas por atividades co-metabólicas entre comunidades microbianas. No entanto o estudo da degradação de corantes por culturas bacterianas puras tem sido efetuado por vários investigadores possibilitando o exame detalhado dos aspetos bioquímicos e de biologia molecular envolvidos (Pearce et al., 2003). O uso de bactérias em eliminação de corantes é abordado em mais pormenor nas secções seguintes.

2.4.3.2 Degradação de corantes por bactérias em condições aeróbias

Os corantes azo são geralmente resistentes à descoloração por bactérias em meio aeróbio (Pearce et al. 2003, dos Santos et al. 2007, Solis et. al 2012). A presença de oxigénio usualmente inibe a atividade de redução da ligação azo provavelmente porque o oxigénio é um aceitador de eletrões mais efetivo, tendo preferência na captação de equivalentes redutores (dos Santos et al. 2007; Solis et al. 2012). No entanto, existem alguns casos reportados de degradação aeróbia de corantes envolvendo as bactérias *Geobacillus stearothermophilus*, *Listeria sp.*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp. e cereus*, *Pseudomas sp.*, e *Staphylococcus arlettae*, sendo que a maioria foi isolada de águas residuais têxteis ou solos contaminados (Evangelista-Barreto et al. 2009, Solís et al. 2012). Também foram publicados alguns estudos em que foram utilizadas culturas mistas (lamas ativadas) para a remoção de cor em aerobiose (Buitrón et al. 2004). A adaptação destes microrganismos para este efeito envolve um longo período de crescimento aeróbio da cultura em presença do corante. Alguns autores consideram que estas bactérias sintetizam azorredutases específicas com capacidade para reduzir a ligação azo na presença de oxigénio (Stolz 2001, Pearce et al. 2003).

2.4.3.3 Degradação de corantes por bactérias em condições anaeróbia

A redução anaeróbia de corantes azo é o processo biológico mais utilizado para a descoloração de águas residuais têxteis. Este mecanismo de clivagem reductiva da ligação azo na ausência de oxigénio é considerado como inespecífico relativamente aos microrganismos envolvidos e aos corantes degradados (Stolz 2001). Na secção 2.4.5 os mecanismos desta via de descoloração são abordados com mais pormenor. Apesar da redução de corantes azo poder ser obtida por diferentes microrganismos, não está reportada até à data nenhuma espécie que consiga degradar todos os corantes azo testados nos respetivos estudos. Assim, a utilização de culturas mistas parece ser uma escolha mais promissora (dos Santos et al. 2007), e há de facto muitos estudos publicados que utilizam culturas mistas, em condições anaeróbias estritas, para a degradação de corantes.

Na Tabela 2.9 são listados alguns estudos de remoção de corantes azo realizados em condições anaeróbias com culturas puras e com culturas mistas como lamas anaeróbias floculentas, lamas anaeróbias granulares e lamas ativadas. A necessidade da presença de um co-substrato como dador de eletrões foi demonstrada, por exemplo, no estudo de Brás et al (2001) em que este devia estar presente a um nível de COD > 300 mg O₂/L para uma remoção de cor eficiente.

A biorredução de corantes azo em condições anaeróbias é normalmente efetiva na remoção de cor da água residual, pois as aminas formadas são geralmente incolores. Algumas aminas substituídas como o caso das hidroxilaminas e carboxilaminas podem ainda conferir cor (Razo-Flores et al, 1997). A maioria das aminas é resistente à degradação por via anaeróbia o que pode ser atribuído aos grupos dadores de eletrões presentes na estrutura (grupos amino) (Field et al. 1995, Lourenço 2003). Daí que, na literatura científica seja frequentemente proposto um processo de tratamento biológico com duas etapas, uma anaeróbia e outra aeróbia, esta última com vista à biodegradação das aminas formadas (Lourenço et al. 2001, van der Zee e Villaverde 2005).

Tabela 2.9 Exemplo de estudos de remoção de corantes azo realizada com culturas bacterianas em condições anaeróbias (os dados adaptados de Pearce et al. 2003 estão referenciados com [1]; dos Santos et al. 2007 com [2]; e Solis et al. 2012 com [3]).

	Microrganismos	Corantes estudados	Resultados e observações	Referên- cia
Culturas puras	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> ; <i>Halomonas variabilis</i> e <i>Halomonas glacie</i> ; <i>Klebsiella oxytoca</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i>	Reactive Red 195; Reactive Red 2; Methyl Orange; Methyl Red, Orange G, Amaranth, Orange II, Direct Blue 15, Sudan III e IV	Tempos de reação: 36-100 h Eficiências de descoloração: 71-100%	Solis et al. (2012)
	<i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Bacteroides fragilis</i> ; <i>Clostridium perfringens</i> ; <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ; <i>Pseudomonas luteola</i> ;	Corantes alimentares; Amarantho, Orange II, tartrazina; Amarantho, Orange II, 4-hidroxiazobenzeno, tartrazina, alaranjado de metilo, 4-aminobenzeno; Reactive Orange 96; Reactive Red 22; Corantes azo reativos, corantes azo diretos e corantes usados em couro (peles).	Tempos de reação: 50 min a 8 h Eficiências de descoloração: 20-100% Eficiência de descoloração depende do potencial redox do corante; Testada a presença de sulfureto; Referida uma taxa de descoloração de 86 mg/(L.h)	Pearce et al. (2003)
	<i>Sphingomonas xenophaga BN6</i>	Acid Red 27; Acid Orange 20; Acid Orange 7; Acid Red 14; Acid Yellow 23; Acid Black 1	Referidas atividades de descoloração de 0,1-0,3 $\mu\text{mol}/(\text{min.g})$	Santos et al. (2007)
Lamas anaeróbias	Bactérias anaeróbias termofílicas	Vários corantes reativos azo e diazo	Tempo de reação: 48 h Eficiências de descoloração: 68-84%	[1] Banat et al. (1996)
	Bactérias metanogênicas e cultura mista	C.I. Acid Orange 7	Eficiências de descoloração: até 94%. Eficiência de remoção de cor maior em cultura mista do que em cultura metanogênica, e < 40% na ausência de co-substrato (glucose)	[1] Brás et al. (2001)
	Cultura mista anaeróbia	Corantes reativos	Observou-se descoloração	[1] Carliell et al. (1994)
	Cultura mista anaeróbia	Vermelho de metilo; Acid Orange 6; Acid Orange 7; Alaranjado de metilo	Tempo de reação: 20 dias Eficiências de descoloração: 100%	[3] Yemas-hova et al. (2009)
Lamas granulares anaeróbias	Condições mesofílicas	Acid Orange 7; Acid Red 266; Acid Yellow 137 e 159; Basic Red 23; Direct Black 19; Direct Blue 53 e 71; Direct Red 79 e 81; Direct Yellow 4, 12 e 50; Mordant Orange 1; Mordant Yellow 10; Reactive Black 5; Reactive Orange 14 e 16; reactive Red 2 e 4; Reactive Yellow 2	Eficiências de descoloração: 73-100%	[2] Van der Zee et al. (2001b)
	Condições mesofílicas	Reactive Red 235; Reactive Blue 235; Reactive Yellow 168	Eficiências de descoloração: 100%	[2] Willets e Ashbolt (2000)
	Condições mesofílicas	Mordant Blue 13 e Black 9; Basic Red 18; Acid Yellow 151; Direct Red 7; Acid Red 114; Direct Blue 15 e Yellow 12; Reactive Black 81; Acid Blue 113; Direct Black 19 e 22	Eficiências de descoloração: 51-94%	[2] Brown e Labreur (1983b)
	Condições mesofílicas e termofílicas (lamas aclimatadas)	Acid Orange 7	Tempo de reação: 48 h Eficiências de descoloração: 87-91%	Goncalves et al. (2009)
Lamas Ativadas	Culturas mistas provenientes de estações de tratamento	Reactive Red 3.1	Referidas taxas de descoloração de 20-30 mg/(L.h)	Bromley-Challenor et al. (2000)
	Cultura mista proveniente de um SBR laboratorial	Orange II	Eficiência de descoloração: 80%	Ong et al. (2005)

2.4.3.4 Degradação de corantes por bactérias em sistemas anaeróbios/aeróbios

Os sistemas anaeróbios/aeróbios parecem ser a proposta mais adequada para o tratamento biológico de efluentes têxteis contendo corantes azo, pois como referido anteriormente, podem permitir a biodegração e mineralização na fase aeróbia das aminas incolores formadas na fase anaeróbia (Lourenço et al. 2001, van der Zee e Villaverde 2005, Işık e Sponza 2008). As fases anaeróbia e aeróbia podem ocorrer em reatores separados (em sistemas contínuos ou descontínuos) ou no mesmo reator (sistemas contínuos ou descontínuos).

Para os sistemas anaeróbios/aeróbios em reatores separados há muitas combinações propostas. Alguns exemplos:

- Reator de leito fluidizado anaeróbio seguido de um reator de lamas ativadas; para os corantes *Acid Orange 7*, *8*, *10* e *Acid Red 14* foi reportada uma boa eficiência de remoção de cor mas não houve mineralização das aminas aromáticas formadas (Seshadri et al. 1994);
- Reator de manto de lamas anaeróbias granulares de fluxo ascendente (UASB) seguido de um reator de lamas ativadas; foi reportada uma eficiência de remoção de cor acima de 70% mas a mineralização das aminas aromáticas não foi estudada (O'Neill et al. 2000);
- UASB anaeróbio com lamas granulares seguido de um reator de lamas ativadas completamente agitado (CSTR); os autores obtiveram uma boa eficiência de remoção de cor e indicam um elevado grau de mineralização das aminas, tendo o teor de aminas sido determinado por colorimetria após reação com 4-dimetilamino benzaldeído (Işık e Sponza 2004, 2008);
- Biofiltro anaeróbio seguido de biofiltro aeróbio; foram obtidas eficiências de 98% de remoção de cor e de 65% de remoção de aminas (Cruz e Buitron 2001);
- Reator anaeróbio SBR seguido de um *moving bed sequencing batch biofilm reator* aeróbio (MB-SBBR); observou-se uma eficiência de remoção de 98% do corante *Acid Red 18*, e de 80% para as aminas formadas na fase anaeróbia (sendo uma delas a 4-amino-1-naftaleno-sulfonato, 4A1NS); o teor de aminas foi seguido por HPLC e verificou-se um desvio dos picos cromatográficos para menores tempos de retenção e uma redução da sua área, mas não o seu desaparecimento completo (Koupaie et al. 2012);
- Reator anaeróbio SBR seguido de um reator aeróbio de membrana (MBR); observaram-se eficiências de remoção de cor de 76,5% e 11% em cada etapa, respetivamente (88% no total), com formação de aminas na fase anaeróbia e a sua mineralização na fase aeróbia

(eficiência de remoção de 62%, quantificada por leitura da absorvência a 266 nm) (You et al. 2010).

Relativamente a sistemas anaeróbios/aeróbios no mesmo reator operados em contínuo, Gonzalez-Martinez et al. (2010) utilizaram como reator um biofiltro arejado e o corante estudado, *Direct Blue 2* (50 mg/L), foi adicionado a água residual doméstica. Obteve-se uma boa eficiência de remoção de COD, e uma remoção de cor de 61% no regime de arejamento combinado (parte inferior do biofiltro anaeróbia e parte superior aeróbia) e de 45%, no regime de arejamento alternado (12h/12h).

De facto, para sistemas anaeróbios/aeróbios no mesmo reator, a maioria dos estudos centra-se em sistemas descontínuos, mais especificamente em reatores sequenciais descontínuos (SBR) cujos estudos encontrados na bibliografia são resumidos na Tabela 2.10.

Observa-se que no geral para estes sistemas combinados anaeróbios/aeróbios a remoção de cor é eficiente, com indicação dos autores de que esta se dá, quase na totalidade, durante a fase anaeróbia.

No entanto, a subsequente mineralização na fase aeróbia das amins resultantes é ainda um assunto que necessita de maior atenção pois os resultados são pouco conclusivos. Por exemplo, observando a Tabela 2.10 verifica-se que há autores que não estudaram este aspeto, outros que indicam uma mineralização apenas parcial, e ainda outros que indicam que esta não ocorre, havendo apenas interconversão de metabolitos. Dos métodos utilizados para a quantificação e identificação de metabolitos nos estudos que abordam a mineralização das amins, a cromatografia HPLC parecer ser o mais fidedigno, embora as conclusões que proporcionam devam ser encaradas com cuidado. Pode ocorrer desaparecimento dos picos correspondentes às amins, o que indicaria a sua mineralização, mas o aparecimento de novos picos não identificados pode indicar a sua conversão em outros metabolitos. Por exemplo, foi já reportado que algumas amins aromáticas, quando na presença de oxigénio, ou seja, durante a fase aeróbia, podem sofrer autoxidação e os produtos resultantes podem ainda formar estruturas oligoméricas e/ou poliméricas (Field et al. 1995, Kudlich et al. 1997). Estes novos produtos podem ou não apresentar picos nos cromatogramas HPLC, dependendo das condições da análise.

Por exemplo, dois estudos publicados (Lourenço et al. 2001, Çınar et al. 2008) abordaram a biodegração do mesmo corante, *Remazol Brilliant Violet 5R*, em condições semelhantes, tendo indicado resultados diferentes. Num caso observou-se a transformação dum dos metabolitos (amina benzénica) noutra metabolito e a persistência, na fase aeróbia, do outro metabolito (amina naftalénica), enquanto o estudo mais recente reporta a mineralização da

amina benzénica e a dificuldade de mineralização da amina naftalénica. Ou seja, em ambos os estudos o pico cromatográfico da amina benzénica desapareceu de amostras colhidas após a etapa aeróbia, mas fica a dúvida se a mineralização reportada por Çinar et al. (2008) foi efetiva ou se corresponde apenas a uma transformação noutro composto.

Tabela 2.10 – Exemplos de trabalhos publicados abordando o tratamento de corantes azo em reator sequencial descontínuo (SBR) com etapas anaeróbia e aeróbia.

Inóculo	Duração das fases anaeróbia/aeróbia	Corante (mg/L iniciais)	Eficiência de descoloração e outras observações*	Teor inicial de COD (mg O ₂ /L) e % de remoção no ciclo anaeróbia / total	Destino das aminas	Referência
Lamas Ativadas (ETAR Municipal)	13h / 8h ciclo de 24h	Remazol Brilliant Violet 5R (90)	90% ; IL=15 d 30% ; IL=10 d	(750) 10 / 70 30 / 80	Detetadas (HPLC) e não mineralizadas	Lourenço et al. (2001)
	11h / 10h ciclo de 24h	Remazol Black B (30)	75% ; IL=15 d 75% ; IL=20 d	(750) ≈ 45 / 80 - / -	Não analisadas	
Lamas ativadas (ETAR Municipal)	18h / 5h ciclo de 24h	Remazol Black B (10)	59-77% ; IL=8 d	(500) - / 92-97	Não analisadas	Panswad et al. (2001)
Lamas granulares anaeróbias (UASB)	18,5h / 0,5h ciclo de 24h	Remazol Black B (-)	95%	(3500) - / 66	Detetadas (espectrof.); mineralização incompleta	Shaw et al. (2002)
Lamas ativadas (ETAR Municipal) aclimatadas	3d / 1d	Dispersive Blue 79 (75-100)	72-95%	(-) - / -	Mineralizadas (HPLC)	Melgoza et al. (2004)
	21h / -	Efluente têxtil real	80%	(-) - / -	Detetadas** (HPLC)	
Lamas ativadas (reator piloto) aclimatadas	8-12h / 12-8h ciclo de 24h	Efluente têxtil real (tingimento de lãs)	65-67% 40% para efluente de cor escura	(780 a 5000) ≈ 30 ⁽¹⁾ / 85 ⁽¹⁾ deduzida	Não analisadas	(Goncalves et al. 2005)
Lamas ativadas (ETAR municipal)	10,5h/10h ciclo de 24h	Remazol Brilliant Violet 5R (100)	90-99%	(600) 61-75 / 80	Detetadas (HPLC) e não mineralizadas	Albuquerque et al. (2005)
	10,5h/10h ciclo de 24h	Acid Orange 7 (25)	5-10%; --- 95%; c/ adição mediador redox ***	(600) 49-71 / 80	Detetadas (HPLC) e não mineralizadas	
Consórcio de bactérias anaeróbias facultativas ****	2-19h / 21-4h ciclo de 23h	Remazol Rot RR (60)	95% ; > 6h de fase anaeróbia	(500) 50 / 85	Não analisadas	Kapdan e Oztekin (2006)
Cultura mista (ETAR Industrial têxtil)	12h / 12h ciclo 24h	Remazol Brilliant Violet 5R (100)	89%	(1000) 70 / >75	Detetadas por HPLC: amina benzénica mineralizada (92%); amina naftalénica não mineraliz.	Çinar et al. (2008)
Lamas ativadas (ETAR Municipal) aclimatadas	19h / 4h Ciclo 24h	Reactive Red 195 (-)	95% ; IL=50 d	(600) 90 / 93	Não analisadas	Farabegoli et al. (2010)

(*) IL=idade de lamas em dias, (**) aminas detetadas correspondentes a só 25% de conversão do corante, (***) antraquinona-2,6-dissulfonato, (****) cultura mista bacteriana constituída por *Alcaligenes faecalis* e *Comamonas acidovorans*.

2.4.4 Processos combinados físico-químicos e biológicos

Devido ao custo elevado dos processos físico-químicos e às limitações dos processos biológicos na sua capacidade de mineralização total dos corantes, vários autores propõem sistemas combinados para o tratamento de águas residuais têxteis contendo corantes azo. Na maioria dos casos os processos físico-químicos envolvem tratamentos com ozono, ou outros processos avançados de oxidação (AOP) como sejam foto-Fenton ou UV/H₂O₂. Relativamente ao processo biológico foram publicados vários estudos com culturas puras, mas os exemplos apresentados na Tabela 2.11 são apenas entre os que utilizam culturas mistas, pela sua maior relevância em termos de aplicabilidade a sistemas industriais, como já discutido anteriormente. Verifica-se que em geral os AOP são usados como pré-tratamento na remediação de águas residuais industriais (Oller et al. 2011). Na maioria dos processos propostos para o tratamento de águas residuais têxteis em que o pré-tratamento é uma oxidação química, segue-se um tratamento biológico aeróbio. A descoloração é obtida por via química e o tratamento biológico remove a carga orgânica (COD) restante, os sólidos suspensos e promove eventualmente a subsequente mineralização dos produtos da conversão do corante formados na primeira etapa. No entanto, em estudos recentes surgem várias propostas de sistemas em que a primeira etapa é biológica e os AOP são aplicados no pós-tratamento. Aqui, o tratamento biológico proposto é sempre anaeróbio ou anaeróbio/aeróbio, obtendo-se com este a descoloração e remoção de COD, e os AOP servem para promover uma mineralização mais efetiva dos metabolitos do corante que possam subsistir, bem como a oxidação de outros compostos recalcitrantes. A aplicação dos AOP pode inclusive resultar num aumento da oxidabilidade (expressa em COD) e biodegradabilidade (expressa em CBO₅) dos produtos residuais, quando a mineralização não é total. Neste caso, a recirculação do efluente após o AOP à etapa biológica pode incrementar o grau de mineralização total. Num dos estudos apresentados na Tabela 2.11, (Lotito et al. 2012a), a ozonização é aplicada à corrente do sobrenadante decantado que é recirculada de volta à fase aeróbia do biotratamento.

Tabela 2.11 – Exemplos de estudos envolvendo o tratamento de águas residuais têxteis contendo corantes azo através de processos combinados físico-químicos e biológicos (as referências adaptadas de Solis et. al 2012, estão referenciadas com [1]).

Processo Combinado	Condições do processo	Observações	Referência
Oxidação Química / Biológico			
Ozonização / Tratamento aeróbio	Ozono, 30-45 mg/h. Lamas ativadas, aeróbio, 2 dias TRH	96% remoção de cor.	Van Leeuwen et. al, (2009) [1]
Ozonização / Tratamento aeróbio	Ozono, 1L/min, 2-60 min, pH 3-1. Lamas aeróbias sobre partículas de carvão ativado, 24h, pH 9.	96% remoção de cor com ozonização mas efluente tóxico. Sem toxicidade após biológico.	de Souza et. al (2010) [1]
Ozonização / Tratamento aeróbio	Ozonização, razão corante/O ₃ = 4,5; pH 11. Tratamento por biofiltração aeróbia.	30% remoção COD com ozonização; 90% com pós-tratamento biológico, e 97% remoção de cor.	Lu et. al (2009) [1]
Foto-Fenton / Tratamento aeróbio	Foto-Fenton assistido por radiação solar, 2-5 ppm Fe(II), 65-225 ppm H ₂ O ₂ . Tratamento biológico aeróbio.	4-30% remoção de COD com ozonização, 27-50% com pós-tratamento biológico.	Garcia-Montano et al. (2008)
Fenton / Tratamento aeróbio Foto-Fenton / Tratamento aeróbio TiO ₂ / Tratamento aeróbio	Fenton, pH=2,8, 3h. Foto-Fenton, 1h. TiO ₂ 0,25-1 g/L, pH 3-7, 4h. Tratamento biológico: lamas aeróbias 28 dias TRH	96-98% remoção de cor e 76-86% de biodegradação com pós-tratamento biológico.	Prato-Garcia et. al, (2008) [1]
UV/H ₂ O ₂ / Tratamento aeróbio	UV a 254nm, 21-W, 15-60 min. H ₂ O ₂ /250-1000ppm, pH 7. SBR aeróbio, ciclo 24h.	89-100% remoção de cor, 1-54% remoção de COD e aumento da biodegradabilidade com a ozonização.	Dokuzoğlu e Alkan (2010)
Biológico / Oxidação Química			
Biológico / Ozonização	Tratamento biológico não especificado. Ozono, 20 mg/L, 10 a 60 min.	10 min de ozonização produzem efluente sem toxicidade, com 40 min obtém-se um efluente quase transparente.	Baban et al. (2003)
Anaeróbio / Eletroquímico	UASB Anaeróbio Tratamento eletroquímico com elétrodo de diamante dopado com boro, corrente imposta de 10 a 20 mA/cm ² por 200 mL (8h)	Tratamento eletroquímico do efluente UASB: 45-90% remoção de COD, 44-100% remoção corante e 65-91% de remoção de compostos aromáticos	(Carvalho et al. 2007)
Anaeróbio / Foto-Fenton Anaeróbio / Ozonização	Digestão anaeróbia, 27 dias TRH*, 50°C. Foto-Fenton, lâmpada preta fluorescente 6W. Ozonização 1,75g/h pH 3.	Produtos da reação anaeróbia mais tóxicos que o corante inicial e menos tóxicos após ozonização (83% mineralização). Foto-Fenton não foi eficiente.	García-Montaño et al. (2008)
Anaeróbio / Foto-Fenton	Lamas em anaerobiose, 14 dias. Foto-Fenton, lâmpada azul UV-vis 18W, 1mM Fe(II), 1 mM H ₂ O ₂ .	Produto final sem toxicidade, mas autores indicam que Foto-Fenton seguido de tratamento aeróbio é mais eficiente.	Jonstrup et. al (2011) [1]
Anaeróbio/Aeróbio / Ozonização	SBR, lamas ativadas ciclo 6h c/ arejamento intermitente de 40 min. Ozono 170-250mg/L	A ozonização como pós-tratamento é necessária para cumprir as normas de descarga. Remoção de COD 60% e 90% sem e com ozonização, respetivamente.	Kim et al. (2011)
Anaeróbio/Aeróbio / Ozonização	SBBGR** com ciclo 6h e recirculação da fase líquida, 1h anaerobiose, 5h aerobiose. Ozono aplicado na recirculação à fase aeróbia, 45-135 mg/L, 30-60 min.	Este tratamento combinado permite o cumprimento das normas para a descarga no meio recetor, importante para cumprir o parâmetro cor.	Lotito et al. (2012a)

(*) TRH – tempo de retenção hidráulico, (**) SBBGR - *sequencing batch biofilter granular reactor*.

2.4.5 Mecanismos de degradação de corantes azo

2.4.5.1 Mecanismos de redução anaeróbia de corantes azo

Os investigadores Hong et al. (2007a, 2007b) demonstraram a capacidade da *Shewanella decolorationis* S12 para crescer e obter energia em condições anaeróbias, utilizando vários doadores de eletrões como o formato, lactato, piruvato ou H₂ com redução de vários corantes azo.

A redução de corantes foi testada com células viáveis, a respetiva fração membranar (Hong et al. 2007a, 2007c), a fração periplásmica e a fração citoplásmica (Hong et al. 2007a). Apenas as células viáveis e a fração membranar foram capazes de reduzir os corantes azo na presença dos doadores de eletrões referidos (Hong et al. 2007a, 2007b). Foi demonstrada a relação estequiométrica entre o consumo de formato e a redução do corante azo amaranço em termos de transferência de eletrões (Hong et al. 2007b). Por outro lado, Brigé et al. (2008) demonstraram que a redução de corantes requer elementos chave da membrana citoplasmática, do periplasma e da membrana exterior, mas que é independente das enzimas citoplasmáticas. Hong et al. (2007a, 2007b) reportam que os doadores de eletrões acetato, propionato, salicilato, glicerol, etanol e citrato não foram efetivos na azorredução de corantes e Brigé et al. (2008) confirmaram o mesmo para o acetato, citrato e glucose utilizando a espécie *Shewanella oneidensis*.

Foram testados conhecidos inibidores do mecanismo de respiração em bactérias como iões Cu²⁺ (5 µM), dicumarol (200 µM), *stigmatellin* (100 µM) e *metyrapone* (100 µM) e verificou-se que a redução anaeróbia de corantes azo com células viáveis e a fração membranar de *S. decolorationis* S12 foi inibida (Hong et al. 2007a). Os investigadores concluíram que este é um processo bioquímico que oxida os doadores de eletrões e transfere estes últimos para os aceitadores (corantes azo) através de um sistema com múltiplos componentes. Este sistema está com a cadeia de transporte de eletrões que envolve desidrogenases, citocromos e menaquinonas, ou seja, o processo de azorredução é um mecanismo de respiração anaeróbia (Hong et al. 2007a, 2007b). Um estudo posterior com vesículas membranares reforçou esta hipótese pelo facto de ter havido igual repressão da síntese de ATP pela ausência do corante azo (inexistência de aceitador final de eletrões para a reação de respiração) e pela presença do inibidor de ATPase diciclohexilcarbodiimida (DCCD) (Hong et al. 2009).

No mesmo sentido, Brigé et al. (2008) demonstram que a redução de diferentes corantes segue a mesma via de redução extracelular, requerendo uma transferência de eletrões que faz parte da respiração anaeróbia e envolve no mínimo a formato desidrogenase (FDH) (deduzido de uma experiência com formato como dador de eletrões), a menaquinona (MQ),

e citocromos do tipo c localizados ao longo da cadeia. Estes são o *CymA* na membrana citoplasmática, e as proteínas chave deste sistema a *MtrA* (periplasma) e a *OmcB* localizada na membrana exterior que pode atuar como redutor terminal do corante. Os investigadores também indicam que a sobre expressão da melanina, como mediador redox extracelular pode incrementar a descoloração. Na Figura 2.5 encontra-se representado um esquema simplificado deste mecanismo.

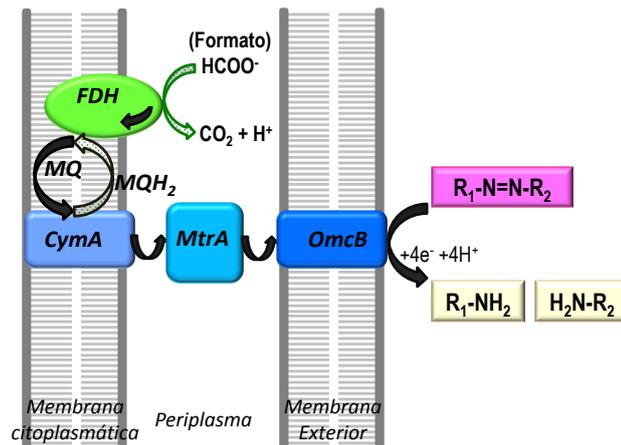


Figura 2.5 – Mecanismo simplificado de descoloração como parte integrante do sistema de respiração anaeróbia em *Shewanella oneidensis*. Adaptado de Brigé et al. (2008) e Hong et al. (2009).

Foi também demonstrada a aparente insignificância do mecanismo de respiração aeróbia na descoloração, pois a inativação de componentes centrais deste como a ubiquinona não teve qualquer efeito na descoloração (Brigé et al. 2008).

O mecanismo de descoloração por via da respiração anaeróbia parece ser uma hipótese bastante sólida e coerente, vai também ao encontro do indicado por outros investigadores, nomeadamente, que o mecanismo é maioritariamente extracelular e inespecífico podendo ser efetuado por uma grande variedade de bactérias anaeróbias ou facultativas (Keck et al. 1997, Kudlich et al. 1997, Stolz 2001, Pearce et al. 2003, van der Zee et al. 2003). Na verdade, a hipótese de um mecanismo intracelular não parece consistente, devido a diferentes constatações. Mais concretamente: nunca se verificou uma correlação entre descoloração e estrutura do corante (Stolz 2001), os corantes são moléculas de elevado peso molecular o que levanta dificuldades no atravessamento da membrana celular (Robinson et al. 2001) e ocorre descoloração de corantes sulfonados para os quais a membrana celular apresenta permeabilidade muito limitada (Stolz 2001).

O mecanismo proposto também não contradiz os vários resultados de descoloração obtidos na presença de mediadores redox (MD) como as quinonas (Keck et al. 1997, Kudlich et al. 1997), pois estas podem ter maior tendência para receber os equivalentes redutores, fornecidos pelos elementos membranares (potencial de redução padrão, E^0 , mais elevado), podendo em seguida reduzir o corante através duma reação redox puramente química como representado na Figura 2.6.

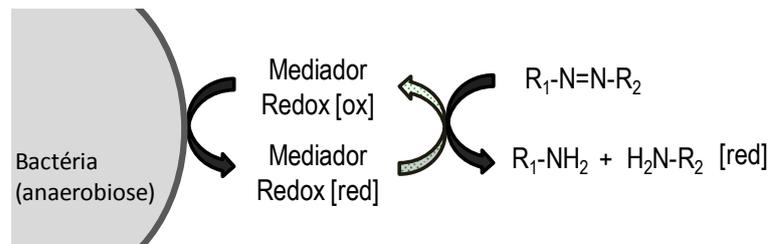


Figura 2.6 - Mecanismo proposto para a reação de biodescoloração na presença de mediadores redox.

Da mesma forma, pode também ocorrer a descoloração por via puramente química, por reação com compostos inorgânicos reduzidos como o H_2S , originado pela ação de bactérias sulfato redutoras, como esquematizado na Figura 2.7. De qualquer forma a contribuição desta última reação para a descoloração anaeróbica *in vivo* parece ser inconsistente segundo dos Santos et al. (2007). Isto dado que concentrações até 60mM de sulfato não alteraram a eficiência de descoloração (van der Zee e Villaverde 2005) e num estudo em SBR anaeróbio-aeróbio suplementado com 0,35mM de SO_4^{2-} não se observou alteração da eficiência de descoloração apesar de ser ter instalado no reator uma população microbiana sulfato redutora (Albuquerque et al. 2005).

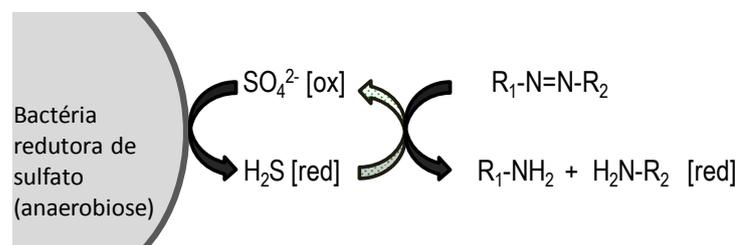


Figura 2.7 - Mecanismo proposto para a reação de descoloração na presença de compostos biogénicos reduzidos (H_2S).

Foram também publicados vários estudos que reportam a descoloração na presença de extratos celulares (ausência de células inteiras) (Kudlich et al. 1997) ou culturas previamente autoclavadas (Lourenço et al. 2001, van der Zee et al. 2003). Tal não contradiz o

mecanismo proposto, apontando apenas para a possível persistência, nestes agentes biológicos, de espécies membranares ou citoplasmáticas capazes de reduzir o corante quimicamente. Aqui, a capacidade de descoloração provavelmente é limitada, cessando quando os equivalentes redutores se esgotam. Kudlich et al. (1997) indica que as espécies citoplasmáticas e membranares que reduzem o corante são provavelmente sistemas enzimáticos distintos, pois reagem de forma distinta ao inibidor p-hidroximercurio-benzenossulfonato. Especificamente, este composto inativou quase na totalidade a atividade redutora do extrato membranar, e não teve praticamente efeito na atividade do extrato citoplasmático (Kudlich et al. 1997).

Estas reações puramente químicas são reguladas pela diferença entre os potenciais redox dos compostos envolvidos e os dos corantes azo (Stolz 2001). Na Figura 2.8 pode ver-se a apetência para a captação de eletrões dos vários pares redox expressa pelos respetivos valores de potencial de redução padrão. Dos listados, o oxigénio é o aceitador de eletrões mais efetivo o que justifica a inibição da descoloração na presença de O_2 (dos Santos et al. 2007).

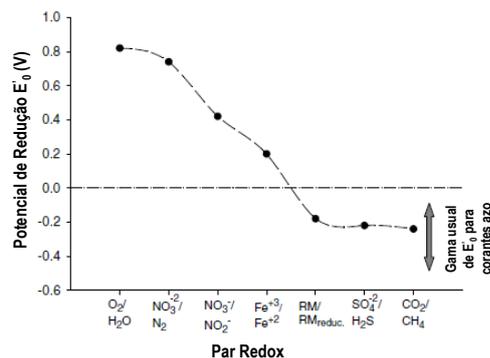


Figura 2.8 – Potencial de oxidação-redução padrão de vários pares redox relevantes para processos biológicos, com identificação da gama de valores mais corrente entre corantes azo. Figura adaptada de dos Santos et al. 2007, em que RM e RM_{reduc} são respetivamente a forma oxidada e reduzida do mediador redox mencionado pelos autores.

Da mesma forma a presença de nitrato (NO_3^-) também deverá atrasar ou impedir a descoloração, devido ao seu elevado valor de E^0 , muito próximo do oxigénio. Este mesmo efeito foi reportado por vários investigadores (Lourenço et al. 2000, Panswad e Luangdilok 2000, van der Zee e Villaverde 2005).

2.4.5.2 Mecanismo da oxidação aeróbia de amins provenientes da redução de corantes azo

Como foi já referido, a operação de biorreatores com bactérias em condições anaeróbias possibilita a redução da ligação azo de corantes, mas nestas condições nunca foi reportada a mineralização das amins aromáticas resultantes (Field et al. 1995, Lourenço 2003, Tan et al. 2005b). Assim, foi repetidamente proposta a implementação da sua biodegradação numa subsequente etapa aeróbia. No entanto, como já foi discutido e pode ser observado na Tabela 2.10, no que respeita à mineralização das amins aromáticas em SBR com fase aeróbia, os resultados são ainda bastante inconclusivos.

Utilizando uma base de dados que prevê as possíveis vias de biodegradação de compostos químicos por combinação de reações conhecidas (Gao et al. 2010) e introduzindo a fórmula química do *Acid Red 14*, corante modelo utilizado nesta dissertação, verifica-se que após redução da ligação azo, é possível a biodegradação aeróbia da amina 2-amino-4-hidroxi-1-naftaleno sulfonato (2A4H1NS - posição *orto*) e é mais difícil (improvável) a degradação da 4-amino-1-naftaleno-sulfonato (4A1NS -posição *para*), como se pode ver na Figura 2.9. Esta previsão está de acordo com o indicado por vários autores que observaram que a biodegradação de amins sulfonadas não é fácil (Pinheiro et al. 2004, Tan et al. 2005b, van der Zee e Villaverde 2005, Pandey et al. 2007), necessitando da presença de bactérias especializadas e aclimatadas. Está igualmente de acordo com a proposta do mecanismo de biodegradação aeróbia por hidroxilação seguida de abertura de anel referida por vários autores (Kulla et al. 1983, Zissi e Lyberatos 1996, Lourenço et al. 2000).

É de ressaltar que a base de dados utilizada não contempla a formação de dímeros ou oligómeros (Gao et al. 2010). No entanto foi já reportado que certas amins aromáticas são suscetíveis de reações de acoplamento oxidativo (Field et al. 1995). Em presença de oxigénio elas podem sofrer reações de auto-oxidação, em particular as amins com grupos hidroxilo na posição *orto* em relação ao grupo amino (Kudlich et al. 1999) formando oligómeros ou mesmo polímeros insolúveis (Field et al., 1995). No mesmo sentido, Pereira et al. (2009) descrevem que na degradação enzimática do corante azo *Sudan Orange G* pela lacase bacteriana CotA, também os intermediários formados (configuração *orto*) sofrem reações de acoplamento entre si, ou com moléculas intactas de corante, formando variados oligómeros e possivelmente polímeros insolúveis (foi observada a formação de precipitados). É assim de prever que em condições aeróbias a amina *orto* 2A4H1NS também sofra este tipo de reações.

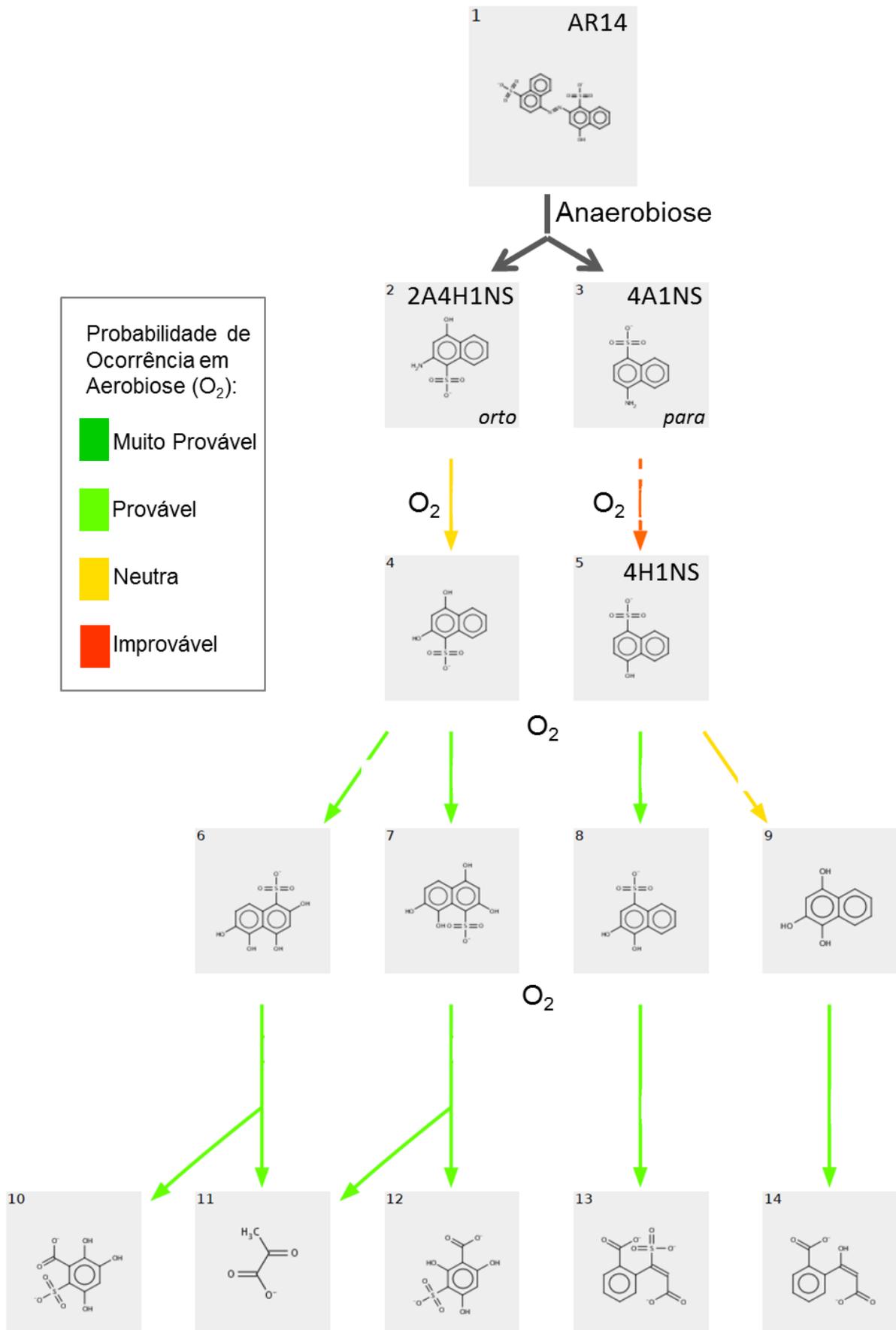


Figura 2.9 - Previsão de mecanismos plausíveis de degradação microbiana em aerobiose para as aminas resultantes da redução do *Acid Red 14*, de acordo com Gao et al. (2010) [a base de dados não contempla reações de dimerização].

(intencionalmente em branco)

3 BIORREACTORES DE GRÂNULOS AERÓBIOS

3.1 Resumo

Este capítulo apresenta uma revisão do estado atual dos conhecimentos no domínio dos biorreatores de lamas granulares aeróbias. As suas vantagens face aos processos convencionais de lamas ativadas são aqui apresentadas, bem como os aspetos mais importantes no que respeita à definição de grânulo aeróbio, ao seu mecanismo de formação e às suas funções biológicas. São também abordados os vários fatores que podem influenciar a formação e desempenho dos grânulos aeróbios em biorreatores, tais como a configuração do reator, o tempo de sedimentação proporcionado, os níveis de tensão de corte aplicados, o tempo de residência hidráulico, a disponibilidade de oxigénio dissolvido, a temperatura, o tipo de substrato alimentado e respetivas carga orgânica e a existência ou não de uma fase aeróbia dita de fome. São referidos também efeitos associados importantes, como a formação de polímeros extra celulares, a hidrofobicidade celular, a seleção de organismos de crescimento lento e a acumulação intracelular de substrato durante uma fase anaeróbia. É apresentada também uma súmula de exemplos de tratamento de águas residuais industriais com grânulos aeróbios bem como a sua aplicação específica ao tratamento de efluentes têxteis, que ainda se encontra numa fase incipiente.

3.2 O processo de lamas ativadas: grânulos versus flocos

O processo de lamas ativadas é um sistema reacional para tratamento secundário de águas residuais, que se baseia numa cultura mista de microrganismos em suspensão e é operado em condições maioritariamente aeróbias. Este sistema é basicamente constituído por um tanque de arejamento (reator biológico) à qual a água residual aflui, em contínuo ou em descontínuo, e se mistura com as lamas ativadas (microrganismos), formando o denominado licor misto. Neste tanque é fornecido oxigénio a partir do ar, proporcionando-se igualmente agitação, dando-se a oxidação biológica dos compostos orgânicos e de alguns inorgânicos (por exemplo, amónia e sulfureto). O licor misto segue para um decantador secundário onde os microrganismos em suspensão, que estão agregados em flocos, sedimentam. O líquido clarificado constitui a água residual tratada e é descarregada pelo topo do decantador. É mantida uma concentração elevada de microrganismos no processo através da recirculação de parte das lamas ativadas do fundo do decantador para o tanque de arejamento. São também removidas, periódica ou continuamente, lamas em excesso do sistema. Se for proporcionada uma zona ou período operacional em condições anóxicas no tanque reacional, pode conseguir-se a remoção de azoto por desnitrificação de nitrato formado na zona ou etapa arejada. A remoção de fósforo é usualmente realizada por precipitação química com sais de alumínio ou ferro (Metcalf & Eddy. 2003). Contudo, pode obter-se a remoção biológica de fósforo pela sua incorporação na biomassa se for proporcionada uma zona ou etapa anaeróbia no tanque reacional, com ausência de oxigénio e de nitrato.

Os reatores sequenciais descontínuos (SBR) são casos particulares de sistemas de lamas ativadas, funcionando em regime descontínuo de carga cíclica. O ciclo operacional é constituído por diversas fases sequenciais (enchimento, reação, sedimentação e descarga). Dispensam o decantador secundário e a recirculação de lamas, ou seja, as diferentes fases de tratamento dão-se no mesmo tanque (Razo-Flores et al. 1997). A possibilidade de variação do tempo de cada uma das fases confere uma flexibilidade considerável a este sistema, sendo muito utilizado para aplicações com remoção avançada de nutrientes e tratamento de águas residuais industriais.

Em termos mundiais, o tratamento de águas residuais é feito maioritariamente por processos de lamas ativadas convencionais. A biologia deste processo foi otimizada e atingiu os seus limites (de Kreuk et al. 2007). No entanto, os problemas de sedimentabilidade das lamas continuam a requerer atenção (de Kreuk et al. 2007), dado que há problemas operacionais frequentes relacionados com a deficiente compactação e

sedimentabilidade das lamas, resultando em perda de biomassa nos decantadores secundários com deterioração da qualidade do efluente clarificado (Gerardi 2002). Para além disso, estes sistemas necessitam de uma grande área de implantação e a obtenção de remoção biológica de azoto e fósforo requer projetos complexos, que implicam por sua vez complexidade na sua operação (Keller e Giensen 2010).

Os grânulos aeróbios são auto-agregados de microrganismos que têm propriedades de sedimentação extremamente favoráveis quando comparados com os flocos característicos das lamas ativadas convencionais, dispensando o uso de decantadores dedicados (de Bruin et al. 2004) e reduzindo para poucos minutos a duração do período de sedimentação em sistemas integrados como os SBR. Devido a estas características, os sistemas de grânulos aeróbios são compactos e podem operar com elevadas concentrações de biomassa permitindo tratar cargas orgânicas elevadas (de Bruin et al. 2004).

Bruin et al. (2004) indicam que um sistema de grânulos aeróbios necessita apenas de 25% da área de implantação de um sistema de lamas ativadas convencional, e Keller e Giensen (2010) indicam que a concentração usual de biomassa é da ordem de grandeza dos 10-15 gTSS/L, em comparação com os 2-5 gTSS/L dos biorreatores convencionais.

Foi demonstrado que é possível cultivar, em SBR de geometria tubular, grânulos aeróbios que, operando em ciclos com fase reacional inteiramente aeróbia, removem simultaneamente compostos de carbono e azoto, tendo esta tecnologia sido patenteada (Heijnen e van Loosdrecht 1998). O desenvolvimento posterior da investigação do sistema acrescentou a este regime uma fase de enchimento lento em condições anaeróbias, pelo fundo do reator, que torna possível a remoção simultânea de carbono, azoto e fósforo num único reator. Foi assim submetida uma extensão da patente anterior (Van Loosdrecht e de Kreuk 2006).

Na Figura 3.1 podem ver-se imagens de lamas ativadas (flocos) e grânulos aeróbios que elucidam bem as diferenças de dimensão e densidade que justificam as diferenças de comportamento referidas anteriormente.

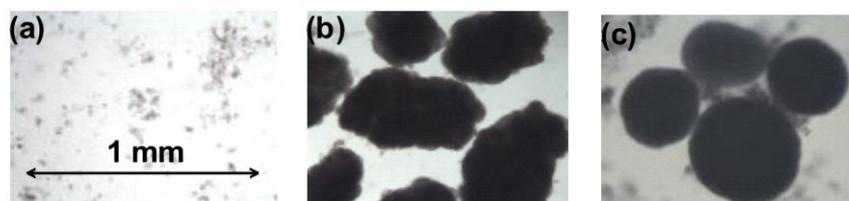


Figura 3.1 - (a) Lamas ativadas de ETAR municipal, (b) grânulos aeróbios obtidos num SBR laboratorial totalmente aeróbio (Mata et al. 2012) (c) e obtidos com fase anaeróbia e aeróbia (Mata et al. 2015).

Em 2007 A empresa Royal HaskoningDHV submeteu uma patente para o tratamento de águas residuais com grânulos aeróbios (de Bruin et al. 2007) sob a marca *Nereda*[®], e a primeira ETAR municipal que utiliza esta tecnologia foi construída em Epe, na Holanda. Entrou em funcionamento em 2012 e serve 59 000 habitantes. É constituída por uma obra de entrada tradicional com gradagem e remoção de óleos e gorduras, por três tanques de reação (SBR) onde se dá um enchimento pelo fundo em anaerobiose, em simultâneo com a descarga do efluente tratado pelo topo, seguido de uma fase de arejamento. O tratamento é finalizado com uma filtração tradicional em leito de areia (Verdult 2011).

As vantagens indicadas são uma redução em 75% da área requerida, 20% de redução em custos de construção e operação, e 20% de redução em custos de energia devido a menores necessidades de bombagem de recirculação visto que o tratamento é todo realizado no mesmo tanque (Verdult 2011). A ETAR de Frielas em Portugal foi por sua vez pioneira na conversão de um sistema de lamas ativadas convencional para um sistema de grânulos aeróbios. Inocêncio et al. (2013) reportam uma redução de 30% nos custos de arejamento no tanque convertido para esta tecnologia *Nereda*[®]. Os autores indicam ainda que esta redução pode atingir 50% se forem contabilizadas as poupanças pelo facto de não se utilizarem decantadores secundários, bombas de recirculação e sistemas de filtração final.

Uma outra vantagem referida para os grânulos aeróbios é a manutenção da sua integridade e a rápida recuperação da atividade biológica (em cerca de uma semana) após longos períodos de armazenamento (2 a 6 meses) (Zhu e Wilderer 2003, Zeng et al. 2007, Wang et al. 2008, Mata et al. 2012).

As desvantagens apontadas a esta nova tecnologia são o desconhecimento ainda existente sobre o processo de formação dos grânulos (de Kreuk et al. 2007, Keller e Giensen 2010, Seviour et al. 2012), e uma formação excessivamente lenta dos mesmos no arranque dos sistemas (de Kreuk et al. 2007), sendo necessários vários meses até serem obtidos grânulos estáveis.

Em resumo, pode afirmar-se que é necessário continuar a investigação sobre a formação dos grânulos aeróbios e o controlo da sua estabilidade, bem como a sua aplicação a variados tipos de efluentes, mas que sem dúvida esta nova tecnologia é revolucionária na sua simplicidade e pode vir a ser o tratamento padrão no futuro.

3.3 Características dos grânulos aeróbios

3.3.1 Definição de grânulo aeróbio

A definição do que é um grânulo aeróbio foi proposta em 2005 durante o primeiro *workshop* sobre o tema, e indica que os grânulos são agregados de microrganismos, que não coagulam sob baixas tensões de corte hidrodinâmicas, e que sedimentam com velocidade significativamente maior que as lamas ativadas (de Kreuk et al. 2005b) Posteriormente em 2006, esta definição foi analisada, explicada, e completada. Apresenta-se a seguir um resumo dos aspetos-chave (de Kreuk et al. 2007):

- os agregados são formados sem a adição de um material de suporte;
- os flocos de lamas ativadas tendem a coagular quando sedimentam, enquanto que os grânulos aeróbios não coagulam, sedimentando como unidades separadas;
- o valor de SVI_{10} (índice de volume de lamas medido após 10 minutos) e o de SVI_{30} (idem, após 30 minutos), em conjunto dão uma boa indicação da sedimentabilidade dos grânulos aeróbios e devem ser usados para os caracterizar;
- a dimensão mínima dos grânulos é de cerca de 0,2 mm, mas este limite pode ser flexível desde que as características anteriores se observem;
- a peneiração é considerada um método adequado para a recolha (amostragem) de grânulos de tanques de lamas ativadas ou de reatores aeróbios com biomassa granular.

Quando um agregado cumpre as características acima descritas pode ser considerado um grânulo aeróbio (de Kreuk et al. 2007).

3.3.2 Mecanismo de formação dos grânulos aeróbios

Beun et al. (1999) propôs um mecanismo de formação dos grânulos que está representado na Figura 3.2. Segundo o mecanismo proposto, após a inoculação do SBR com lamas ativadas dispersas os fungos tornaram-se dominantes. Tal acontece porque os fungos formam facilmente *pellets* miceliais densos que sedimentam rapidamente e ficam retidos no reator que opera com um tempo de sedimentação curto. Devido à tensão de corte elevada induzida pelo arejamento no reator, ocorre a quebra dos filamentos da superfície dos *pellets* e estes ficam mais compactos. Os *pellets* crescem até à dimensão de 5 ou 6 mm e seguidamente tendem a desintegrar-se, devido provavelmente às limitações de acesso do oxigénio ao interior do agregado. Os *pellets* miceliais parecem entretanto funcionar como

uma matriz de suporte na qual as bactérias podem crescer e formar colónias. Quando estes se desintegram, as colónias de bactérias tendem a manter-se no reator pois já são suficientemente grandes e densas e sedimentam rapidamente. Neste caso o arranque do processo foi feito com um inóculo de biomassa dispersa não sedimentável, mas é de realçar que o investigador indica que, se o inóculo de partida for diferente (flocos ou pequenos grânulos) o mecanismo de granulação também vai ser diferente.

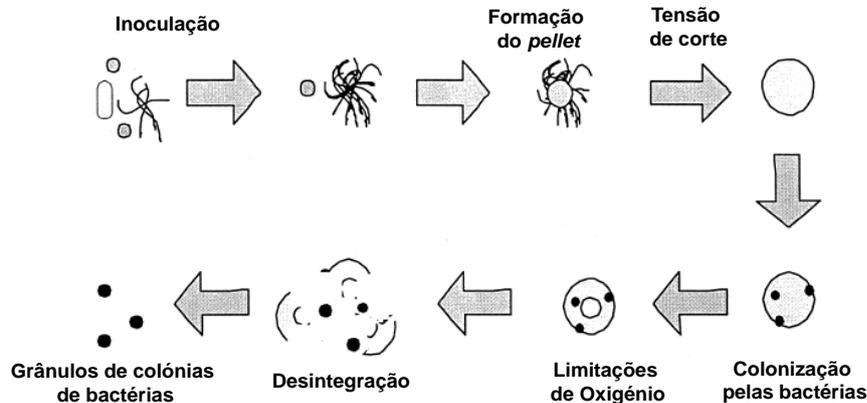


Figura 3.2 - Mecanismo proposto por Beun et al. (1999) para a granulação aeróbia a partir de biomassa dispersa após o arranque de um reator SBR com um tempo de sedimentação curto.

3.3.3 Funções biológicas

No que respeita às funções biológicas dos grânulos, fazendo uma análise crítica de várias publicações (de Kreuk e van Loosdrecht 2004, de Kreuk et al. 2005a, de Kreuk et al. 2007, Winkler et al. 2012), esquematizou-se na Figura 3.3 a distribuição espacial dos principais microrganismos presentes num grânulo aeróbio. A correspondente explicação para a remoção simultânea de carbono, azoto e fósforo em SBR operados com uma fase anaeróbia de enchimento, seguida de uma fase de reação aeróbia é apresentada de seguida.

Na fase de enchimento anaeróbia os microrganismos heterotróficos, incluindo as bactérias acumuladoras de fosfato (PAO) e as bactérias acumuladoras de glicogénio (GAO), convertem a quase totalidade do substrato orgânico facilmente biodegradável (acetato) em polímeros internos como o polihidroxibutirato (PHB), sendo que as PAO libertam o fósforo nesta fase.

Na fase aeróbia subsequente ocorrem simultaneamente várias reações biológicas no interior e exterior dos grânulos. Ocorre um crescimento lento das PAO e GAO à custa do PHB armazenado e as PAO armazenam o fosfato solúvel na forma de polifosfatos. Na camada exterior do grânulo (espessura <math><100\mu\text{m}</math>) ocorre a nitrificação pelas bactérias oxidantes de

amónio e oxidantes de nitrito (AOB e NOB, respetivamente) com a formação de nitrato. Este por sua vez é usado como aceitador de eletrões na zona anóxica (interior) dos grânulos e convertido em N_2 (desnitrificação).

Se houver fosfato suficiente no meio as PAO são dominantes, mas caso haja défice de fosfato no meio os grânulos serão dominados pelas GAO (de Kreuk e van Loosdrecht 2004). Este efeito pode ser utilizado para influenciar a competição microbiana com vista a desenvolver a população desejada (Winkler et al. 2011).

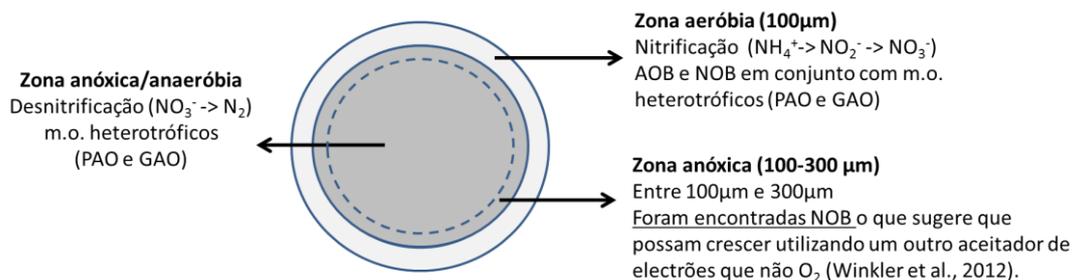


Figura 3.3 - Distribuição dos diferentes grupos de microrganismos (m.o.) num grânulo aeróbio cultivado em SBR com etapa de enchimento anaeróbia seguida de reação aeróbia.

Winkler et al. (2012) indicam ainda que a abundância relativa NOB/AOB é três vezes superior nos grânulos aeróbios do que em lamas ativadas e que isto pode significar que parte das NOB crescem não utilizando nitrito. O facto de se encontrarem NOB em zonas mais interiores do grânulo em que não existe oxigénio corrobora esta hipótese. No mesmo sentido observou-se num estudo em que o reator continha uma mistura de grânulos e flocos, que os grânulos continham a maioria de NOB enquanto as AOB eram mais abundantes nos flocos (Carvalho et al. 2006).

3.4 Fatores que influenciam a formação de grânulos aeróbios

Os conhecimentos anteriormente adquiridos sobre granulação anaeróbia e formação de biofilmes foram as bases iniciais para o estudo dos fatores que afetam a granulação aeróbia. Para a formação de grânulos anaeróbios, duas hipóteses principais são consideradas, nomeadamente, uma que defende que a formação de grânulos deriva das características especiais de agregação das bactérias metanogénicas, e outra que indica que a granulação é induzida pela configuração e regime de operação dos reatores anaeróbios (UASB) (Beun et al. 2000b). O modo de funcionamento de biorreatores do tipo UASB (Alphenaar et al. 1993) determina à partida uma pressão seletiva em favor de biomassa granular, devido ao seu

regime de fluxo ascendente e descarga pelo topo, com velocidade controlada, que conduz à remoção da biomassa não agregada. Como consequência dos estudos entretanto reportados, conducentes à obtenção de grânulos aeróbios a partir de diferentes inóculos e em variadas condições (ciclo totalmente aeróbio, ciclo misto anaeróbio/aeróbio, bactérias heterotróficas, bactérias nitrificantes), a segunda hipótese, associada ao regime hidrodinâmico, é a mais aceite.

No entanto, apesar de todos os estudos desenvolvidos na última década sobre granulação aeróbia, com um aumento exponencial do número de publicações (de Kreuk et al. 2007), os fatores determinantes para o crescimento dos grânulos ainda são pouco compreendidos (de Kreuk et al. 2007, Seviour et al. 2012). Aparentemente existe uma multiplicidade de fatores físico-químicos e biológicos que podem induzir a granulação aeróbia, e alguns deles aparentemente devem estar presentes em simultâneo para se obter um sistema granular estável.

Os fatores físicos-químicos referidos consistentemente na literatura como importantes na formação de grânulos aeróbios são uma configuração tubular do reator, tempo de sedimentação reduzido, a tensão de corte elevada (obtida por via do arejamento), tempo de retenção hidráulico reduzido, e valores controlados de oxigénio dissolvido e de temperatura. O tipo de substrato carbonáceo e os valores das cargas orgânica e dos nutrientes azoto e fósforo alimentados são também referidos como fatores determinantes na granulação aeróbia. Relativamente aos fatores biológicos mais referidos na literatura como sendo importantes na granulação aeróbia, estes são a formação de polímeros extra celulares (EPS), a hidrofobicidade celular, a imposição de períodos alternados de fartura e fome relativamente ao substrato, a seleção de organismos de crescimento lento, a acumulação de substrato no interior das células durante a fase anaeróbia do ciclo operativo em SBR, e aspetos de *quorum sensing*. Nos subcapítulos seguintes são examinados em mais pormenor os conhecimentos presentes sobre estes efeitos.

3.4.1 Configuração do biorreator

Os grânulos aeróbios apesar de terem sido pela primeira vez reportados num reator aeróbio de leito fluidizado operado em contínuo (Robinson et al. 2001), em estudos subsequentes foram praticamente sempre cultivados em sistemas SBR. A configuração dos SBR utilizados para a granulação aeróbia não é um assunto muito discutido, mas a larga maioria dos estudos foram realizados em SBR com uma razão altura/diâmetro (H/D) elevada, ou seja, em SBR de configuração tubular. Os reatores utilizados são normalmente SBR dos tipos *air lift* ou coluna de bolhas, em que o ar é introduzido pelo fundo do reator e é

responsável pela mistura do licor misto, não existindo um sistema adicional de agitação mecânica. Daí que na maioria dos estudos o ciclo inclui uma fase anaeróbia, ela seja obtida através de um etapa de enchimento lento pelo fundo do reator, durante a alimentação a água residual contacta com a biomassa sedimentada na ausência de arejamento.

Num dos primeiros estudos publicados (Morgenroth et al. 1997) o reator apresentava um valor da razão H/D de 5, reportando que se observou instabilidade nos grânulos formados. Posteriormente, investigadores também ligados ao grupo pioneiro da Universidade de Delft, utilizaram reatores com valores de H/D de 27, 14 e 16, sendo que este último correspondia a uma altura de 90 cm e diâmetro de 5,6 cm (Beun et al. 1999, de Kreuk e van Loosdrecht 2004, Bassin et al. 2012b). Da mesma forma foram usados reatores com valores de H/D de 30 (Tay et al. 2005) e de 20 (Liu et al. 2007). Liu et al. (2008) refere que um valor da razão H/D elevado assegura uma trajetória circular no movimento dos agregados de microrganismos que provoca um atrito hidráulico efetivo sobre eles. Esta configuração melhora também a transferência de oxigénio e permite uma seleção controlada da velocidade de sedimentação mínima da biomassa a reter. No entanto, este autor indica também que foi demonstrado que os grânulos aeróbios podem ser desenvolvidos em reatores SBR com vários valores da razão H/D, afirmando que a granulação não está diretamente relacionada com esta variável (Liu 2008).

Existe um número limitado de estudos em que a granulação aeróbia foi realizada em reatores com valores de H/D menores, especificamente, de 5,5, 3 e 2,7 (Figuerola et al. 2008; López-Palau et al. 2012; e Moussavi et al. 2010, respetivamente). Apesar dos estudos efetuados em reatores com valores de H/D baixos serem escassos, esta configuração é interessante porque se situa mais próximo daquela que poderá aplicar-se à escala real. Na ETAR municipal em Epe (Holanda) construída pela empresa Royal HaskoningDHV e que utiliza a tecnologia de grânulos aeróbios, os reatores foram implantados com um valor de H/D de 0,4, correspondendo a tanques de 9 m de altura e 25 m de diâmetro (Verdult 2011). Na patente da DHV (de Bruin et al. 2007) está prevista a remoção de flocos e grânulos com menor capacidade de sedimentação em dois momentos, designadamente, imediatamente após o término da fase de sedimentação e entre o fim da etapa de enchimento e o início da de arejamento. A remoção desta biomassa pouco densa é realizada através de um anel de recolha colocado a 50-98% da altura do reator (coincidente com o limite superior do manto de biomassa sedimentada).

Aparentemente a razão H/D elevada é uma característica importante para a granulação, quando a configuração tubular é utilizada para facilitar o controlo do fluxo seletivo que remove os flocos ou grânulos com menor velocidade de sedimentação. No entanto, parece

ser possível usar configurações não tubulares se for utilizado um processo alternativo para remover esta biomassa e favorecer a granulação.

3.4.2 Tempo de sedimentação

Um tempo de sedimentação reduzido, após o qual se procede a uma descarga rápida do sobrenadante no fim do ciclo reacional, é descrito por vários autores como sendo indispensável para a indução da granulação aeróbia (Morgenroth et al. 1997, Heijnen e van Loosdrecht 1998, Beun et al. 1999, Tay et al. 2001a, Liu e Fang 2003, Liu e Tay 2004, de Kreuk et al. 2007). Na patente de 1998 de Heijnen e van Loosdrecht, descreve-se a forma de obter grânulos aeróbios num SBR tubular e o tempo de sedimentação é indicado como devendo ser suficientemente curto para que apenas a biomassa com uma velocidade de sedimentação igual ou superior a 10 m/h ou preferencialmente 15 m/h seja retida no reator. A restante biomassa é descarregada com o efluente tratado, sendo a permanência dos grânulos no reator fortemente favorecida face à dos flocos. Tempos de sedimentação de 5 minutos num reator SBR são reportados como necessários para que os grânulos se tornem dominantes, ou seja, a formação de grânulos e as suas características podem ser controladas por este fator de pressão seletiva (Liu e Tay 2004).

Beun et al. (1999) referem que os grânulos têm uma maior velocidade de sedimentação devido à sua densidade superior, mas há indicações que a densidade dos grânulos é próxima da dos flocos, não justificando por si só uma sedimentação mais rápida (Etterer e Wilderer 2001). Etterer e Wilderer (2001) relacionam diretamente uma maior dimensão do grânulo com uma maior velocidade de sedimentação. Inclusivamente, referem também que a densidade dos grânulos tende a decrescer com o aumento da sua dimensão.

3.4.3 Tensão de corte (*Shear stress*)

A tensão de corte sofrida pela biomassa em reatores SBR tem duas componentes, uma resultante do atrito provocado pelo movimento da massa líquida ou gasosa e outra do contacto direto entre agregados de biomassa. Este parâmetro é decisivo na formação de biofilmes, sendo que quanto mais elevada for a tensão de corte melhor será a qualidade do biofilme obtido, especificamente, mais fino, denso e com uma superfície mais lisa (van Loosdrecht et al. 1995, Kwok et al. 1998). Também a granulação anaeróbia é favorecida por elevados valores de tensão de corte hidrodinâmica e observou-se a ausência de granulação para valores baixos deste parâmetro (Alphenaar et al. 1993, Alves et al. 2000). Da mesma

forma, uma tensão de corte elevada é indicada como favorecendo a formação de grânulos aeróbios (Heijnen e van Loosdrecht 1998, Tay et al. 2001b, Liu e Tay 2004, de Kreuk et al. 2007, Lopez et al. 2012), tendo sido reportado que, se os microrganismos forem sujeitos a tensões de corte elevadas o resultado é uma granulação mais rápida e os grânulos obtidos são mais robustos (Heijnen e van Loosdrecht 1998). Tay et al. (2001b) reportam que num reator SBR tubular operado a diferentes valores de velocidade ascendente superficial do gás (o caudal de arejamento é o fator mais importante para o controlo dos níveis de turbulência hidrodinâmica e de tensão de corte) se observaram apenas flocos biológicos para valores de 0,3 cm/s, enquanto se observou uma boa granulação aeróbia para a operação a valores mais elevados, entre 2,6 e 3,6 cm/s (Tay et al. 2001b). Beun et al. (1999) reportam também que, num SBR tubular, valores de 1,4 e 2,0 cm/s de velocidade de gás não levaram à formação de grânulos estáveis, mas que a um valor mais elevado, 4,1 cm/s, se obtiveram grânulos de superfície lisa, densos e estáveis.

3.4.4 Tempo de retenção hidráulico

Um valor de tempo de retenção hidráulico (HRT) baixo é benéfico para a formação de grânulos aeróbios (Morgenroth et al. 1997, Beun et al. 1999, Liu e Tay 2004). Num SBR este valor é determinado pela duração do ciclo e pelo valor da *renovação de volume por ciclo*, podendo este fator ser visto como a maior ou menor taxa de remoção de flocos do reator (Liu 2008). Foi reportado que uma diminuição de HRT de 8 para 6 h por aumento do valor de *volumetric exchange ratio* de 35% para 45% melhorou a robustez dos grânulos e a sua dimensão (Morgenroth et al. 1997). Da mesma forma Beun (1999) observou que uma diminuição da HRT de 8 para 6,75 h em conjunto com um aumento da velocidade superficial do gás melhorou a granulação. Em ensaios de granulação com bactérias nitrificantes, foram obtidos grânulos excelentes em SBR com ciclos de 6 e 12 h, mas com um ciclo longo de 24 h e com um ciclo demasiado curto de 3 h não se observou granulação. No primeiro caso foi devido a uma pressão seletiva hidráulica demasiado baixa, e no segundo devido ao *washout* da biomassa inoculada (Tay et al. 2002b). Também num estudo realizado por outros autores (Pan et al. 2004), com cinco reatores SBR tubulares inoculados com grânulos aeróbios e operados com tempos de ciclo de 1, 2, 6, 12 e 24 h, se verificou que para o ciclo mais curto de 1 h ocorria *washout* da biomassa enquanto para o mais longo se obtinha uma mistura de flocos e grânulos. Para os ciclos de 2, 6 e 12 h obteve-se uma boa granulação (Pan et al. 2004).

3.4.5 Oxigénio dissolvido e temperatura

Experiências reportadas mostram que podem formar-se grânulos aeróbios sob uma gama larga de concentrações de oxigénio dissolvido, desde valores baixos de 0,7 a 1,0 mg O₂/L, até valores relativamente elevados de 2 a 6 mg O₂/L (Liu 2008). Num estudo realizado em SBR tubular, com uma fase de enchimento anaeróbio longa, foram testados vários níveis de oxigénio dissolvido na fase aeróbia, correspondentes a 9,1, 3,6 e 1,8 mg O₂/L e constatou-se que não tiveram influência significativa na formação dos grânulos (de Kreuk e van Loosdrecht 2004). A concentração de oxigénio mais baixa foi testada para promover a nitrificação e desnitrificação simultâneas durante a fase aeróbia e testar a possibilidade de redução dos custos operacionais. É de realçar, no entanto, que os teores baixos de oxigénio dissolvido impostos neste último estudo não correspondem diretamente a valores mais baixos de tensão de corte, pois o caudal de gás introduzido foi mantido constante através de misturas de oxigénio e azoto em diferentes proporções. É ainda importante referir que um estudo envolvendo o mesmo grupo de investigação, mas em que o ciclo não incluiu fase anaeróbia (ciclo totalmente aeróbio) obteve resultados diferentes, sendo que a diminuição da concentração de oxigénio dissolvido para 3,6 mg O₂/L, apesar de incrementar a desnitrificação (que ocorreu no interior do grânulo) influenciou negativamente a estabilidade dos grânulos (Mosquera-Corral et al. 2005).

A concentração de oxigénio dissolvido parece assim não ser um fator decisivo para a granulação em reatores com fase anaeróbia, devendo o seu valor ser escolhido em função dos processos bioquímicos que se pretende que ocorram.

Os estudos de granulação aeróbia a temperaturas diferentes da ambiente (20-25°C) são escassos, mas indicam que o seu efeito é determinante para o processo. Verificou-se que num reator que arrancou a baixa temperatura (8°C) os grânulos formados se apresentavam com morfologia irregular, ocorrendo um efeito pronunciado de *washout* da biomassa de que resultou um desempenho instável do reator (de Kreuk et al. 2005c). No entanto, quando o arranque do reator foi efetuado a uma temperatura de 20°C e, após ocorrer a granulação, esta foi reduzida para 15°C e depois para 8°C, a estabilidade dos grânulos não foi afetada (de Kreuk et al. 2005c).

Em estudos realizados num SBR tubular operado a uma temperatura mais elevada, de 30°C, verificou-se que a sua eficiência relativamente à remoção de fósforo era pior que a do reator controlo operado a 20°C, o que foi atribuído ao desenvolvimento de uma população com uma fração menor de bactérias acumuladoras de fósforo (PAO) *versus* a fração de bactérias acumuladoras de glicogénio (GAO) (Bassin et al. 2012a). Estas últimas (GAO) não contribuem para a remoção de fósforo (Oehmen et al. 2006).

3.4.6 Tipo de substrato e carga orgânica alimentada

Liu (2008) indica que a granulação aeróbia é insensível ao tipo de substrato, mas que este tem uma influencia decisiva nas características dos grânulos formados. Também indica que se pode obter granulação aeróbia com uma larga gama de concentrações de substrato carbonáceo e de valores da razão azoto/COD na alimentação, o que permite que esta tecnologia seja aplicada tanto a águas residuais urbanas como a águas residuais industriais com elevadas cargas orgânicas e contendo substâncias tóxicas (Liu 2008). Verificou-se num estudo (Tay et al. 2001a) que os grânulos aeróbios obtidos com acetato ou glucose como fontes de carbono eram regulares e redondos, mas nos obtidos com este último substrato observavam-se bactérias filamentosas. Os grânulos obtidos com acetato apresentavam uma superfície lisa, morfologia compacta e uma menor dimensão (1,1 mm face a 2,4 mm para os obtidos com glucose). Até à data foram reportadas diversas fontes de carbono em ensaios de granulação aeróbia: etanol por Beun et al. (1999), que referem que uma carga orgânica elevada levou ao aparecimento de bactérias filamentosas; sacarose por Zheng et al. (2006) que indicam que os grânulos obtidos a uma carga orgânica elevada de 6.0 kgCOD/(m³.d) não eram estáveis e evoluíram para grânulos contendo bactérias filamentosas; amido solúvel e um derivado de amido hidrolisado (Karahan et al. 2008, Mata et al. 2012); e alguns compostos químicos industriais fornecidos como único substrato carbonáceo, como fenol, cloroanilinas e éter etil-ter-butílico (Adav et al. 2009). Também foram reportados ensaios de granulação com efluentes reais: água residual doméstica por de Kreuk e van Loosdrecht (2006); águas residuais de suinicultura (M. Figueroa et al. 2011) e águas residuais de indústrias de lacticínios, conserva de peixe, vinícola, óleo de palma e borracha (Schwarzenbeck et al. 2005, Figueroa et al. 2008, Gobi et al. 2011, López-Palau et al. 2012, Rosman et al. 2013).

Relativamente à carga orgânica alimentada, esta influencia negativamente a granulação no caso de ser demasiado baixa ou elevada. Para um sistema de tratamento por grânulos aeróbios de uma água residual doméstica, que apresenta usualmente uma concentração relativamente baixa de COD ($\approx 400 \text{ mgO}_2/\text{L}$) é indicado por alguns investigadores (de Kreuk e van Loosdrecht 2006, Van Loosdrecht e de Kreuk 2006) que se deve fornecer uma carga de nutrientes o mais elevada possível no período de enchimento anaeróbio, e que por isso deve ser evitada a diluição (mistura) com a água tratada que sai do reator. Se a concentração de substrato orgânico se mantiver baixa por mais de 10 ciclos consecutivos, deve adicionar-se um suplemento de fonte de carbono. Relativamente a cargas orgânicas elevadas, Liu (2008) indica que um valor demasiado alto (COD de 3000 mgO₂/L, correspondente a uma carga de 9 kgCOD/(m³.d)) conduziu a grânulos de maiores dimensões mas com uma superfície mais irregular e heterogénea, como observado anteriormente em biofilmes (van Loosdrecht et al. 1995). Nesta condições a desintegração

do grânulo ocorre com mais facilidade, de forma similar ao verificado para grânulos anaeróbios desenvolvidos a elevadas cargas orgânicas (Quarmby e Forster 1995).

3.4.7 Formação de polímeros extra celulares (EPS)

O material polimérico extracelular (EPS) excretado pela biomassa é uma matriz complexa de polímeros que inclui polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos e ácidos húmicos, que ajuda à formação de uma rede gelatinosa que mantém as bactérias em estreita proximidade dentro de biofilmes (Wingender et al. 1999). O mesmo tipo de material participa na agregação das bactérias em flocos de lamas ativadas (Liu e Fang 2003). Da mesma forma, nos grânulos aeróbios, as células microbianas ativas estão fixas numa rede de substâncias poliméricas extra celulares (Liu e Tay 2004).

O EPS tem como funções, para além do fenómeno de adesão, formar uma camada protetora das células, que as resguarda de agressões ambientais tais como a presença de biocidas no meio ou mudanças bruscas de pH. Por outro lado, estes materiais poliméricos promovem a adsorção de nutrientes e moléculas orgânicas exógenas (Liu e Fang 2003). O EPS serve também como fonte de carbono e energia durante períodos de escassez e por isso confere uma estabilidade de longa duração aos grânulos aeróbios (Wang et al. 2008).

McSwain et al. (2005) indicam que em observações ao microscópio é claramente visível que os grânulos contêm mais EPS que os flocos, mas dos dois métodos de extração utilizados pelos autores apenas um evidenciou uma maior abundância de EPS nos grânulos. Tomando valores médios dos dados apresentados por Adav e Lee (2008) relativamente aos quatro constituintes mais significativos do EPS (proteínas, hidratos de carbono, substâncias húmicas e lípidos), estimam-se teores de cerca de 180 e 600 mg de EPS por grama de sólidos suspensos voláteis (VSS) para flocos e grânulos aeróbios, respetivamente. Ou seja, pode concluir-se que os grânulos são maioritariamente constituídos por EPS.

Tay et al. (2001c) reportaram que o EPS dos grânulos tinha um teor muito maior de polissacarídeos (2 a 3 vezes) do que de proteínas e que o teor daqueles aumentava com o aumento da velocidade superficial ascendente do ar no biorreator. Pelo contrário, McSwain et al. (2005) e Adav et al. (2007, 2008) reportam que no EPS granular as proteínas são dominantes relativamente aos polissacarídeos. Uma das razões para estes resultados contraditórios pode prender-se com insuficiências dos diferentes métodos de extração de EPS utilizados, que geram uma grande variabilidade de resultados para a mesma amostra (Liu e Fang 2003, Lin et al. 2010).

Ainda analisando os dados de Adav e Lee (2008) obtém-se um valor médio da razão mássica proteína/polissacarídeos no EPS de 40/50 (ambos em mg/gVSS) para os flocos e de 380/80 (ambos em mg/gVSS) para os grânulos aeróbios. Lin et al. (2010) obtiveram um teor de 160 mg/gVSS de polissacarídeos do tipo alginato (ALE, *Alginate-Like Exopolymers*) no EPS de grânulos aeróbios (não foram quantificadas proteínas) e indicam que os flocos continham cerca de metade deste valor, 72 mg/gVSS de ALE (Lin et al. 2013).

Wang et al. (2005) indicam que o EPS tem um papel essencial na manutenção e estabilidade dos grânulos aeróbios, e nos seus estudos verificaram que estes exibem uma camada exterior mais densa composta por um tipo menos solúvel e menos biodegradável de EPS, enquanto que na camada interior do grânulo a densidade da biomassa é menor e o EPS encontrado é mais solúvel e mais biodegradável. A camada exterior apresentava também uma hidrofobicidade mais elevada que a camada interior.

Estudos recentes, em que se realizaram ensaios reológicos, afirmam que os grânulos aeróbios podem ser considerados hidrogéis (Seviour et al. 2009a) distinguindo-se dos flocos por o seu EPS granular conter um agente gelificante composto por polissacarídeos ou por glicosídeos (Seviour et al. 2009b). Apesar de haver acordo em que a característica de hidrogel dos grânulos vem dos exopolissacarídeos, há uma divergência na identificação dos tipos específicos destes por dois grupos de investigação independentes (Seviour et al. 2012). Um dos grupos, da Universidade de Delft, indica que os polissacarídeos são do tipo alginato, uma substância muito disseminada na natureza e que parece ajudar a manter a estabilidade e integridade dos grânulos (Lin et al. 2010). O outro grupo, da Universidade de Queensland, indica que se trata dum novo tipo de exopolissacarídeo, desconhecido até à data e que foi denominado *Granulan* (Seviour et al. 2011).

Lin et al. (2013) isolaram os polissacarídeos do tipo alginato (ALE) presentes no EPS de grânulos aeróbios e de flocos e verificaram que a sua estrutura química era diferente, conferindo aos ALE provenientes dos grânulos uma capacidade de gelificação perfeita e uma dureza seis vezes superior à do gel obtido com os ALE presentes nos flocos.

3.4.8 Hidrofobicidade celular

A hidrofobicidade tem sido descrita como um fator importante na constituição dos grânulos aeróbios mas é normalmente referida como consequência da formação de EPS (McSwain et al. 2005, Lin et al. 2010).

Alguns autores referem que a hidrofobicidade celular pode contribuir para a capacidade de agregação das células (Del Re et al. 2000, Kos et al. 2003) e Liu et al. (2004) indicam que a hidrofobicidade é um pré-requisito para despoletar o processo de biogranulação aeróbia. Tay et al. (2002a) determinaram um grau de hidrofobicidade de 39% nos flocos iniciais (inóculo) e de cerca de 70% em grânulos aeróbios desenvolvidos, cultivados em glucose e acetato. Liu et al. (2003) estudaram o efeito do aumento da tensão de corte e pressão hidráulica em grânulos aeróbios heterotróficos e nitrificantes e verificaram que a hidrofobicidade aumentou nos dois tipos de grânulos. Por outro lado não houve alteração da hidrofobicidade dos grânulos aeróbios com o aumento da carga orgânica alimentada. Estes investigadores consideram que a hidrofobicidade é uma resposta das células a condições de *stress*, o que por sua vez leva a uma agregação mais efetiva e robusta das mesmas.

Da análise crítica à literatura consultada parece consensual que a formação de EPS e a hidrofobicidade dos grânulos aeróbios estão intrinsecamente ligadas e que recentemente a maioria dos investigadores tem-se focado mais nos estudos relativos ao EPS e sua composição.

3.4.9 Fase aeróbia de fome (ausência de substrato)

A maioria dos investigadores considera necessária a existência de um regime de alternância entre fartura e fome para a obtenção de uma granulação aeróbia estável, independentemente do ciclo ser totalmente aeróbio ou incluir uma fase anaeróbia inicial (Morgenroth et al. 1997, Beun et al. 2000a, Beun et al. 2001, Tay et al. 2001a, de Kreuk e van Loosdrecht 2004, McSwain et al. 2004, de Kreuk et al. 2005c). Este regime é obtido pela alimentação ao reator de forma descontínua por pulsos, típica do funcionamento dos SBR, que gera uma fase inicial de fartura e posteriormente uma fase de fome (esgotamento de substrato do meio) na parte final do ciclo.

McSwain et al. (2004) estudaram o efeito da utilização de uma etapa de enchimento lento em aerobiose e verificaram que esta forma de minimização do regime de fartura/fome levava à obtenção de grânulos pouco estáveis com abundância de bactérias filamentosas, enquanto que o enchimento rápido, intensificando a fase de fartura, produzia grânulos robustos e estáveis. Igual resposta do sistema granular em aerobiose foi obtida por Beun et al. (2002) com a minimização do regime de fartura/fome por diminuição do teor de oxigénio dissolvido (este estudo é detalhado no subcapítulo seguinte).

No entanto as explicações para a importância destas fases alternadas podem diferir. Para os investigadores Kreuk e van Loosdrecht (2004), estas fases são importantes para que se

dê a acumulação de substrato, na forma de polímeros internos, durante a fase de fartura, e um crescimento lento à custa destes últimos na fase de fome (mais pormenores são abordados no subcapítulo seguinte). Mas Tay et al. (2001a) indicam que a importância da fase de fome se deve ao facto das bactérias se tornarem mais hidrofóbicas nestas condições, o que facilita a sua adesão e promove a formação de grânulos densos e robustos. Estes últimos autores consideram que os microrganismos têm capacidade de alterar as características da sua superfície celular em períodos de fome, e que a agregação é provavelmente uma estratégia de sobrevivência adotada nestas condições adversas (Liu e Tay 2004).

Foi ainda publicado um estudo em que Liu et al. (2007) indicam que a condição de fome não é um pré-requisito para a granulação aeróbia, pois num reator em que ocorreu uma perda de biomassa severa no arranque, devido ao curto tempo de sedimentação imposto (2 min), que levou à manutenção de um teor de COD elevado durante um período duma semana (ausência de período de fome), ocorreu igualmente agregação da biomassa e consequente formação de grânulos (apesar de se observar instabilidade no reator nas semanas subsequentes). No entanto, os autores indicam, em estudos posteriores, que um período de fome mais prolongado tem um efeito positivo na formação dos grânulos (Liu et al. 2007, Liu e Tay 2008).

López-Palau et al. (2012) referem que para um tratamento otimizado de efluentes da indústria vinícola por grânulos aeróbios deveria ser proporcionado um período de fome duas vezes mais prolongado do que o período de abundância (67% do período de arejamento). O sistema utilizado tinha apenas fase aeróbia.

Em resumo, independentemente das explicações avançadas por diferentes autores, existe um consenso de que a imposição de regimes de fartura/fome é benéfica para a formação dos grânulos aeróbios.

3.4.10 Seleção de organismos de crescimento lento com acumulação anaeróbia de substrato no interior das células

Estudos da década de 1990 indicaram que uma das condições que levava à obtenção de um biofilme estável era uma baixa taxa de crescimento dos microrganismos (van Loosdrecht et al. 1995). Daí que de Kreuk e van Loosdrecht (2004) aplicassem este conhecimento para tentar formar grânulos estáveis sob uma concentração de oxigénio baixa, com vista a melhorar o processo de nitrificação/desnitrificação e simultaneamente reduzir os custos de arejamento.

As situações de alternância fartura/fome relativamente ao substrato carbonáceo são comuns em sistemas de lamas ativadas e foi demonstrado que a resposta dos microrganismos é a produção de polímeros e sua acumulação no interior das células na fase de fartura, na forma de polihidroxicanoatos (PHA) ou glicogénio, que podem ser utilizados subsequentemente para o crescimento (Carta et al. 2001). Quando o substrato é a glucose ou amido hidrolisado (mono e oligossacarídeos) o polímero acumulado é respetivamente glicogénio ou um polímero do mesmo tipo denominado poli-glucose (van Loosdrecht et al. 1997, Karahan et al. 2008). Na presença de acetato, o polímero acumulado é maioritariamente polihidroxibutirato (PHB) (Carta et al. 2001) que se forma diretamente do metabolito central Acetil-CoA (van Loosdrecht et al. 1997). O desempenho de um sistema de lamas ativadas depende do envolvimento destes polímeros (Majone et al. 1996, van Loosdrecht et al. 1997). Os microrganismos heterotróficos têm velocidades de crescimento lentas quando o fazem à custa destes polímeros, ao contrário das velocidades de crescimento altas quando utilizam substratos facilmente biodegradáveis como o acetato e a glucose (de Kreuk e van Loosdrecht 2004).

Beun et al. (2002) estudou a resposta dos microrganismos num SBR totalmente aeróbio alimentado ciclicamente em pulso inicial único e verificou que a concentração de acetato diminuía rapidamente (fase de abundância de cerca de 10 min) e que era acumulado na forma de PHB, até um máximo de 40% do peso inicial das células, e depois consumido linearmente durante a restante fase aeróbia (fase de fome \approx 200 min). Ao ser reduzida a concentração de oxigénio foi induzido um aumento da fase de abundância (presença prolongada de acetato), uma taxa de crescimento mais elevada e a um gradiente acentuado do oxigénio ao longo da espessura do grânulo. O resultado foi uma notória instabilidade nos grânulos e o crescimento de bactérias filamentosas (Beun et al. 2002, de Kreuk e van Loosdrecht 2004).

Assim, para melhorar a granulação a baixas concentrações de oxigénio, foi utilizado um regime de enchimento anaeróbio (fase de abundância) seguido de um período de reação aeróbio (fome), que levou à seleção de organismos de crescimento lento como as bactérias acumuladoras de fósforo (PAO) e as bactérias acumuladoras de glicogénio (GAO). Estas bactérias convertem a quase totalidade do acetato em PHB ou glicogénio durante a fase anaeróbia. Na fase aeróbia, têm um crescimento lento à custa do PHB ou glicogénio acumulados e ocorre a nitrificação com a formação de nitratos que por sua vez são usados como aceitadores de eletrões na parte interna dos grânulos e convertidos em azoto. A desnitrificação é favorecida pelo facto de na fase aeróbia ser mantida uma concentração de oxigénio mais baixa que o habitual (cerca de 1,8 mg O₂/L). O fósforo também é removido pelas PAO acumulando-se internamente na forma de polifosfatos. Obtém-se assim a

remoção simultânea de carbono orgânico, azoto e fósforo (de Kreuk e van Loosdrecht 2004).

Na patente de 2006 de van Loosdrecht e de Kreuk em que é proposto este sistema de tratamento de águas residuais por grânulos aeróbios com remoção de azoto e fósforo, os investigadores indicam que para obter bons grânulos, com velocidades de sedimentação elevadas, é determinante que a carga orgânica seja maioritariamente removida na fase anaeróbia, no mínimo 50% remoção e de preferência 90%.

3.4.11 Quorum-sensing

Apesar de terem já sido descritos mecanismos e fatores que determinam a granulação aeróbia, eles não fornecem o quadro completo do processo de granulação (Liu e Tay 2004). Por exemplo, um dos fatores importantes para a granulação é uma tensão de corte elevada, contudo os grânulos não são estáveis em reatores fortemente arejados que sejam operados com tempos de sedimentação elevado (McSwain et al. 2005). A comunicação intercelular e coordenação multicelular são conhecidas por contribuírem para a organização das bactérias em estruturas espaciais, e o *quorum-sensing* (QS) é um dos exemplos do comportamento social das bactérias, em que a troca de sinais entre elas lhes permite adotar a melhor via de interação com o ambiente em seu redor (Liu e Tay 2004).

Ren et al. (2010) indicam que aparentemente há produção de substâncias químicas de QS pelos grânulos aeróbios. Daí que quando os grânulos são usados como fonte sinalizadora para o desenvolvimento de biomassa, o crescimento da nova biomassa é essencialmente na forma agregada e é dez vezes mais rápido do que quando são utilizados os flocos. É argumentado que a expressão e produção das substâncias QS e seus percursores pelos grânulos induzem a expressão genética das novas bactérias para o crescimento em agregado, em lugar do crescimento em suspensão. O *Autoinducer-2* (AI-2) é uma molécula universal que modula a comunicação entre espécies durante a formação dos biofilmes (Xiong e Liu 2010). Recentemente realizaram-se vários estudos em que se verificou que o ATP e o AI-2 estavam também envolvidos na granulação aeróbia (Xiong e Liu 2010, Sheng-Hua et al. 2011, Jiang e Liu 2012).

3.5 Tratamento de águas residuais industriais com grânulos aeróbios

A tecnologia dos grânulos aeróbios foi desenvolvida inicialmente para a remoção de carga orgânica carbonácea de águas residuais (Morgenroth et al. 1997, Heijnen e van Loosdrecht 1998, Beun et al. 1999). Posteriormente foi adaptada para o tratamento de águas residuais urbanas permitindo que se dê a remoção biológica de carbono, azoto e fósforo num tanque único (de Kreuk et al. 2005a, de Kreuk e van Loosdrecht 2006, Van Loosdrecht e de Kreuk 2006)

Esta tecnologia é também vista com grande potencial para o tratamento de águas residuais industriais devido às suas características excecionais já referidas. Particularmente atraentes são a robustez dos grânulos face a compostos tóxicos e cargas elevadas e a sua capacidade de resistir sem alimentação durante longos períodos e recuperar rapidamente a sua atividade. Este último aspeto é importante para as indústrias que têm períodos de paragem do processo na altura de férias ou de manutenção das instalações. É claro há a considerar as vantagens económicas por ser operada numa instalação compacta e com menores gastos energéticos face à tecnologia de lamas ativadas convencional.

Existe assim um elevado número de investigadores atualmente a estudar a aplicação desta nova tecnologia ao tratamento de águas residuais industriais e já há pelo menos duas estações de tratamento de efluentes da indústria alimentar em funcionamento com a tecnologia *Nereda*[®]. Uma trata efluentes de uma fábrica de cerveja com um reator tubular de 75 L e outra trata efluentes duma indústria alimentar com um tanque de equalização de 150 m³ e um reator de 250 m³ não tubular (Lopez et al. 2012).

Em seguida apresentam-se alguns estudos laboratoriais sobre tratamento de efluentes industriais com sistemas de granulação aeróbia encontrados na literatura.

Foram estudados tratamentos de efluentes duma indústria de peixe com elevada salinidade (Figuerola et al. 2008), duma indústria de lacticínios (Schwarzenbeck et al. 2005) e de uma indústria vinícola (López-Palau et al. 2012). Deste grupo, o caso em que a granulação levou mais tempo a ocorrer e estabilizar foi o do tratamento do efluente da indústria de peixe com elevada salinidade. A concentração e carga de COD alimentadas está dentro da gama dos outros estudos, pelo que é possível que a salinidade tenha sido a responsável pela dificuldade de granulação, afetando também a eficiência de remoção de azoto (até 40%). No global obtiveram-se bons níveis de remoção de COD e de azoto (70-80%). A eficiência de remoção de fósforo só foi reportada para o tratamento do efluente da indústria de lacticínios sendo de 70%.

Um reator de grânulos aeróbios foi também testado no tratamento de efluentes de suinicultura (M. Figueroa et al. 2011). Para tratar eficientemente este efluente real sem diluição prévia, foi necessário baixar o valor da renovação de volume por ciclo de 50 para 6%, de forma a aumentar o valor de HRT de 6 para 45 h.

No tratamento de efluentes da indústria de óleos de palma com grânulos aeróbios (Gobi et al. 2011), foi utilizada, como no caso anterior, um valor da renovação de volume por ciclo menor que o usual, de 25%, correspondendo a um valor de HRT de 24 h.

Foi também reportado o tratamento de efluentes da indústria da borracha com grânulos aeróbios (Rosman et al. 2013), obtendo-se uma remoção de COD e de azoto de 97 e 89% respetivamente.

No domínio das águas residuais da indústria química, foram reportados tratamentos de efluentes contendo fenol (Tay et al. 2005), fenol e elevada salinidade (Moussavi et al. 2010), 2,4-diclorofenol (Wang et al. 2007a), fluorofenol (Duque et al. 2011), anilina e cloroanilinas (Zhu et al. 2012), metil ter-butiléter (MTBE) (Zhang et al. 2008) e compostos tóxicos (Liu et al. 2011). O fenol foi degradado como único substrato carbonáceo mas a metabolização dos compostos orgânicos halogenados requereram sempre a presença dum substrato biodegradável. A degradação do fluorofenol só foi conseguida após a suplementação da biomassa com um microrganismo especializado na degradação deste composto (*Rhodococcus sp. strain FP1*). No geral os níveis de remoção destes compostos foram muito bons, perto de 90%. É de notar que a dimensão reportada para os grânulos obtidos situa-se à volta de 1 mm, apesar de muitos dos estudos terem sido realizados em reatores tubulares onde se obtêm usualmente grânulos de maiores dimensões. A presença dos compostos químicos provavelmente influenciou negativamente a formação dos grânulos.

Foram também já publicados alguns estudos utilizando grânulos aeróbios para tratamento de efluentes da indústria têxtil (Muda et al. 2010, Kolekar et al. 2012, Lotito et al. 2012b, Mata et al. 2015). Este tópico é desenvolvido no próximo subcapítulo.

Da análise dos resultados obtidos nesta pesquisa bibliográfica nota-se que há dois estudos que referem que foram necessários 140 e 168 dias para se obter grânulos robustos e estáveis (efluente de indústria vinícola e efluente com MTBE) e que dos 18 trabalhos acima referidos apenas 5 utilizaram ciclos reacionais com fase anaeróbia e apenas 3 grupos de investigação utilizaram reatores com valores da razão H/D menores que 5. Também se verifica que apesar de um valor baixo de HRT ser um fator tido como importante para a granulação, há estudos em que este foi bastante elevado, de 24 e 34 h (óleo de palma, efluente com MTBE, efluente com fenol e salinidade).

Na Tabela 3.1 e Tabela 3.2 são apresentados, para o tratamento dos efluentes acima referidos, as características dos reatores SBR utilizados, a duração e configuração dos ciclos, o tipo de substrato e sua carga e/ou concentração, as dimensões e características de sedimentabilidade dos grânulos obtidos e as eficiências de remoção de COD, azoto e fósforo nos casos aplicáveis. Dos estudos que envolviam diferentes condições experimentais relativamente à duração do ciclo e cargas aplicadas é apresentada apenas a situação que foi considerada mais eficiente (grânulos estáveis, e remoção de maiores cargas em ciclos mais curtos). Foram também incluídos na Tabela 3.1 alguns dos estudos iniciais referidos no início deste subcapítulo (Beun et al. 1999, de Kreuk et al. 2005a, de Kreuk e van Loosdrecht 2006), bem como o estudo da autora da presente dissertação (apresentado no capítulo 5 deste documento) relativamente à remoção de um derivado de amido na forma hidrolisada (Mata et al. 2012). Da mesma forma na Tabela 3.2 incluiu-se um estudo da autora (apresentado no Capítulo 6 deste documento) relativamente ao tratamento de um efluente têxtil simulado por grânulos aeróbios (Mata et al. 2015).

Tabela 3.1 - Resumo de dados publicados sobre estudos de tratamento de diversos efluentes com grânulos aeróbios.

Referência e Substrato Orgânico	Beun et al. (1999) Etanol	de Kreuk et al. (2005a) Acetato	de Kreuk e van Loosdrecht (2006) Água Resid. Urbana	Mata et al. (2012)* Emissões E1, derivado de Amido Hidrol.	Schwarzenbeck et al. (2005) Ind. Lactínicos	Figuerola et al. (2008), Ind. Conserva Peixe 30g/L NaCl	M. Figuerola et al. (2011) Eflue. Suiniculturas	López-Palau et al. (2012) Ind. Vinícola	(Gobi et al. 2011) Indústria Óleo de Palma	Rosman et al. (2013) Indústria da Borracha	Tay et al. (2005) Fenol	Moussavi et al. (2010), Fenol + NaCl 50g/L	Wang et al. (2007a) Glucose	2,4-diclorofenol (Duque et al. 2011) 2-Fluorfenol	(Zhu et al. 2012) Anilina, 4-Cloroanilina	Zhang et al. (2008) Etil ter-butil éter	Liu et al. (2011) Comp. Tóxicos Pesticidas, etc.
Duração do ciclo	3h	3h	3h	6h	8h	3h	3h	4h	6h	3h	4h	17h	4h	4h	12h	12h	6h
Enchimento (min)	1	60	60	15	60	<1	3	5	10	5	4	1h	4	60	20	5	10
Fase anaeróbia (min)	não	=Ench.	=Ench.	não	+60, +0	não	não	não	não	não	não	=Ench	30	=Ench	---	não	não
Fase arejada (min)	177	112	112	300	≈ 380	171	171	229	340	155	229	15,5h	200	172	870	≈12h	340
Sedimentação (min)	2	3	3	3	5	1	1	1	0,5	15	3	5	1-11	3	5	5	1
Descarga (min)	1	5	5	1	--	5	5	5	9,5	3	4	10	5	5	---	5	5
Volume SBR	2,5 L	3 L	3 L	1,5 L	12 L	1,5 L	1,5 L	3 L	5 L	0,6 L	2,4 L	4 L	12 L	2,5 L	5 L	4 L	7,4 L
HRT	6,75h	5,6h	5,6h	12h	16h**	6h*	6 -> 45	8h**	24h**	6h**	8h	34h**	8h	10,5h	17,2	24h**	12h**
Renovação de volume por ciclo	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50->6%	50%	25%	50%	50%	50%	50%	40%	70%	50%	50%
H/D	27	14	14	2,5	5,3	5,5	5,5	3	6,7	7	30	2,7	12,5	17	9,3	tubular	10
H (Altura em cm)	150	90	90	25	76	---	---	---	---	35	150	40	100	110	74	---	100
D (Larg. em cm)	5,6	6,25	6,25	10	14,2	---	---	---	---	5	5	15	8	6,5	8	---	10
Caudal de ar (L/min)	4,1cm/s	4	4	3	---	---	3,5	1,5cm/s	5	1,7cm/s	---	---	2,8 cm/s	4	2,4cm/s	≈ 0,15	8,3
Tipo de efluente	Sintét.	Sintét.	Urbano	Sintét.	Indúst.	Indúst. salino	Indúst.	Indúst.	Indúst.	Indúst.	Sintét	Sintét. salino	Sintét. c.quím.	Sintét. c.quím.	Sintét. c.quím	Sintét. c.quím	Indust Dig. Anaer
Carga [kgCOD/(m ³ .d)]	7,5	1.6	---	2,0	4,5	1,72	7	---	3-6	---	5,7	0,71	2,8	0,75	3,0	---	---
COD (mgO ₂ /L)	---	396	330	1000	2800	480	---	1-6g/L	---	1850	---	2270	1000	---	---	---	---
Substrato (mg/L)	400	---	---	---	---	---	---	---	---	---	800	1000	---	5,9mM	0,2g/L.d	400	1000
Co-substrato (mg/L)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	100	0,4mM	---	---	---
Inóculo	Floc.	Floc.	Floc.	Floc.	Floc.	Floc.	Floc.	I.G	I.floc.	Floc.	G.	G.	Floc.	G+aug	---	I.floc.	Floc.
SBR: VSS (g/L)	≈ 3	8,5	---	7	2-8-3	10	2-16-4	13	≈ 3,8	6-8	12-17	9,5	4,7	≈ 6	6	3	---
Grânulos (mm)	3,3	1.1-1.6	1.1	1	2,5	3,4	5	5.8	0,9	1,5	0,5	---	1-2	< 1	1,2	0,35	1-3
SVI ₃₀ (mL/g)	---	SVI ₈ =24	SVI ₁₀ =38	28	50	30	32	22-26	30-50	22	22-38	15-25	6 m/h	6 m/h	30	68	30-50
Remoção COD	total	100%	49%	88%	90%	90-95%	87%	95%	88-90%	97%	boa	99.6%	95%	---	90%	99,8%	80%
Remoção co-substrato	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	94%	total	99.9%	---	---
Remoção Azoto	---	94%	11%	---	80%	40%	70%	---	---	89%	---	---	---	---	---	---	40%
Remoção fósforo	---	94%	---	---	70%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Dias p/ granul. estável	---	20	20	25	15-30	75	10	---	140	39	---	---	39	---	---	168	10

Notas: *Estudo apresentado no capítulo 5 desta dissertação. HRT: **valor calculado. Abreviaturas: Urban.: Água Residual Urbana, Sintét.:Efluente sintético. COD:Carência Química de Oxigênio total. Inóculo: Floc.-lamas ativadas (flocos), I.Floc.-lamas ativadas adaptadas ao efluente industrial em estudo (flocos), G-grânulos aeróbios, I.G-grânulos adaptados ao efluente industrial em estudo, G+aug:suplementação com *Rhodococcus sp.* strain FP1, SVI_x: Índice de volume de lammas medido aos x minutos.

3.6 Aplicação de SBR de grânulos aeróbios no tratamento de efluentes têxteis

As águas residuais da indústria têxtil contêm corantes originados principalmente nas etapas de tingimento que geram graves problema ambientais nos meios recetores. Em particular, os corantes azo são uma parte substancial do problema pois constituem cerca de 70% de todos os corantes utilizados (Maas and Chaudhari, 2005). Para além dos corantes, estas águas residuais contêm frequentemente teores elevados de tensioativos, metais pesados, solventes, e outros produtos recalcitrantes que são muitas vezes tóxicos para a biomassa (Lotito et al. 2012b).

Normalmente uma única tecnologia não é suficiente para garantir uma remoção satisfatória dos poluentes presentes nestas águas residuais têxteis que permita a sua descarga nas águas superficiais (Pearce et al. 2003, Lotito et al. 2012b). Assim na maioria dos casos, em estações de tratamento centralizadas, é utilizada uma combinação de tratamento biológico (usualmente lamas ativadas) com métodos físico-químicos tais como coagulação-floculação, adsorção a carvão cativado, processos eletroquímicos e ozonização (dos Santos et al. 2007, Lotito et al. 2012b). No entanto, se o tratamento biológico incluir duas fases ou etapas, uma anaeróbia e outra aeróbia, há a possibilidade de remoção de cor por via biológica, pois na fase anaeróbia os corantes azo podem funcionar como aceitadores finais de eletrões, sendo reduzidos através da quebra da ligação dupla N=N com a formação das correspondentes aminas (Stolz 2001). Estas aminas não possuem cor, mas algumas podem ser tóxicas e nefastas para a saúde humana (van der Zee e Villaverde 2005). Na fase aeróbia do tratamento biológico pode completar-se a degradação dos compostos orgânicos presentes e possivelmente a oxidação e degradação das aminas intermediárias (Brown e Laboureur 1983).

Existem vários estudos que demonstram a aplicabilidade da utilização de SBR para o tratamento de águas residuais da indústria têxtil (Lourenço et al. 2000, Sponza e Işık 2002, Albuquerque et al. 2005, Sponza e Işık 2005, Lourenço et al. 2006, Işık e Sponza 2008). Os SBR têm, entre outras, as vantagens de serem sistemas simples, da operação flexível e de poderem incluir as duas fases anaeróbia e aeróbia no ciclo reacional.

As vantagens da granulação aeróbia face ao uso de biomassa em flocos já foram referidas, mas destaca-se, em especial para o tratamento de efluentes têxteis, a vantagem que pode resultar para a mineralização de corantes azo do estabelecimento num mesmo grânulo de zonas aeróbias e anóxicas/anaeróbias. A robustez dos grânulos face à presença de compostos tóxicos presentes muitas vezes nestes efluentes, bem como a possibilidade de operação com concentrações elevadas de biomassa que permitem tratar cargas orgânicas

elevadas num sistema compacto, são vantagens adicionais. Este último aspeto é importante pois a tendência atual é de uso eficiente da água industrial, com reutilização direta das águas de processo, gerando em média efluentes industriais mais concentrados.

A utilização da tecnologia granular aeróbia (em SBR) para o tratamento de efluentes têxteis parece ser uma solução promissora e que está atualmente a dar os primeiros passos (Muda et al. 2010, Muda et al. 2011, Kolekar et al. 2012, Lotito et al. 2012b, Mata et al. 2015). Nota: o trabalho da autora atrás referido é apresentado na presente tese, capítulo 6.

Fazendo uma análise crítica aos estudos referidos na Tabela 3.2 verifica-se que o reator utilizado por Lotito et al. (2012) é um SBR com a biomassa confinada entre duas membranas (SBBR) estando por isso ausentes os problemas relacionados com a sedimentação e o arrastamento de sólidos no efluente final. Para além disso, neste estudo não se incluiu uma fase anaeróbia na operação do reator, o que explica provavelmente o baixa nível de remoção de cor obtido (16%). No entanto, este resultado parece indicar que apesar do interior dos grânulos constituir um ambiente anóxico/anaeróbio é em princípio necessária uma fase sem arejamento para que se consiga a remoção de cor. O mesmo parece não ser necessário para a remoção de azoto, visto que esta atingiu um valor de 68%. De realçar que os autores utilizaram um efluente real e que o processo foi estudado com vista à sua aplicação como pré-tratamento de efluentes industriais têxteis antes da sua descarga num coletor municipal.

No estudo de Kolekar et al. (2012) os autores indicam que foi obtida a remoção completa de cor (partindo de 5 g/L do corante *Reactive Blue 59*) e que ocorreu uma indução significativa das enzimas azorredutases e do citocromo P-450, indiciando que terão um papel de destaque na degradação de corantes. Dos testes de toxicidade efetuados pelos autores (em minhocas da terra da espécie *Dichogaster curgensis*) sobressai que os produtos de degradação do corante não apresentam toxicidade. No entanto, pelos dados apresentados no artigo não é possível elucidar qual o regime operacional utilizado (anaeróbio ou aeróbio) e há incoerências entre as informações apresentadas que tornam difícil a interpretação dos resultados e a comparação com outros estudos, nomeadamente quanto à duração do ciclo reacional.

Muda et al. (2010) e a autora Mata et al. (2015) estudaram ambos o tratamento de um efluente têxtil sintético contendo corantes azo, no primeiro caso tendo por base uma mistura de substratos orgânicos facilmente degradáveis (glucose, acetato, etanol) e três corantes azo, e no segundo caso constituído por uma mistura de Emsize E1 (um derivado de amido usado com agente encolante, e que é descarregado no efluente na forma hidrolisada) com nutrientes e um corante azo. Em ambos os estudos o ciclo foi de 6 h, com fase anaeróbia de

80 (total, 40+40 min) e de 180 minutos respectivamente. Os inóculos utilizados foram bastantes diferentes, sendo que no primeiro caso partiu-se de grânulos anaeróbios e flocos adaptados ao efluente têxtil e no segundo de lamas ativadas colhidas uma ETAR municipal. Os grânulos obtidos no primeiro caso tinham em média uma dimensão de 2,3 mm e no segundo de 0,5 mm. A obtenção de grânulos de maiores dimensões num reator tubular com um valor da razão H/D de 12,5 (Muda et al. 2010) é natural, visto que, como já referido, esta configuração propicia uma seleção mais efetiva dos grânulos comparativamente ao reator com um valor H/D de 2,5. Curiosamente a sedimentabilidade dos dois tipos de grânulos foi similar, com valores de SVI_{30} de 69 e 60 mL/g, respetivamente.

Os dois estudos anteriores obtiveram bons níveis de remoção de COD e os sistemas foram também eficientes na remoção de cor, até 55% (Muda et al. 2010) e de 80 a 85% (Mata et al. 2015). No entanto, os últimos autores referem que ocorreu instabilidade no sistema, com produção de agregados de EPS independentes dos grânulos de biomassa, e que o sistema melhorou o seu desempenho com a aplicação de um regime de arejamento intermitente mantendo os mesmos períodos totais de anaerobiose e aerobiose em cada ciclo.

O valor de HRT em ambos os estudos foi de 12 h, mas num estudo efetuado posteriormente com o mesmo reator alimentado com um efluente sintético, Muda et al. (2011), estudaram o aumento do valor de HRT para 24 h. Este aumento melhorou as eficiências de remoção de cor e COD mas provocou diminuições na concentração de biomassa, na dimensão dos grânulos e na sua sedimentabilidade. No entanto, os autores referem que um aumento da fração do tempo reacional operado em anaerobiose contribuiu para um aumento da concentração da biomassa, contrabalançando os efeitos nefastos deste valor de HRT mais elevado.

É de realçar de novo que os reatores SBR utilizados por estes dois grupos foram bastante diferentes, sendo um tubular, o mais usual para o cultivo de grânulos, e o outro não tubular. O segundo é até o SBR reportado para operação com biomassa granular com o valor da razão H/D mais baixo de toda a literatura consultada. Esta configuração não tubular, apesar de ser pouco utilizada para a granulação em estudos laboratoriais, é presumivelmente mais adequada para uma implementação à escala real e daí o interesse dos autores na sua utilização (Mata et al. 2015).

Os estudos analisados constituem efetivamente os primeiros passos no uso de grânulos aeróbios em tratamento de águas residuais têxteis, mas para a sua implementação é necessário continuar a investigação. No entanto conclui-se que é inequívoco que o tratamento de efluentes têxteis por SBR granulares aeróbios tem um vasto potencial.

Tabela 3.2 - Resumo de dados publicados sobre estudos de tratamento de efluentes têxteis com grânulos aeróbios.

	Muda et al. (2010) Corantes azo	Lotito et al. (2012b) Efluente real contendo corantes	Kolekar et al. (2012) Industria Têxtil Corante Azo <i>Reactive Blue 59</i>	Mata et al. 2015* Corante Azo <i>Acid Red 14</i>
Duração do ciclo	6h	6-8h	6h	6h
Enchimento (min)	5	Poucos minutos	10	15
Fase anaeróbia (min)	40+40 (intermitente)	Não	não especificado	180
Fase arejada (min)	130+130 (intermitente)	≈ 6-8h	não especificado	120
Sedimentação (min)	5	não aplicável – reator membrana**	5	3-4
Descarga (min)	5	15	10	1
Volume SBR	4 L	≈ 30 L	3 L	1,5 L
HRT	12h	≈ 20 h (calculado)	---	12h
<i>Exchange vol.ratio</i>	50%	---	50%	50%
H/D	12,5	5,3	27	2,5
H (Altura em cm)	100	100	150	25
D (Larg. em cm)	8	19	5,5	10
Caudal de ar (L/min)	1,6 cm/s	---	---	3
Tipo de efluente	Sintético: mistura glucose + acetato + etanol + corantes + minerais	Real: efluente de indústria de tingimento e acabamento	Sintético, peptona (1,5 g/L) + extrato de levedura (1,0 g/L) + corante	Sintético, Emsize E1 (agente colante derivado de amido, previamente hidrolisado) + corante + minerais
Substrato Orgânico				
Carga [kgCOD/(m ³ .d)]	2,4	0,4 – 2,6	---	2,5
COD (mgO ₂ /L)	1270	500 - 1300	64 e 29 g/L	1000
Corante	Sumifix Black EXA+ Sumifix Navy Blue EXF+ and Synozol RedK-4B	uma mistura, não identificados	Reactive blue 59	Acid Red 14
Corante (mg/L)	50	---	5 g/L	20
Inóculo	Flocos lamas ativadas da ind. têxtil + Grânulos Anaeróbios	Flocos lamas ativadas de ETAR municipal	Diversos isolados de solos e lamas contaminados com efluentes têxteis	Flocos lamas ativadas de ETAR municipal
Grânulos (mm)	2,3	0,5	---	0,5
SV ₁₃₀	69	60-80	---	60
SBR-VSS (g/L)	5,6	---	---	4,5 – 5,5
Efluente – TSS (mg/L)	300 -500	---	---	100-300
Remoção COD	94%	63%	37% a 6h e 56% a 24h	75-80%
Remoção Azoto	---	68% (calculada, média dos valores)	---	---
Remoção cor	55%	16% (calculada, média dos valores)	Biodescoloração completa em 8 a 12h	80-85%
Dias até à granulação	30	---	3 semanas	21
Total de dias da exp.	66 dias	200 dias	60	112
Idade de lamas (d)	8,3	---	---	11
Observações	---	Biomassa contida entre 2 membranas	Incerteza sobre a duração do ciclo reacional.	Os valores apresentados são do período I e IV da experiencia

*Estudo apresentado no capítulo 6 desta dissertação. **SBBR-reator sequencial descontínuo de membrana.

4 DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE BIODESCOLORAÇÃO DE CORANTES AZO

4.1 Resumo

Foram efetuados ensaios de biodescoloração de corantes azo por lamas ativadas, em sistemas descontínuos e na ausência de arejamento (anaerobiose), com vista ao desenvolvimento de um teste expedito para a quantificação da biodescoloração redutiva, distinguindo-a da descoloração por biosorção. Colocou-se uma solução aquosa de cada corante em estudo em contacto com 2 g/L de biomassa (inóculo), na presença ou ausência de glucose num teor equivalente a 1000 mg COD/L, e na presença de macro e micronutrientes. Foi testada a robustez do teste face a variações nas características do inóculo, nomeadamente, utilizando-o fresco e após períodos de incubação de até 4 dias sob arejamento, em ausência de alimentação (regime de fome aeróbio), bem como testando inóculos de diferentes proveniências (tanque de arejamento duma ETAR; reator laboratorial). Verificou-se que a presença ou ausência de glucose nos ensaios parece não influenciar a biodescoloração, o que pode significar que para as concentrações de biomassa e corante utilizadas, os equivalentes redutores existentes à partida na célula são suficientes para a redução. Foram testados agentes inibitórios para o desenvolvimento de um controlo abiótico que permitisse distinguir a biorredução da biosorção. Verificou-se inibição da biodescoloração na presença de azida de sódio e/ou dicumarol, a qual sofria reversão quando o inóculo era previamente sujeito ao regime de fome, tanto mais acentuadamente quanto mais prolongado fosse este último. Especialmente no caso da azida, esta reversão do efeito de inibição só ocorreu na presença de glucose durante o teste de biodescoloração. Isto indica que o *stress* induzido pelas condições oligotróficas pode despoletar um mecanismo alternativo de respiração do corante (biorredução), insensível aos inibidores. Tal reforça a hipótese de que a biodescoloração utiliza um mecanismo respiratório inespecífico disponível nas células e sujeito a indução por fatores ambientais. O controlo abiótico, com plena inibição da biorredução, só foi conseguido associando a inativação física da biomassa por autoclavagem (ou sonicação) à presença dos inibidores azida e dicumarol e à ausência de fonte de carbono. Com base nestes ensaios foi proposto um teste rápido para a quantificação da suscetibilidade à biodescoloração de corantes azo (patente concedida). Este teste permite selecionar os corantes mais amigos do ambiente, ou seja, com maior suscetibilidade ao tratamento de redução biológica e com menor tendência de adsorção à biomassa, não limitando a valorização desta como fertilizante de solos agrícolas.

4.2 Introdução

Os corantes do tipo azo têm uma utilização significativa em vários setores, tais como a indústria têxtil, a indústria do papel e a indústria alimentar, representando cerca de 70% dos corantes utilizados a nível industrial (Maas e Chaudhari 2005, Jin et al. 2007). A indústria têxtil sozinha é responsável por dois terços do mercado de venda de corantes (ETAD 2003, Pinheiro et al. 2004). As atuais diretivas de proteção ambiental apontam no sentido da prevenção e do controlo das emissões industriais. Neste contexto, as indústrias produtoras e/ou utilizadoras de corantes azo necessitam de métodos rápidos e simples para determinar o potencial de biodescoloração desses corantes, de forma a minimizar nos seus efluentes líquidos, a emissão de compostos com estruturas moleculares que sejam resistentes ao tratamento biológico usualmente presente nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR). É igualmente importante determinar a extensão da adsorção dos corantes à biomassa de ETAR, pois caso ocorra, pode inviabilizar o posterior tratamento e valorização agrícola dessa biomassa.

A descoloração de corantes azo por bactérias em condições anaeróbias tem sido reportada extensivamente, quer com culturas puras, quer com culturas mistas, sendo a descoloração obtida pela redução e clivagem da ligação azo das moléculas de corante (Razo-Flores et al. 1997). Existem por isso diversos estudos que descrevem sistemas de tratamento biológico de efluentes contendo corantes azo que utilizam uma etapa anaeróbia como forma de obter a descoloração (ver Tabela 2.9 e Tabela 2.10). Pretende-se com este trabalho, desenvolver um método para a avaliação da biodescoloração de corantes azo, utilizando um inóculo de lamas ativadas (cultura mista) na presença de uma fonte de carbono (glucose), macro e micronutrientes e que decorre em condições anaeróbias, de forma a simular esta fase num tratamento biológico de efluentes. Com vista à distinção entre a descoloração por via biológica e a adsorção à biomassa, o método necessita de um controlo abiótico, o que normalmente é obtido por adição de inibidores ou por processos físicos de inativação celular, como a autoclavagem e a sonicação.

A autoclavagem da biomassa não será a primeira opção para o teste abiótico, mas sim o uso de inibidores, pois já foi reportada a existência de descoloração na presença de lamas autoclavadas (Lourenço et al. 2001, van der Zee et al. 2003). Esta descoloração deve-se provavelmente, à libertação ou acumulação de princípios ativos redutores biossintetizados pela cultura antes de ser sujeita ao tratamento de inativação, os quais podem transferir eletrões para o corante, numa reação puramente química.

Hong et al. (2009) reportam que num estudo específico efetuado com membranas vesiculares provenientes de uma cultura pura de *Shewanella decolorationis* S12, se

verificou que a biorredução de corantes azo é neste microrganismo uma reação de respiração acoplada à síntese de ATP. A reação de biodescoloração foi inibida por diversos compostos como os iões Cu^{2+} (a 5 μM) que são capazes de destruir os *clusters* [4Fe-4S] das hidrogenases (bem como de desidrogenases), por *stigmatellin* (a 100 μM), um análogo da quinona que bloqueia a sua ligação ao citocromo b, por dicumarol (a 200 μM) que se pensa inibir o transporte de eletrões por via da menaquinona, e por *metyrapone*, que inibe especificamente o citocromo P450 (Hong et al., 2009). O conjunto dos resultados revelou que a biorredução anaeróbia do corante azo a partir dos doadores de eletrões H_2 , formato e lactato, é obtida nesta estirpe por um sistema enzimático multicomponente de transporte de eletrões localizado na membrana celular (Hong et al. 2009). Por outro lado, o componente final típico de uma cadeia respiratória é a citocromo oxidase, e este complexo enzimático pode ser inibido por cianeto, azida de sódio ou monóxido de carbono (Woznica et al. 2003). Por conseguinte pressupõe-se que a presença destes últimos inibidores impeça a transferência de equivalentes redutores para o corante azo, ou seja, iniba a biodescoloração. O cianeto e a azida são também conhecidos por serem inibidores específicos do complexo citocromo bd oxidase (Das et al. 2005) ligando-se ao citocromo d (Junemann 1997, Keyhani e Minai-Tehrani 2001). Isto pode ser relevante nos processos de biorredução de corantes azo que são obtidos em condições de deficiência de oxigénio, pois em algumas bactérias entéricas o citocromo bd pode servir como uma oxidase de elevada afinidade para com este aceitador que suporta os processos que requerem energia em microaerobiose (Junemann 1997). A azida de sódio parece assim um bom inibidor para a reação de biodescoloração e foi por isso testada para o controlo abiótico. Tal acontece também com o cianeto, mas este tem a desvantagem de exercer toxicidade aguda a um nível ainda mais elevado que a da azida (categoria 1 e categoria 2 respetivamente).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método robusto, expedito, economicamente atrativo e de fácil execução laboratorial, com vista a que os vários intervenientes passem a ter uma ferramenta que lhes permita escolher, de entre um leque de corantes azo, aqueles que ambientalmente são mais favoráveis, ou seja, cujos respetivos efluentes sejam passíveis de descoloração durante o tratamento biológico numa ETAR sem que ocorra adsorção dos corantes à biomassa.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Soluções, substratos e Inóculos

Corante azo modelo: O corante azo utilizado como modelo para este estudo foi o *Acid Red 14* (AR14, ver Figura 2.1), sendo usado diretamente sem nenhuma etapa adicional de purificação (Chromotrope FB, fornecido pela Sigma-Aldrich, com um teor de corante de 50%). A concentração inicial do corante nos ensaios de biorredução foi de 20 mg/L.

Outros corantes utilizados: foram também realizados ensaios com os corantes *Acid Orange 7* (AO7), *Acid Orange 8* (AO8), *Acid Orange 10* (AO10), *Acid Orange 12* (AO12), *Acid Red 8* (AR8), *Acid Red 73* (AR73), *Acid Yellow 9* (AY9), *Acid Yellow 17* (AY17), *Acid Red 114* (AR114) (ensaios de adsorção) e *Acid Red 151* (AR151) (ensaios de adsorção), usados também diretamente, sem nenhuma etapa adicional de purificação, com uma concentração inicial nos ensaios de 20 mg/L. Estes compostos foram fornecidos pela Sigma/Aldrich à exceção do *Acid Orange 12* (*Crocein Orange G*) que foi fornecido pela Fluka.

Fonte de carbono: Foi utilizada glucose como fonte de carbono (grau analítico, Riedel-de-Haën, Alemanha). A concentração inicial de glucose nos ensaios de biorredução foi de 937 mg/L, equivalente a 1000 mg O₂/L de carência química de oxigénio (COD).

Solução de macro e micro nutrientes: Nos ensaios de biorredução foi utilizada uma solução base de nutrientes com as seguintes concentrações iniciais no ensaio de biorredução: KH₂PO₄ (760 mg/L), Na₂HPO₄.12H₂O (2310 mg/L), NH₄Cl (140 mg/L), MgSO₄.7H₂O (23 mg/L), CaCl₂ (28 mg/L), FeCl₃.6H₂O (250 µg/L), MnSO₄.4H₂O (40 µg/L), H₃BO₃ (57 µg/L), ZnSO₄.7H₂O (43 µg/L), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (35 µg/L). Todos os sais utilizados foram de grau analítico. Esta solução, em conjunto com a de glucose corresponde a um valor da razão mássica inicial de COD/N/P de 100/5/40.

Solução salina: Foi preparada uma solução salina a 0.9% de NaCl (grau analítico, fornecido pela Merck) que se utilizou para a lavagem inicial da biomassa (lamas ativadas) e para a compensação de volume nos ensaios em branco.

Inibidores: Foram utilizados os compostos abaixo indicados com o intuito de inibir a reação de descoloração biológica (ensaio de controlo abiótico):

- **Azida de sódio:** A concentração inicial da azida de sódio os ensaios de biorredução foi de 60 mM ou 200 mM (pureza de 99.0%, fornecido pela Merck).

- **Dicumarol:** A concentração inicial de dicumarol nos ensaios de biorredução foi de 160 μM ou 200 μM (3,3'-metileno-bis(4-hidroxycoumarina), pureza de 99,0%, fornecido pela Merck).

Inóculo de Lamas Ativadas frescas: A biomassa utilizada nos ensaios de biorredução, após recolha foi peneirada (rede de 1 mm), espessada por sedimentação e lavada duas vezes com solução salina. A concentração da biomassa nos ensaios foi ajustada a 2,0 gTSS/L. As lamas ativadas utilizadas nos ensaios foram provenientes de duas fontes distintas:

- Tanque de arejamento de uma **ETAR** municipal, com um processo de lamas ativadas contínuo com processo de nitrificação/desnitrificação (Chelas, Portugal);
- Reator piloto laboratorial descontínuo sequencial (**SBR**) aeróbio, alimentado com glucose como única fonte de carbono, operado em ciclos de 24 h e mantido a uma idade de lamas de 15 dias.

Inóculo de Lamas Ativadas em regime de fome: A biomassa em regime de fome foi obtida deixando a cultura mista sob agitação vigorosa num incubador com agitação orbital (condições de incubação aeróbia) sem alimentação, durante 24 a 96 h ou durante 120 h. Os ensaios com esta biomassa visaram o estudo da robustez do método relativamente à utilização da biomassa alguns dias após a colheita.

Biomassa inativada por processos físicos: Foram testados três processos de inativação da biomassa por meios físicos para desenvolvimento do teste abiótico:

- **Autoclavagem:** Aplicou-se à cultura mista uma autoclavagem de 30 minutos a 121°C num equipamento ajc, uniclave 88;
- **Sonicação:** Foi utilizado um equipamento Bandelin, Sonopuls, com um ponta MS73 introduzida num tubo contendo 3 mL de cultura mista, com um tempo de sonicação de 4 min (4 segundos ON a 40%, 10 segundos OFF) correspondente a 3,130 kJ;
- **Microondas:** Aplicação de 10 segundos de radiação microondas com uma potência e 800W a 2ml de cultura mista (em *eppendorf*), utilizando um equipamento Taurus, Speedy de 21L.

4.3.2 Sistema Experimental

Os ensaios de bioconversão foram efetuados em tubos *ependorf* de 1,5 mL de capacidade nominal, contendo 1,65 mL de suspensão de biorredução para que o tubo ficasse completamente cheio, evitando a presença de ar, de forma a induzir condições anaeróbias. Durante o período dos ensaios os tubos encontravam-se sob constante rotação vertical lenta de ≈ 10 r.p.m (equipamento de marca FALC, modelo F205) para garantir o contacto da biomassa com o meio. Introduziram-se ainda algumas esferas de vidro em cada *ependorf* para ajudar a garantir a mistura biomassa-meio. Os ensaios foram realizados a 20°C, em câmara termostática (câmara LIEBHERR, sistema de controlo de temperatura AQUALYTIC). Na Figura 4.1 encontra-se representado o sistema experimental.

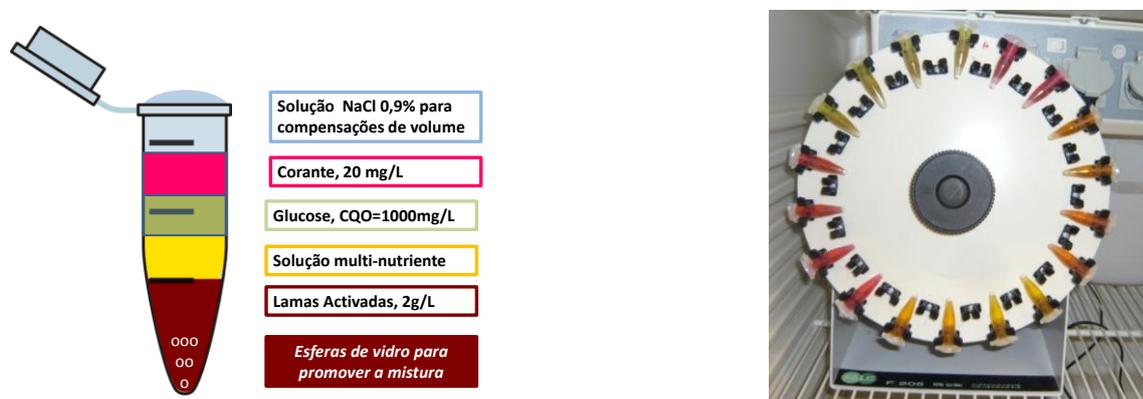


Figura 4.1– Representação do sistema experimental, à esquerda o mini-reator anaeróbico (*ependorf*), e à direita o agitador rotativo colocado dentro da câmara termoestabilizada a 20°C.

A denominação “standard” (ou std) corresponde aos ensaios que contêm corante AR14, glucose, meio mineral e biomassa (nas concentrações descritas em 4.3.1). Em relação ao estado da biomassa recolhida, denominam-se “frescas” as lamas ativadas utilizadas imediatamente após colheita, e XXh-fome (e.g. 96h-fome) à biomassa mantida XXh em regime de fome (em condições aeróbias) antes de ser utilizada. A denominação dos restantes ensaios correspondem a diferentes condições testadas, como sejam a ausência de fonte de carbono (sem glucose), a presença de inibidores (azida, dicumarol) e o tratamento prévio de inativação da biomassa (autoclavagem, sonicação, microondas).

Para a maioria das condições estudadas, foram preparados replicados em quadruplicado. Um duplicado foi analisado após 1 h de incubação, para quantificar a extensão da remoção de corante através de adsorção na biomassa. O segundo duplicado foi analisado após 48 h, quantificando a bioconversão de corante em conjunto com a adsorção, ou seja a remoção de cor.

Em cada teste foram também preparados dois brancos: um sem corante (branco-biomassa), e outro sem biomassa (branco-corante). Nas condições empregues, observou-se que as leituras de absorvência do branco-corante com AR14 não foram significativamente alteradas entre 1 e 48 h de incubação.

Em todos os ensaios os *ependorf* recolhidos após incubação foram centrifugados por 10 min a 4000 r.p.m. (ou a um máximo de 6000 r.p.m.), usando uma mini-centrífuga B.Braun Biotech Internacional sigma 113 ou uma VWR Galaxy MiniStar, e o sobrenadante foi analisado espectrofotometricamente.

Para os testes de adsorção foi utilizado o sistema representado na Figura 4.2 com as duas mini-centrífugas a operar em simultâneo. Aqui a estratégia utilizada foi diferente. O reator biológico consistiu num único copo, sob agitação magnética. Após a adição do corante foram retiradas amostras de 1 mL, inicialmente a curtos espaços de tempo (10 seg, 30 seg, 1 min e 2 min) e depois de forma mais espaçada (5, 10, 20, 25, 30, 45 e 60 min). As amostras após colheita foram colocadas em *ependorf*, centrifugadas (uso alternado das centrífugas), e o sobrenadante retirado imediatamente após centrifugação (evitando a continuação do contacto com a biomassa). A análise espectrofotométrica foi realizada nos sobrenadantes após recolha da última amostra.

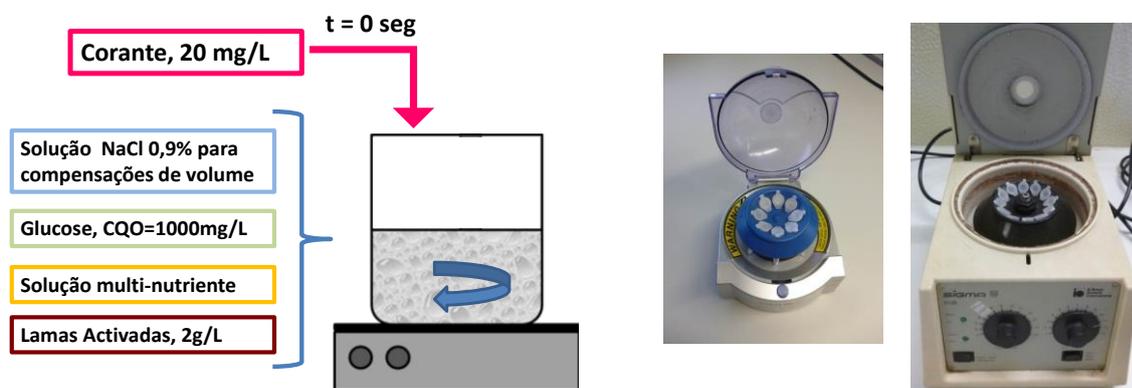


Figura 4.2– Representação do sistema experimental utilizado para os estudos de adsorção do corante às lamas activadas. À esquerda está representado o reator biológico, e ao meio e à direita as mini-centrífugas utilizadas.

4.3.3 Métodos Analíticos

Os sólidos suspensos totais (TSS) foram medidos nos inóculos através métodos normalizados (APHA 1998) após peneiração e lavagem dos mesmos (inóculo de ETAR e de biorreator laboratorial).

Os espectros de absorvência das amostras clarificadas (sobrenadantes da centrifugação) foram adquiridos na gama UV-visível (190-800 nm) num espectrofotómetro Analytik Jena, Specord 200, contra água destilada, com um percurso ótico de 1 cm. A remoção de corante foi quantificada por medições ao comprimento de onda de máxima absorvência do corante, a 515 nm no caso do corante AR14 e a outros valores para os restantes (AO7 a 484 nm, AO8 a 484 nm, AO10 a 481 nm, AO12 a 484 nm, AR8 a 511 nm, AY9 a 388 nm, AY17 a 400 nm, AR73 a 514 nm, AR 114 a 510 nm, AR151 a 486 nm). A diferença entre os valores de absorvência das amostras em estudo e as amostras do branco-biomassa (sem corante) foi utilizada para quantificar o teor de corante da amostra. Considerou-se que a diferença entre o branco-corante (1h) e o branco-biomassa (48h) correspondia a 100% de corante. O valor final de rendimento de remoção de corante (incluindo adsorção) ao fim de 48 h de ensaio foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Remoção de corante 48 h (\%)} = 100 - \frac{(\text{Absorvência da amostra} - \text{Absorvência do branco - biomassa})_{48\text{h}}}{\text{Absorvência do branco - corante}_{1\text{h}} - \text{Absorvência do branco - biomassa}_{48\text{h}}} \times 100$$

Todos os resultados apresentados neste capítulo relativamente à remoção de cor se referem ao tempo de 48h de incubação, à exceção dos resultados relativos à adsorção em que o período é de 1h. Em alguns ensaios, é especificado o tempo de incubação dado que é diferente destes.

4.3.4 Estratégia Experimental

Com o intuito de desenvolver um método robusto e que distinga a adsorção da descoloração biológica por redução foram efetuados vários tipos de ensaios que se encontram resumidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Ensaios com vista à otimização do método de medida da biodescoloração de corantes azo

Ensaio	Condições testadas	Nº ensaios(*)
1. Robustez do inóculo e das condições do teste relativamente à biorredução		
1.1 Biomassa fresca ou utilizada alguns dias após recolha	Comparação dos resultados obtidos com biomassa fresca e biomassa em regime de fome por 24, 48 e 72h. Inóculo: Lamas ativadas de ETAR Corantes: AR14, AO7, AO8, AO10, AR8, AY9, AY17, AR73	168
1.2 Inóculos de diferentes proveniências (ETAR, SBR laboratorial)	Comparação dos resultados obtidos para inóculos de proveniências diferentes (biomassa fresca e biomassa em regime de fome por 24, 48 e 72 e 120h). Inóculo: Lamas ativadas de ETAR e lamas ativadas de SBR piloto adaptado à glucose Corante: AR14	120
1.3 Influência da disponibilidade de fonte de carbono no meio (glucose)	Comparação dos resultados obtidos na presença e na ausência de glucose para inóculos de proveniências distintas (biomassa fresca e biomassa em regime de fome por 24, 48 e 72 e 120h). Inóculo: Lamas ativadas de ETAR e lamas ativadas de SBR piloto adaptado à glucose Corante: AR14	160
2. Estudo da adsorção do corante à biomassa		
2.1 Influência do tempo de contacto na adsorção do corante à biomassa	Comparação dos resultados de adsorção obtidos a diferentes tempos de contacto da biomassa fresca com o corante (o teste foi efetuado com 3 corantes, dois deles com elevada adsorção à biomassa). Inóculo: Lamas ativadas de SBR piloto adaptado à glucose Corante: AR114, AR151 e AR73	90
3. Desenvolvimento do teste abiótico (inibição da biorredução)		
3.1 Inibição por adição de azida de sódio ou dicumarol	Comparação dos resultados obtidos pela biomassa inibida por 60 e 200mM de azida de sódio (com biomassa fresca e biomassa em regime de fome por 24, 48, 72 e 96h e na presença/ausência de glucose). Comparação dos resultados obtidos pela biomassa inibida por 200µM de dicumarol (com biomassa fresca e biomassa em regime de fome por 24, 48, 72 e 96h). Inóculo: Lamas ativadas de ETAR e lamas ativadas de SBR laboratorial (ensaio dicumarol), lamas ativadas de SBR laboratorial (ensaio azida), lamas ativadas de SBR laboratorial (ensaio dicumarol) Corante: AR14	342
3.4 Inativação física combinada ou não com a presença de inibidores	Comparação dos resultados obtidos por inativação física por autoclavagem, sonicação ou microondas, combinada ou não com presença de inibidores (com o inóculo fresco e após 24, 48 e 72-fome e na presença e ausência de glucose) Inóculo: Lamas ativadas de SBR laboratorial Corante: AR14	180
4. Verificação da influência das condições abióticas na adsorção		
4.1 Influência da autoclavagem e adição de inibidores na adsorção	Comparação dos resultados de adsorção obtidos com biomassa fresca e biomassa inativada por autoclavagem e na presença dos inibidores azida de sódio e dicumarol. Inóculo: Lamas ativadas de SBR laboratorial Corante: AR14 e AR114	108

(*)Nº ensaios individuais incluindo replicados e brancos

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Robustez do inóculo

4.4.1.1 Inóculo fresco e utilizado após sujeito a um regime de fome

Com esta experiência pretendeu-se verificar se o inóculo de lamas ativadas tinha a mesma resposta em termos de remoção de cor ao fim de 48 h de reação biológica, independentemente de ser utilizado imediatamente ou após a sua manutenção em regime de fome em condições aeróbias (sem alimentação e com agitação) por 1, 2 e 3 dias (24, 48, e 72 h). As condições utilizadas foram as “standard”, ou seja 20 mg/L de corante AR14, presença de fonte de carbono (glucose), macro e micro nutrientes e 2,0 gTSS/L de lamas ativadas. Os restantes corantes (AO7, AO8, AO10, AR8, AY9, AY17, AR73) foram testados nas mesmas condições, também com uma concentração inicial de 20 mg/L.

Na Figura 4.3 encontram-se os resultados obtidos, verificando-se que os nove corantes testados apresentam um rendimento de biodescoloração sem alterações significativas para as várias condições do inóculo, em média com variações inferiores a 5%.

Curiosamente, para os corantes AR14 e AY17 parece até identificar-se uma ligeira tendência de subida da remoção de cor com o aumento do tempo do inóculo em regime de fome.

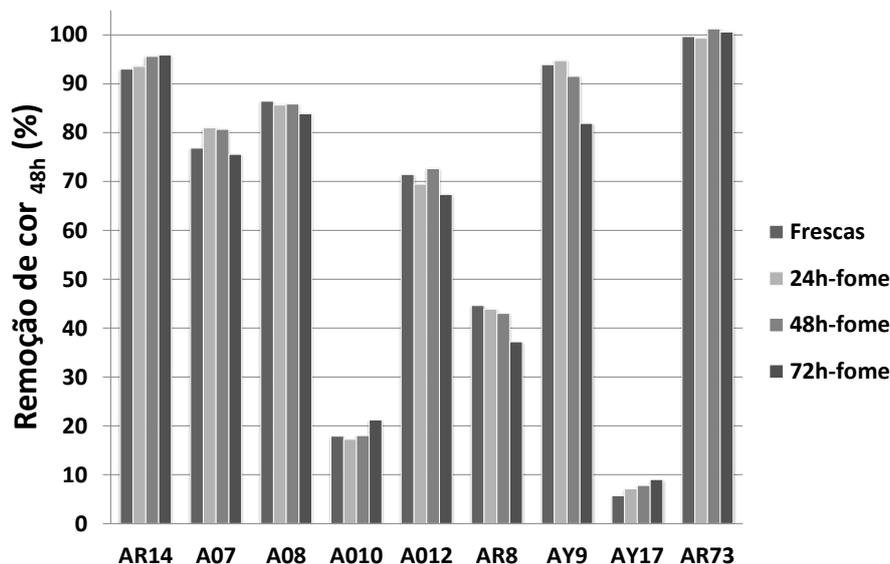


Figura 4.3 – Estudo da robustez do inóculo (ETAR) na biodescoloração de diferentes corantes azo com lamas ativadas frescas e utilizadas após 1, 2 e 3 dias de manutenção em regime de fome e aerobiose [Ensaio 1.1 da Tabela 4.1].

Como se pode ver também pelos resultados, os corantes apresentam rendimentos de remoção de cor muito variáveis, desde uma remoção quase total de 100% para AR73 (e adsorção < 6%, dados não apresentados) a uma remoção menor que 10% para AY17. Tal significa que de facto, a escolha *a priori* dos corantes que são biodescoloráveis faz todo o sentido em termos ambientais.

Os resultados destes ensaios são importantes pois significam que o método é insensível ao acondicionamento e utilização do inóculo, ou seja, basta realizar uma colheita de lamas ativadas no início da semana e a biomassa mantida em condições aeróbias pode ser utilizada durante toda a semana nos ensaios de biodescoloração.

4.4.1.2 Influência de diferentes inóculos e da disponibilidade da fonte de carbono

Para testar a resposta da reação de biodescoloração a inóculos de proveniências distintas e adaptados a diferentes substratos, realizaram-se ensaios com lamas ativadas provenientes de ETAR (adaptadas a água residual urbana, Chelas, Lisboa) e com lamas ativadas provenientes de um reator laboratorial alimentado com glucose como única fonte de carbono.

As condições iniciais foram as “standard” (20 mg/L de AR14, glucose, macro e micro nutrientes e 2,0 gTSS/L de biomassa). Foi também estudada a influência da presença/ausência do dador de eletrões (glucose). Todos os ensaios foram ainda realizados com diferentes acondicionamentos da biomassa (fresca e após um regime de fome aeróbio).

Na Figura 4.4 encontram-se os resultados obtidos, em que, independentemente da condição estudada se obteve um nível de biodescoloração acima de 90% (à exceção de um ensaio, em que as réplicas são discordantes). A adsorção do corante AR14 à biomassa foi avaliada pela diferença de absorvências de sobrenadantes após 1 h de contacto entre a solução de corante e a biomassa, em condições “standard”, representando entre 1 a 5% do total de corante (dados não apresentados). A análise dos espectros dos sobrenadantes confirma igualmente que após 1 h de incubação o fenómeno de biorredução é despiciente, pois os espectros após 48 h de incubação são marcadamente diferentes dos obtidos após 1 h (que são semelhantes aos do branco-corante), observando-se uma redução seletiva da absorvência na zona do visível, consistente com uma transformação molecular e não com uma simples adsorção.

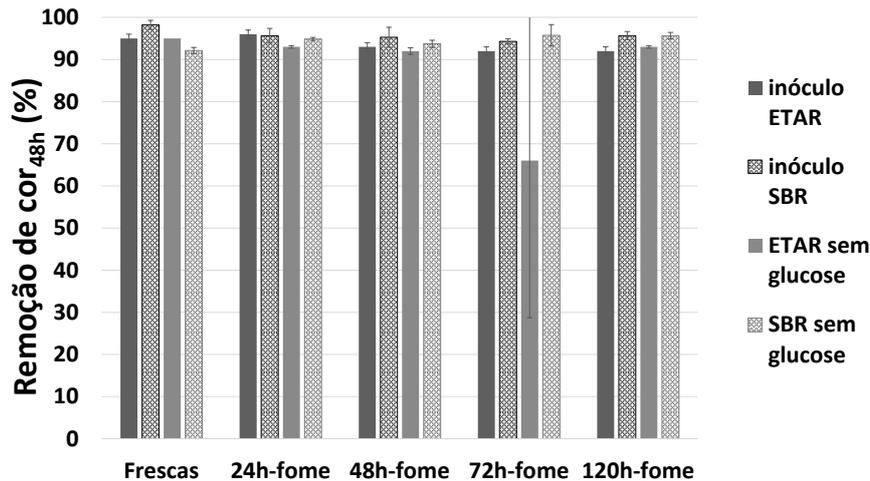


Figura 4.4 – Comparação da biodescoloração de AR14 obtida com inóculos de diferentes proveniências (lamas ETAR urbana e lamas de SBR piloto adaptado a glucose), em presença ou na ausência de glucose [Ensaio 1.2 da Tabela 4.1]. São apresentados valores médios e as barras de erro representam o desvio-padrão de ensaios em duplicado.

A partir dos resultados obtidos observa-se:

- Os níveis de biodescoloração obtidos para o AR14 com inóculo proveniente da ETAR ou inóculo proveniente do SBR laboratorial são praticamente iguais (95 e 98% respetivamente), concluindo-se que o método é robusto no que respeita à utilização de inóculos de lamas ativadas provenientes de fontes diversas;
- Confirma-se, como já observado anteriormente (4.4.1.1), que a utilização do inóculo fresco ou vários dias após a recolha (mantido em regime de fome aeróbio) produz resultados de biodescoloração comparáveis;
- Verifica-se que a ausência de fonte de carbono não influencia a biodescoloração, mantendo-se esta nos mesmos níveis com e sem glucose.

A biodescoloração obtida na ausência de glucose pode dever-se à utilização de substratos endógenos como fonte de eletrões para a biorredução, como indicado por Hong et al. (2008) para um sistema similar. A novidade no presente trabalho refere-se ao facto de as lamas ativadas, mesmo após serem sujeitas a períodos de até 120 h em regime de fome aeróbio, aparentemente não terem esgotado estes substratos endógenos, mantendo-se a biorredução do corante na ausência de glucose ao mesmo nível da dos ensaios realizados na presença de glucose. Esta observação sugere que o sistema enzimático envolvido se mantém ativo, mesmo após longos períodos em regime de fome. Esta disponibilidade de dadores de eletrões endógenos pode também estar envolvida nas razões que levam a que não se observassem diferenças significativas entre a biodescoloração com diferentes inóculos, adaptados a diferentes substratos.

4.4.2 Adsorção à biomassa

Com vista a decidir qual o tempo necessário para se avaliar a adsorção de corante à biomassa, efetuaram-se ensaios em que foi avaliada a adsorção ao longo do tempo de contacto. Foram escolhidos dois corantes azo com elevada adsorção, *Acid Red 114* e *Acid Red 151*, e um com baixa adsorção, *Acid Red 73*. As condições iniciais utilizadas foram as “standard” (biomassa, glucose, macro e micro nutrientes), com 20 mg/L de cada corante.

A remoção de cor foi avaliada ao longo do tempo e os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.5, onde se verifica que o fenómeno de adsorção é bastante rápido, tanto para os corantes com elevada adsorção (AR114 e AR151), como para o corante AR73 com baixa adsorção. Verifica-se que o período de 1h corresponde nitidamente a uma zona estabilizada de adsorção máxima. Aliás, após 15 minutos de incubação, já é possível distinguir claramente os corantes em termos de adsorção, pois esta já atingiu 70% ou mais, que a total obtida ao fim de 1h.

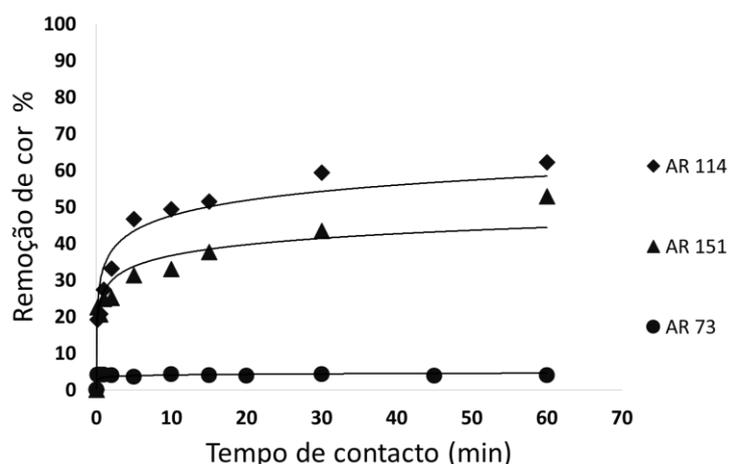


Figura 4.5 – Testes de adsorção do corante à biomassa efetuados para Acid Red 114, Acid Red 151 e Acid Red 73 [Ensaio 2.1 da Tabela 4.1].

Estes resultados indicam que o período de 1 h é suficiente para avaliar a adsorção do corante à biomassa, e por outro lado, parece ser suficientemente curto para que o fenómeno de remoção de cor por via da redução biológica não seja significativo.

No entanto, considera-se que a validação do método carece de que o mesmo seja realizado com a biomassa inibida ou inativa, para que exista a garantia inequívoca de que não há remoção de cor por via biológica neste período de 1 h.

4.4.3 Desenvolvimento do controlo abiótico

4.4.3.1 Inibição por azida de sódio e dicumarol

Como referido em 4.2 a azida de sódio parece ser uma boa escolha para a inibição do processo biológico de descoloração da biomassa. As concentrações de azida utilizadas em estudos de inibição situam-se em regra na gama 10 a 40 mM (Fournier et al. 2003, Woznica et al. 2003). No presente estudo as duas concentrações de azida estudadas foram 60 mM e 200 mM, sendo a última uma concentração bastante mais elevada do que as usualmente reportadas na literatura. As condições “standard” do ensaio de descoloração foram comparadas com as mesmas mas em presença de azida de sódio, com biomassa fresca e após ter sido sujeita ao regime de fome, na presença e na ausência de fonte de carbono (glucose).

Os resultados deste ensaio apresentam-se na Figura 4.6. Como se pode observar na parte A, a azida a uma concentração de 60 mM inibe fortemente a bioconversão do corante pela biomassa aplicada fresca após recolha na ETAR, com valores de remoção de cor perto de 5% (provavelmente por adsorção). Sem adição de inibidor (série “standard”) a mesma biomassa proporciona acima de 90% de descoloração. Isto indica que no mecanismo de biorredução podem estar envolvidas oxidases da cadeia terminal de transporte de eletrões, que catalisam a transferência de eletrões para o corante azo e cuja inativação por reação com azida resulta na inibição da biorredução.

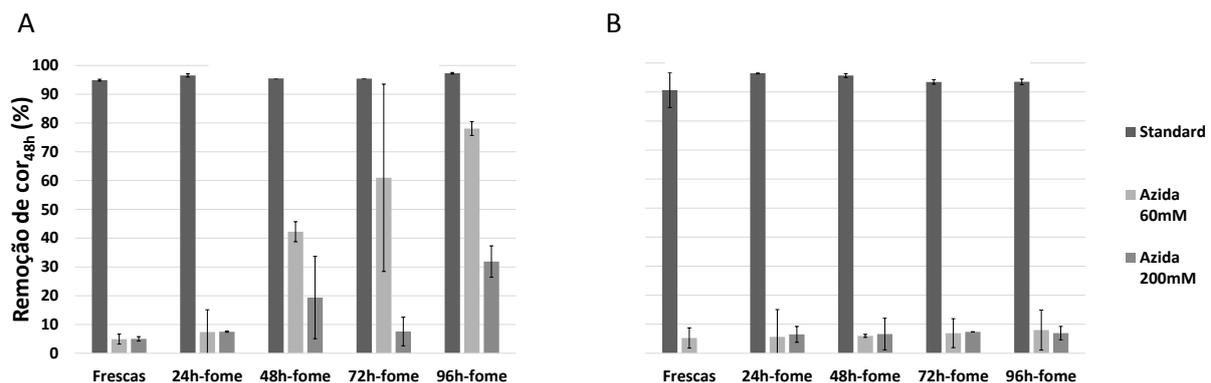


Figura 4.6 - Estudo da inibição da biodescoloração do corante AR14 com azida de sódio, em biomassa recolhida em ETAR (lamas frescas e após sujeição a um regime de fome aeróbio por 24, 48, 72 e 96 h). A – descoloração na presença de fonte de carbono (glucose), B – descoloração na ausência de fonte de carbono. [Ensaio 3.1 da Tabela 4.1]. São apresentados valores médios e as barras de erro representam o desvio-padrão de ensaios em duplicado.

No entanto, como pode ser visto claramente na mesma Figura 4.6.A, observou-se a redução gradual do efeito de inibição por azida com o aumento da duração do período de fome a que o inóculo foi sujeito. Esta tendência também se observa para a concentração de azida de 200 mM, mas de forma menos marcada. Na presença de 60 mM de azida, o regime de fome imposto ao inóculo antes da sua utilização levou a uma recuperação da atividade de biodescoloração, permitindo valores de rendimento de remoção de corante até 78%. A ausência de efeito de inibição por parte de azida já foi relatada para outros sistemas de biorredução anaeróbia, como a redução de ferro por *Aeromonas hydrophila* estirpe KB1 (Woznica et al. 2003), mas não foi encontrada qualquer referência à redução desta inibição, como resultado de um regime de fome imposto à biomassa. Este comportamento está no entanto de acordo com a existência de percursos alternativos na cadeia respiratória, como demonstrado anteriormente em algumas bactérias (Das et al. 2005), em particular no que respeita às oxidases terminais (Poole e Cook 2000).

As bactérias são organismos muito flexíveis, capazes de adaptar o seu metabolismo e comportamento dentro do período de uma geração (Poindexter 2009). O *stress* específico imposto pelo regime de fome induz não só a produção de proteínas relacionadas com os nutrientes em causa (escassez de carbono, azoto ou fósforo), mas também um conjunto de proteínas que fornecem resposta a solicitações gerais (Matim 2009). A expressão destas mesmas proteínas é encontrada em outras condições de *stress* como o *stress* oxidativo, o *stress* osmótico e o *stress* de pH (Matim 2009). Assim, o *stress* provocado pelo regime de fome poderá ter induzido, na cultura mista, a expressão de novas proteínas insensíveis à inibição pela azida e capazes também de catalisar a transferência de eletrões para o corante azo.

As amostras de lamas ativadas foram monitorizadas por observação microscópica, com coloração de Gram, ao longo do tempo de incubação em regime de fome aeróbio. Registou-se uma diminuição do número de protozoários e metazoários e um aumento acentuado da prevalência da característica Gram negativa da população bacteriana, ao longo do tempo (dados não apresentados). Esta última observação segue a propensão encontrada em estudos de populações sujeitas a condições oligotróficas no seu habitat aquático natural, que mostraram de forma consistente que as bactérias predominantes tendiam a pertencer a poucos grupos, todos do tipo Gram negativo (Poindexter, 2009).

Em relação ao efeito da azida na atividade de biorredução, uma diferença significativa foi observada entre os testes na presença e na ausência de glucose (Figura 4.4, partes A e B). Nomeadamente, a redução da inibição não foi observada na ausência de glucose, obtendo-se rendimentos de remoção de corante abaixo de 10%. Deduz-se que a possível via alternativa de transferência de eletrões para o corante, despoletada na biomassa mantida

em regime de fome, parece requerer a utilização de glucose para ocorrer, enquanto a via de biorredução original não necessita da sua presença, como se observa na série “standard” da Figura 4.6.B, em que a biodescoloração se mantém acima de 90% na ausência de glucose.

É ainda de referir que a observação qualitativa das amostras incubadas revelou que a biodescoloração na presença do inibidor (azida) apresentava uma cinética mais rápida que a descoloração em condições "standard", o que reforça a existência de uma via alternativa, seguindo um mecanismo diferente.

Os mesmos ensaios foram realizados com um inóculo recolhido num reator laboratorial (SBR) adaptado a glucose como única fonte de carbono disponível. Os resultados encontram-se expressos na Figura 4.7 e verifica-se na parte A que, ao contrário da biomassa recolhida na ETAR, a biomassa proveniente do SBR não é inibida pela presença da azida de sódio na concentração de 60 mM (biodescoloração acima de 90%), e mesmo para a concentração bastante elevada de 200 mM, apesar de se observar alguma redução no rendimento da biodescoloração, não ocorre um efeito de inibição consistente. Aparentemente, a biomassa proveniente do SBR, pelo facto de estar adaptada à glucose como fonte de carbono, apresenta as proteínas insensíveis à azida já expressas, podendo usá-las de imediato.

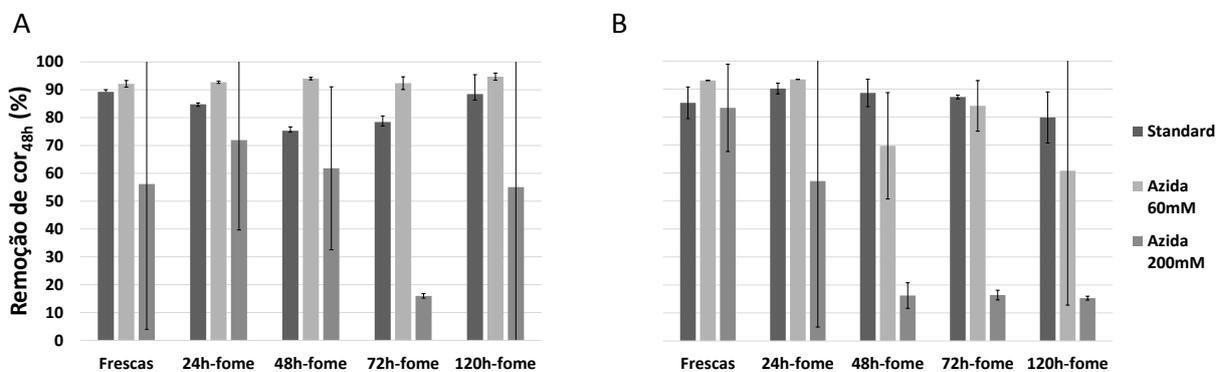


Figura 4.7 - Estudo da inibição da biodescoloração do corante AR14 com azida de sódio, em biomassa adaptada a glucose recolhida de um SBR (lamas frescas e após sujeição a um regime de fome aeróbio por 24, 48, 72 e 120 h: A – descoloração na presença de fonte de carbono (glucose), B – descoloração na ausência de fonte de carbono. [Ensaio 3.1 da Tabela 4.1]. São apresentados valores médios e as barras de erro representam o desvio-padrão de ensaios em duplicado.

Observa-se, por outro lado, na Figura 4.7.B, uma tendência, apesar de mais atenuada do que a observada na Figura 4.6.B, para que a ausência de glucose dificulte a via de biodescoloração alternativa. Isto observa-se em especial para a biomassa acondicionada durante um longo período em regime de fome (48, 72 e 120 h) e na presença de uma concentração elevada de azida (200 mM). É possível que esta biomassa, desenvolvida com

glucose e no regime de alimentação cíclica do SBR, tenha acumulado reservas de carbono mais abundantes que a biomassa de ETAR, e que estas reservas tenham levado mais tempo a esgotar-se no período de fome.

Estes resultados apoiam a hipótese de que o mecanismo alternativo de biodescoloração resistente à azida é sensível à presença da glucose. Quando a biomassa se encontra exaurida de reservas, caso a glucose não se encontre disponível, este mecanismo tem mais dificuldade em ser despoletado.

Estando o dicumarol reportado como inibidor da biodescoloração, o mesmo foi igualmente estudado, utilizando-se um inóculo recolhido de um reator laboratorial (SBR) adaptado à glucose. Os resultados são apresentados na Figura 4.8.

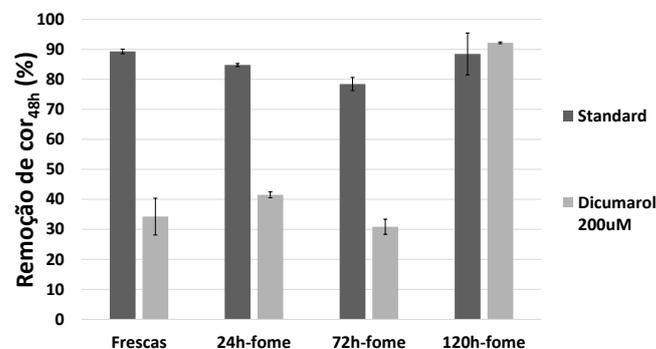


Figura 4.8 - Estudo da inibição da biodescoloração do corante AR14 com dicumarol, em biomassa adaptada à glucose recolhida de um SBR (lamas frescas e após sujeição a um regime de fome aeróbio por 24, 72 e 120 h). A descoloração foi testada na presença de fonte de carbono (glucose). [Ensaio 3.1 da Tabela 4.1]. São apresentados valores médios e as barras de erro representam o desvio-padrão de ensaios em duplicado.

Verifica-se que o dicumarol não teve um efeito de inibição drástico, tendo apenas reduzido o rendimento de remoção de cor de 80-90% para 30-40%, ao contrário do reportado por Hong et al. (2009) que verificou o impedimento total da biodescoloração na presença deste inibidor. No entanto, estes autores utilizaram uma cultura pura e analisaram a atividade de descoloração da sua fração membranaar, situação que é completamente distinta da presente, em que a biomassa é constituída por uma cultura mista de lammas ativadas contendo microrganismos viáveis de diferentes tipos. Aliás, uma publicação anterior (Khehra et al. 2005) demonstrou que um consórcio de apenas quatro estirpes de bactérias resultou num elevado aumento da eficiência da biodescoloração quando comparado com as mesmas estirpes usadas individualmente, indicando que coletivamente os microrganismos presentes nas culturas mistas têm um comportamento mais complexo do que o que resultaria da simples adição das suas prestações individuais.

Também nesta experiência se verifica que a biomassa, após um regime de fome prolongado (120 h), deixa de ser sensível à presença do inibidor, neste caso dicumarol, obtendo-se um nível de descoloração elevado, equivalente ao obtido no ensaio “standard”. Isto reforça a hipótese anteriormente discutida, relativamente à expressão de novas proteínas devido às condições de *stress* impostas, as quais permitem vias alternativas para a cadeia de transporte de eletrões respiratória e conseqüentemente para a biorredução da ligação azo.

Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que a biodescoloração não é um fenómeno metabólico específico, mas sim uma reação inespecífica associada ao mecanismo de respiração. Tal é proposto por Brigé et al. (2008) e Hong et al. (2009) (ver Figura 2.5) para a *Shewanella oneidensis*, em que o corante é supostamente reduzido por citocromos c terminais localizados na membrana exterior (maioritariamente o citocromo OmcB, com contribuição indireta dos tipos OmcA e MtrF). De acordo as observações do presente estudo, pode propor-se como adição ao estado da arte que numa cultura mista de lamas ativadas a biorredução de corantes azo pode ser levada a cabo por pelo menos duas vias alternativas de transferência de eletrões, uma sensível à azida, e outra despoletada principalmente por sujeição prolongada a condições oligotróficas e insensível a este inibidor (Mata et al. 2010).

Recorda-se que foi anteriormente verificado que apenas as células viáveis e a fração membrana (e não a fração periplásmica ou citoplásmica) de *Shewanella oneidensis* foram capazes de reduzir corantes azo na presença de doadores de eletrões (Hong et al. 2007a, 2007b). Pode assim inferir-se que a enzima identificada por vários autores como azorredutase, que catalisa a descoloração de corantes azo (Bafana et al. 2008, Kolekar e Kodam 2012, Chaudhari et al. 2013, Yang et al. 2013), corresponderá provavelmente a uma ou mais das proteínas terminais da cadeia respiratória, localizadas na membrana exterior, que poderão ser citocromos c.

O fenómeno de alívio da inibição após um período de *stress* por ausência de fonte de carbono, que resulta na expressão de novas proteínas e mecanismos de respiração alternativos abre um vasto potencial para ser explorado. Por exemplo, este fenómeno pode ser útil no caso de tratamento de efluentes contendo compostos inibidores ou tóxicos e, de uma forma mais abrangente, possibilitar o reforço e expansão da versatilidade metabólica na biodegradação microbiana por exposição prévia a este *stress* nutricional.

4.4.3.2 Estudo da Inativação física por autoclavagem, sonicação, ou microondas combinada ou não com a presença de inibidores

Com o objetivo de se obter um controlo abiótico fiável, isto é, em que não ocorra o processo de remoção biológica de cor por biorredução do corante azo, foram testadas nesta fase várias alternativas de inativação da biomassa e combinações das mesmas. O objetivo foi obter uma remoção de cor máxima de 10%, ao fim de 48 h de incubação, correspondente ao valor máximo de descoloração por adsorção obtido para o corante AR14.

Foram estudados métodos físicos de inativação da biomassa, como a autoclavagem, a sonicação e a irradiação com microondas. Os ensaios foram realizados nas condições “standard” e replicados sem a presença da fonte de carbono (glucose).

Devido à possibilidade da inativação física, *e.g.* autoclavagem, não inibir a descoloração, foram também testadas condições combinadas de inativação física e presença de inibidores (azida e dicumarol). A presença destes inibidores poderá inibir a ocorrência de reações puramente químicas de oxidação-redução entre componentes celulares reduzidos e o corante. A adição dos dois inibidores em simultâneo foi preferida pelo facto dos seus mecanismos de atuação terem como alvos pontos distintos da cadeia respiratória (ver 4.2), permitindo assim abranger na inibição um leque mais variado de proteínas celulares.

Os resultados destes ensaios encontram-se na Tabela 4.2.

Nos ensaios 1 da Tabela 4.2, em condições “standard”, obteve-se uma eficiência de remoção de cor de 96% (e 94% na ausência de glucose, ensaio 5, Tabela 4.2). Da mesma forma o ensaio na presença simultânea de azida de sódio e dicumarol apresentou 92% de biodescoloração como valor médio, não havendo inibição da reação de biodescoloração (ensaio 9, Tabela 4.2) o que se prende com a possibilidade de, na cultura mista, existirem microrganismos capazes de ativar uma ou mais vias de respiração alternativas que não utilizam as enzimas ou cofatores inativados por estes inibidores. Nestas condições, o ensaio realizado na ausência de glucose (ensaio 13, Tabela 4.2) confirma também a tendência já observada, obtendo-se um valor médio de remoção de cor de 54%. Ou seja, o mecanismo alternativo utilizado para a biodescoloração na presença dos inibidores, é sensível à presença da glucose, em especial para a biomassa utilizada após um regime de fome prolongado, exaurida das suas reservas de carbono, que atinge somente 13% de remoção de cor (Tabela 4.2, ensaio 13, coluna 96h-fome).

Tabela 4.2 – Resultados dos ensaios de biodescoloração após a inativação física da biomassa por sonicação, autoclavagem e tratamento com microondas, e por processos combinando a inativação física com a presença dos inibidores azida e dicumarol. Todos os ensaios foram realizados na presença e na ausência de fonte de carbono (glucose) e em todos os casos foi testada a biomassa fresca e biomassa recolhida após sujeição a um regime de fome (24, 48, 72 e 96 h). Os ensaios foram efetuados com biomassa recolhida em ETAR.

Nº:	Ensaio de inibição com o corante AR14:		% Remoção de cor (em 48h)					Média	STD
			Frescas	24h-fome	48h-fome	72h-fome	96h-fome		
1	Standard		98	96	95	94	96	96	1
2	Autoclavagem		45	52	43	35	34	43	8
3	Sonicação		96	91	93	95	96	95	2
4	Microondas		93	90	72	97	91	91	10
5	Standard	(sem glucose)	92	95	94	96	94	94	1
6	Autoclavagem	(sem glucose)	9	14	11	11	9	11	2
7	Sonicação	(sem glucose)	93	95	94	91	91	93	2
8	Microondas	(sem glucose)	92	97	95	93	91	93	2
9	Azida + Dicumarol		93	95	94	94	84	92	5
10	Autoclavagem + Azida + Dic.		7	11	9	13	7	9	3
11	Sonicação + Azida + Dic.		19	19	-4	24	8	19	11
12	Microondas + Azida + Dic.		9	16	13	10	9	10	3
13	Azida + Dicumarol	(sem glucose)	95	95	54	50	13	54	34
14	Autoclavagem + Azida + Dic.	(sem glucose)	8	11	11	3	7	8	4
15	Sonicação + Azida + Dic.	(sem glucose)	0	9	8	3	5	5	4
16	Microondas + Azida + Dic.	(sem glucose)	10	14	11	10	9	10	2

Nota: Azida + Dic. = 60 mM Azida + 160 µM Dicumarol

A inibição por microondas foi abandonada como hipótese para o controlo abiótico, pois após a sua aplicação a biomassa alterou totalmente as suas propriedades iniciais no que respeita à capacidade de adsorção dos corantes azo. É no entanto de referir que a sua aplicação isolada não inibe a biodescoloração (ensaios 4 e 8, Tabela 4.2). Tal sucede aparentemente dado que todo o conteúdo celular se encontra disponível no meio após este tratamento, podendo ocorrer reações puramente químicas de oxidação-redução por contacto direto entre compostos celulares reduzidos e o corante. A inibição obtém-se apenas com a

combinação do tratamento com microondas com a presença dos inibidores azida de sódio e dicumarol (com ou sem glucose). A presença dos inibidores aparentemente bloqueia a ação dos componentes celulares libertados no meio, impedindo a descoloração por via química.

A autoclavagem (ensaio 2, Tabela 4.2) não inibiu completamente a descoloração, tendo o rendimento desta diminuído apenas para 43%, ao contrário do verificado por Gessesse (2009). No entanto, este autor utilizou uma cultura pura e, como já referido, espera-se que o comportamento de uma cultura mista seja bastante mais complexo. Contudo, a biomassa autoclavada na ausência de glucose (ensaio 6, Tabela 4.2), apresenta em média apenas 11% de remoção de cor, ou seja, nestas condições a inibição foi efetiva. Deduz-se então que a remoção de cor observada no ensaio 2 da Tabela 4.2 pode ter sido maioritariamente devida a biodescoloração, que possivelmente ocorreu por ação duma fração da biomassa que não foi inativada por autoclavagem e que se desenvolveu durante as 48 h do ensaio. No ensaio 6 da Tabela 4.2, este crescimento da biomassa sobrevivente foi impedido pela ausência da fonte de carbono, obtendo-se assim um rendimento baixo de remoção de cor. A adição de azida e dicumarol às lamas autoclavadas reduziu a biodescoloração de 43% para 9% (ensaios 10, Tabela 4.2). A efetiva inibição obtida parece resultar do facto da pequena quantidade de microorganismos que possa ter permanecido viável após autoclavagem não ter tido capacidade de crescer e ativar o mecanismo de respiração alternativo necessário à biodescoloração na presença dos inibidores. Para além disso, os compostos celulares reduzidos libertados pela biomassa inativada ficaram bloqueados na sua ação pelos mesmos inibidores. Na ausência de glucose, a adição da azida e dicumarol reforça a inibição reduzindo o rendimento de descoloração de 11% para 8% (ensaio 14, Tabela 4.2) pois há o impedimento das já referidas reações químicas de descoloração.

Nos ensaios em que a biomassa foi inativada por sonicação, verifica-se que não houve inibição da descoloração, quer na presença, quer na ausência da glucose (ensaios 3 e 7, Tabela 4.2). O facto de não se observarem diferenças significativas entre a presença e a ausência da fonte de carbono leva a supor que a remoção de cor por biomassa sonicada foi maioritariamente obtida pela via química, por contacto entre o conteúdo celular libertado no meio e o corante. Tal faz sentido tendo em conta que a sonicação provoca a disrupção celular, sendo esta técnica usada normalmente com o objetivo de libertar conteúdos celulares (Feliu et al. 1998). A adição dos inibidores às lamas sonicadas fez diminuir a remoção de cor para valores de 19% na presença de glucose e de 5% na sua ausência (Tabela 4.2, ensaios 11 e 15, respetivamente). Provavelmente na ausência da glucose a inibição é mais completa, pois para além do impedimento da remoção por via química, a via de descoloração biológica alternativa (na presença de inibidores), eventualmente utilizável por biomassa ainda viável, torna-se mais difícil.

Em resumo, apenas a combinação da inativação física por via de autoclavagem ou sonicação com a presença dos dois inibidores (azida e dicumarol) e com ausência de glucose geram um ensaio abiótico fiável, pois só assim se eliminam sistematicamente todas as vias de descoloração identificadas. O controlo abiótico poderá ser realizado utilizando uma destas metodologias, garantindo uma remoção de cor média abaixo dos 10% para o corante azo AR14. De realçar que tal só é necessário devido à especificidade da reação biológica de descoloração, que necessita apenas de uma pequena quantidade de equivalentes redutores para ocorrer. Dada a concentração elevada de biomassa face à do corante, esta quantidade é facilmente disponibilizada nas condições do teste de descoloração.

Para o estabelecimento de um método de avaliação da biodescoloração de corantes azo utilizável pelas várias entidades que os produzem ou utilizam, a autoclavagem parece ser a metodologia mais indicada, pois utiliza um equipamento mais comum, disponível correntemente em laboratórios.

4.4.3.3 Estudo da influência da inativação física por autoclavagem e da presença de inibidores na adsorção de corantes azo à biomassa

A influência da inativação física por autoclavagem e da presença de inibidores nas curvas de cinética de adsorção de corantes azo à biomassa foi estudada com vista a verificar se haveria alterações induzidas pela aplicação destas condições. Deste modo foram realizados dois estudos de adsorção, um com lamas frescas (condições “standard”) e outro com lamas autoclavadas, na presença de inibidores e na ausência de glucose. Os corantes estudados foram o AR14, corante modelo utilizado em todos os estudos descritos neste capítulo, e o corante Acid Red 114, conhecido à partida por revelar uma tendência elevada de adsorção à biomassa. Na Figura 4.9 podem encontrar-se os resultados obtidos. Verifica-se que para AR14 a diferença entre os níveis de adsorção em lamas frescas e em lamas autoclavadas não é significativa, correspondendo a valores médios de remoção de cor por adsorção de 6,4% e 3,1% respetivamente.

No caso do corante AR114, os resultados também são bastante próximos e observa-se a tendência oposta, ou seja, a adsorção a lamas autoclavadas é ligeiramente acima da verificada em lamas frescas. Aparentemente não há relação direta entre a autoclavagem e uma maior ou menor tendência para a adsorção do corante.

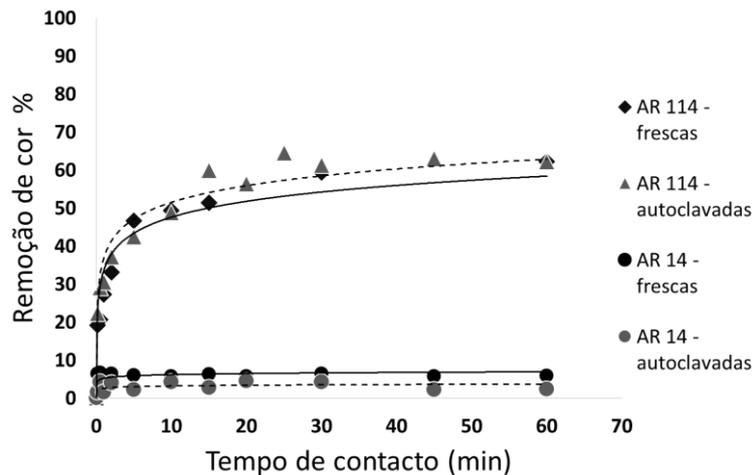


Figura 4.9 – Estudo da influência da inativação física da biomassa por autoclavagem e da presença de inibidores na adsorção dos corantes azo Acid Red 14 e Acid Red 114. [Ensaio 4.1 da Tabela 4.1].

Conclui-se que o processo de inativação da biomassa por autoclavagem e adição em simultâneo dos inibidores azida de sódio e dicumarol, na ausência de glucose, não altera significativamente a adsorção do corante à biomassa, estabelecendo-se assim os requisitos mínimos do controlo abiótico.

4.5 Resumo do método biodescoloração proposto e suas vantagens

Foi submetida uma patente com o método de biodescoloração proposto (concedida em 2015). Esta propõe um teste de biodescoloração com a duração de 48 h, com a avaliação da adsorção após 1 h em condições abióticas (biomassa autoclavada, presença dos inibidores azida e dicumarol e ausência de glucose). As vantagens deste processo para a determinação do potencial de biodescoloração de um corante azo referem-se a:

- Garantia inequívoca da avaliação do potencial de biodescoloração, pois distingue a descoloração por via biológica da descoloração abiótica, isto é, por adsorção à biomassa;
- Rapidez na obtenção de resultados, que podem ser obtidos em 48 h;
- Robustez em relação ao tipo de inóculo, dado que a biomassa pode ser proveniente de qualquer reator de lamas ativadas, isto é pode ser recolhida tanto numa ETAR como num reator laboratorial, podendo além disso ser usada fresca, ou ser armazenada em condições aeróbias e utilizada nos quatro dias seguintes à sua recolha;

- Simplicidade e baixo investimento, pois o método caracteriza-se por utilizar equipamento corrente de laboratório, incluindo um equipamento para termostatização, uma autoclave, um sistema de agitação de tubos *ependorf*, um sistema de separação sólido-líquido e um fotómetro para a gama de radiação visível.

4.6 Conclusões

Com base nos ensaios descritos no presente capítulo, foi proposto um teste rápido para a quantificação da suscetibilidade à biodescoloração de corantes azo. Este teste permite selecionar os corantes mais amigos do ambiente, ou seja, aqueles com maior suscetibilidade à descoloração por redução biológica e com menor tendência de adsorção à biomassa, não limitando a valorização desta como fertilizante de solos agrícolas.

O controlo abiótico, com plena inibição da biorredução, só foi conseguido associando a inativação física da biomassa por autoclavagem (ou sonicação) à presença conjunta dos inibidores azida e dicumarol e à ausência de fonte de carbono, pois só assim se eliminam todas as vias de descoloração identificadas.

Durante os ensaios de desenvolvimento do controlo abiótico verificou-se inibição da biodescoloração por azida de sódio e/ou dicumarol, a qual sofria reversão quando o inóculo era previamente sujeito ao regime de fome, tanto mais acentuadamente quanto mais prolongado fosse este último. Especialmente no caso da azida, esta reversão do efeito de inibição só ocorreu consistentemente na presença de glucose. Isto indica que o *stress* induzido pelas condições oligotróficas despoletou um mecanismo alternativo de respiração do corante (biorredução), insensível aos inibidores. Tal reforça a hipótese de que a biodescoloração utiliza mecanismos respiratórios inespecíficos disponíveis nas células e sujeitos a indução por fatores ambientais.

Os resultados obtidos com biomassa incubada em condições oligotróficas são importantes, pois têm potencial para a melhoria da robustez dos sistemas de lamas ativadas na presença de compostos tóxicos, especificamente no que diz respeito à degradação de compostos recalcitrantes.

(intencionalmente em branco)

**5 DESENVOLVIMENTO DE BIOMASSA AERÓBIA
GRANULAR NUM REATOR NÃO TUBULAR AREJADO E
SUA REATIVAÇÃO APÓS ARMAZENAGEM**

5.1 Resumo

Esta etapa do trabalho teve por objetivo produzir lamas granulares aeróbias num reator sequencial descontínuo (SBR) com um valor da razão altura/diâmetro de 2,5, uma geometria não tubular diferente da usualmente utilizada nestes sistemas. O SBR foi inoculado com flocos de lamas ativadas provenientes duma ETAR municipal. O reator foi operado com ciclos de 6 h, com fase de reação totalmente aeróbia (5 h) e uma *renovação de volume por ciclo* de 50% em cada ciclo. A solução alimentada (efluente simulado) continha macro e micronutrientes básicos e fosfatos para tamponização de pH, sendo a única fonte de carbono um derivado de amido usado em encolagem têxtil, previamente sujeito a hidrólise alcalina. O tempo de sedimentação do ciclo foi gradualmente reduzido de 40 para 2 minutos. Após 25 dias de operação, com um tempo de sedimentação de 3 minutos, obteve-se uma redução do valor de SVI_{30} de 280 (valor inicial) para 28 mL/g, tendo os grânulos atingido uma dimensão de 0,7 mm. A redução adicional do tempo de sedimentação para 2 minutos reduziu a eficiência de sedimentação da biomassa. Após o regresso ao regime de 3 minutos de sedimentação, obteve-se de novo um valor de SVI_{30} baixo e um aumento da concentração de biomassa no reator de 2 para 7 g/L, com os grânulos a apresentarem um bom desempenho no teste de integridade. A remoção de COD foi em média de 88%. Foi assim demonstrada a possibilidade de produção de lamas granulares aeróbias a partir de lamas com a morfologia de flocos, num reator não tubular, tendo-se concluído que o tempo de sedimentação é um fator crítico para o processo.

Os grânulos obtidos foram armazenados húmidos durante 7 meses, a 4 e 25°C, verificando-se que mantiveram bons níveis de viabilidade e integridade mesmo no armazenamento a 25°C. Obtiveram-se resultados excepcionais no re-arranque dos reatores, verificando-se a rápida recuperação (alguns dias) das características de sedimentação, taxa de crescimento e estrutura de grânulo exibidas pela biomassa antes do armazenamento. Estes resultados atestam a robustez e excelente potencial de aplicação da tecnologia de grânulos aeróbios para o tratamento de águas residuais industriais, mesmo quando sujeitos a longos períodos de interrupção do processo.

5.2 Introdução

A tecnologia de lamas ativadas granulares aeróbias (AGS) é um processo novo e promissor para o tratamento de águas residuais (Liu 2008). Os grânulos aeróbios são agregados auto-formados de microrganismos que têm propriedades de sedimentação excepcionais quando comparados com as lamas ativadas tradicionais, dispensando o uso de decantadores dedicados (de Bruin et al. 2004) e reduzindo para poucos minutos o tempo de sedimentação em sistemas integrados como os reatores descontínuos sequenciais (SBR). Heijnen e van Loosdrecht (1998) cultivaram, em SBR tubular, lamas granulares aeróbias que, apenas com uma fase aeróbia no ciclo operatório, conseguem remover compostos de carbono e azoto. A configuração tubular foi utilizada subsequentemente pela maioria dos investigadores para a formação de grânulos aeróbios em SBR, sendo usuais valores da razão altura/diâmetro (H/D) de 14 a 30 (Beun et al. 1999, de Kreuk e van Loosdrecht 2004, Tay et al. 2005, Liu et al. 2007, Bassin et al. 2012a). Os sistemas de grânulos aeróbios são compactos, necessitam de apenas 25% da área de implantação de sistemas de lamas ativadas convencionais e conseguem operar a concentrações elevadas de biomassa, permitindo tratar cargas orgânicas elevadas, incluindo efluentes muito concentrados (de Bruin et al. 2004). Inocêncio et al. (2013) indicam que, relativamente aos custos operacionais, pode atingir-se uma redução de 50% pela utilização de grânulos aeróbios em lugar de lamas ativadas convencionais. Outra vantagem referida é a rápida recuperação da atividade biológica e manutenção da integridade dos grânulos após longos períodos de armazenamento (Zhu e Wilderer 2003, Zeng et al. 2007, Wang et al. 2008, Wan et al. 2014b).

O objetivo desta etapa do trabalho foi estudar a possibilidade de produzir grânulos aeróbios a partir de um inóculo floculento de lamas ativadas, com um ciclo operacional totalmente arejado, num SBR não tubular com um valor de H/D de 2,5, ou seja, mais próximo do dos SBR utilizados à escala real. Teve-se em vista analisar os parâmetros que influenciam este processo e caracterizar os grânulos obtidos, incluindo a possibilidade do seu armazenamento por períodos prolongados (7 meses) e a sua utilização posterior um para re-arranque rápido do sistema.

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Inóculo e substratos

Fonte de carbono: Foi usado como fonte de carbono um derivado de amido denominado Emsize E1 (hidroxipropil-amido, Emsland-Starke GmbH, Alemanha). O substrato foi pré-hidrolisado em condições alcalinas (NaOH) seguido de ajuste de pH a 7.0 (HCl) e diluído com água desionizada a 100 g/L (de acordo com o descrito anteriormente por Lourenço et al. (2001) e O'Neill et al. (2000)). O Emsize E1 é usado com agente encolante na indústria têxtil e é descarregado nos respectivos efluentes na forma hidrolisada.

Solução base de alimentação: A solução de alimentação foi preparada em água da torneira arejada, utilizando a solução-mãe da fonte de carbono, diluída a um COD de 750 e 1000 mg O₂/L (dias 1-63 e 64-96, respetivamente), e suplementada com tampão fosfato para manutenção do pH e nutrientes. As concentrações foram as seguintes: KH₂PO₄ (760 mg/L), Na₂HPO₄.12H₂O (2310 mg/L), NH₄Cl (140 mg/L), MgSO₄.7H₂O (23 mg/L), CaCl₂ (28 mg/L), FeCl₃.6H₂O (250 µg/L), MnSO₄.4H₂O (40 µg/L), H₃BO₃ (57 µg/L), ZnSO₄.7H₂O (43 µg/L), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (35 µg/L). Todos os sais utilizados foram de grau analítico. Esta solução corresponde à razão mássica COD/N/P de 100/5/40 e 100/3.7/30 (dias 1-63 e 64-96, respetivamente).

Inóculo de Lamas Ativadas: Inicialmente (1ª experiência) o reator foi inoculado com lamas ativadas floculentas recolhidas numa ETAR municipal (Chelas, Lisboa). Antes de ser utilizada, a biomassa foi peneirada (rede de 1 mm), espessada por sedimentação e lavada duas vezes com água da torneira arejada. A concentração inicial no reator foi ajustada para um teor em sólidos suspensos totais (TSS) de cerca de 3,5 g/L.

Inóculo de grânulos armazenados: Nos testes de re-arranque (2ª experiência) foram inoculados dois reatores com os grânulos recolhidos no último dia de operação da primeira fase experimental e armazenados durante 7 meses sem arejamento nas seguintes condições:

- Armazenamento a **4°C** (inóculo **SBR1**): os grânulos foram lavados com água da torneira previamente arejada e armazenados neste mesmo meio em câmara refrigerada.
- Armazenamento a **25°** (inóculo **SBR2**); os grânulos foram armazenados no próprio licor misto, após operação de 4 ciclos adicionais sem alimentação ou descarga. O armazenamento foi feito em câmara de temperatura controlada a 25°C.

5.3.2 Sistema Experimental

O sistema experimental incluiu um SBR com um volume de trabalho de 1,5 litros alimentado com a solução de alimentação base.

Na Figura 5.1a) apresenta-se o esquema do sistema reacional. O SBR foi adaptado a partir de um reator de vidro (SCHOTT-DURAN), com uma boca GL45 e um agitador magnético (tipo âncora) suportado numa tampa de rosca equipada com duas entradas GL14. As adaptações foram feitas no frasco de vidro e incluem uma extensão vertical para 1,5 L, e a inserção de duas entradas GL45 (a 45° na parte superior do vaso de vidro cilíndrico). A extensão vertical resultou numa razão H/D de 2,5 relativamente ao volume de trabalho. A Figura 5.1b) corresponde ao SBR utilizado.

A solução de alimentação foi inserida pelo topo do reator (através de uma porta GL14) utilizando uma bomba peristáltica (Mini-S 660, Ismatec, Suíça). A descarga rápida foi realizada através uma bomba de carretes (Reglo-Z, Ismatec, Suíça). O arejamento foi efetuado com um compressor modelo SPP 15 (Highblow, Japão) através de uma membrana difusora porosa colocada no fundo do reator. O caudal de ar foi aproximadamente de 3,0 L/min correspondendo a uma taxa de arejamento de 2 v.v.min (volume de ar por volume de líquido por minuto). Foi utilizada uma placa de agitação magnética (Ikamag, RCT) utilizada a ≈ 200 r.p.m.

As funções de bombagem, arejamento e agitação foram automaticamente controladas, via uma interface, através de um programa dedicado instalado num PC.

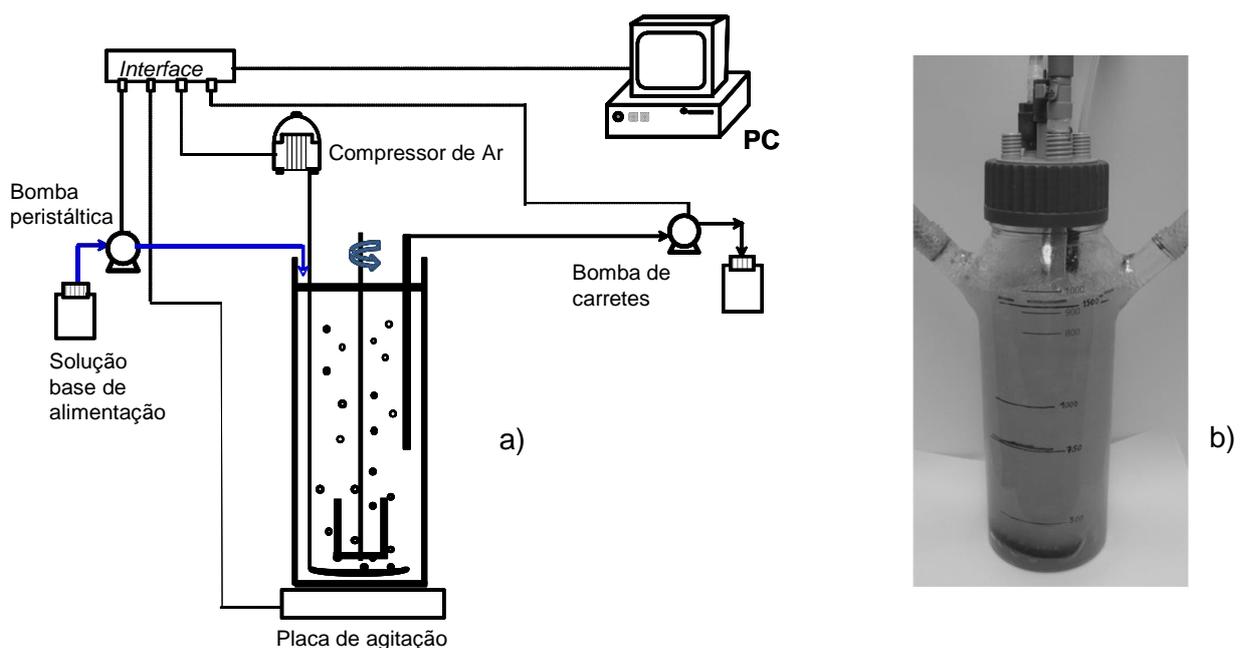


Figura 5.1 - Apresentação do SBR não tubular utilizado; a) esquema do sistema reacional; b) fotografia do reator em fase reacional com arejamento.

O reator foi operado com um ciclo de 6 h, compreendendo 5 h de reação aeróbia (com arejamento), e 1 h repartida entre o enchimento, sedimentação, descarga e espera (*idle*). O tempo de enchimento (sem agitação e sem arejamento) foi fixado em 15 minutos e o tempo de descarga em 1 minuto (descarga rápida). O valor da renovação de volume por ciclo foi de 50%, sendo o efluente removido a meia altura do volume útil do reator, o que corresponde a um tempo retenção hidráulico (HRT) de 12 h. A carga orgânica volumétrica alimentada foi de 1,5 e 2,0 kgCOD/(m³.d) (ou kgO₂/(m³.d)) nos dias operacionais 1-63 e 64-96, respetivamente. O pH não foi controlado, mas foi mantido entre 6.2 e 6.8 pela presença do tampão fosfato na solução de alimentação base. O reator foi operado à temperatura ambiente média de 23°C (entre 21 e 26°C). A remoção deliberada de biomassa do reator foi limitada às necessidades de amostragem, sendo que a maior perda ocorreu nas descargas do efluente tratado.

O ensaio de re-arranque com os grânulos armazenados a 4°C e a 25°C (segunda experiência) foi realizado adicionando ao sistema experimental mais um reator igual ao da Figura 5.1, uma bomba peristáltica (alimentação), uma placa de agitação magnética e uma membrana difusora, todas idênticas às acima descritas. Os reatores foram operados em paralelo utilizando o restante equipamento em comum (compressor de arejamento, bomba de descarga, interface e PC). Os reatores foram identificados de acordo com a temperatura de armazenamento dos inóculos: SBR1 (4°C) e SBR2 (25°C).

5.3.3 Métodos Analíticos

O teor de oxigénio dissolvido e a temperatura foram medidos *in situ*. Os restantes parâmetros foram medidos em amostras recolhidas nos reatores. Para as determinações da carência química de oxigénio (COD), concentração de iões e pH, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 4000 r.p.m. e as medições efetuadas no sobrenadante.

Os **sólidos suspensos totais** (TSS) e os sólidos suspensos voláteis (VSS) foram medidos através métodos normalizados (APHA 1998) em amostras de licor misto retiradas dos biorreatores e em amostras do efluente descarregado. O índice de volume de lamas (SVI) foi determinado pelo volume ocupado pela lama sedimentada de 1 L de licor misto, após sedimentação de 5 min (SVI₅) e 30 min (SVI₃₀); esta medição foi efetuada *offline* num cone Imhoff (método APHA 1998) e a totalidade da amostra de licor misto foi prontamente retornada ao reator.

A **velocidade de sedimentação** da biomassa foi medida a partir do tempo médio que agregados individuais levaram a percorrer uma distância definida, quando suspensos em

água da torneira numa proveta de 1 L (Muda et al. 2010, Gao et al. 2011). O valor reportado corresponde à média de 5 medidas independentes. Na fase inicial, em que a morfologia da biomassa (floculenta) não permitia a utilização do método anterior, a velocidade foi determinada pelo declive da zona linear da curva de sedimentação obtida por seguimento da deslocação da interface sobrenadante/lamas, em amostra de licor misto colocada numa proveta de 1 L (método APHA 1998).

Foram observadas amostras de biomassa em campo claro sob ampliações de 40 e 100x, num **microscópio** de transmissão de luz (BA200, Motic, China) equipado com câmara fotográfica e respetivo software de processamento de imagem (Moticam 1000, Motic, China).

A **integridade dos grânulos** (GI) foi avaliada com base no método indicado por vários autores (Tay et al. 2002a, Ghangrekar et al. 2005, Muda et al. 2010, Gao et al. 2011), em que 50 mL de licor misto foram colocados num agitador orbital a 200 r.p.m. durante 5 minutos. Foi determinada a biomassa (TSS) presente no sobrenadante após 1 minuto de sedimentação (biomassa desagregada) numa proveta de 50 mL. Este valor foi dividido pela concentração de biomassa inicial (TSS) no licor misto e a integridade dos grânulos (GI) foi expressa em percentagem de acordo com a fórmula:

$$GI (\%) = 100 \times [1 - (TSS_{\text{biomassa desagregada}} / TSS_{\text{biomassa inicial}})]$$

Para a determinação da **carência química de oxigénio** (COD) utilizou-se o método normalizado de digestão com dicromato de potássio e titulação com sulfato ferroso amoniacal (APHA 1998) utilizando um digestor AccuBlock™ Digital Dry Bath (Model: D1200) da Labnet International, Inc. (EUA).

O teor em **oxigénio dissolvido** foi medido *in situ*, utilizando uma sonda luminescente, LDO101 (Hach, EUA), ligada a um medidor multi paramétrico HQ40d (Hach, EUA) equipado com uma sonda de temperatura. As taxas de consumo de oxigénio (OUR) foram medidas durante a fase de reação aeróbia, por interrupção breve do arejamento (até 5 minutos) e registando a evolução dos valores de oxigénio dissolvido ao longo do tempo. Para isso, a sonda foi imersa no líquido (mantendo a mistura em agitação), a uma profundidade de cerca de 3 cm.

Algumas amostras foram sujeitas a análises por **cromatografia iónica** realizadas num equipamento Metrohm 761 Compact IC utilizando um amostrador automático Metrohm 788 Filter IC e uma coluna aniónica Metrosep A SUPP 5 150/4.0. O eluente consistiu numa solução a 3,2 mmol/L de Na₂CO₃ e a 1,0 mmol/L de NaHCO₃. Os iões detetados foram o brometo, cloreto, fluoreto, nitrito, nitrato, sulfato e fosfato.

Os grânulos foram observados após coloração específica aplicando o **ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain Viability Kit (V-7023)** seguindo o protocolo do fabricante (informação do produto, Molecular Probes). A única alteração consistiu na substituição da centrifugação pelo uso duma pipeta para remoção de líquido em excesso, realizando-se mais 3 lavagens que as indicadas no protocolo, por forma a não alterar a morfologia e integridade dos grânulos. As observações foram feitas num microscópio Olympus CX40, com um Olympus U-RFL-T *burner* e um U-MWB *mirror cube unit* (*excitation filter*: BP450-480; *barrier filter*: BA515). As imagens foram capturadas por uma câmara Evolution™ MP5.1 CCD colour utilizando o software Image-Pro Plus, ambos da Media Cybernetics, Inc. (EUA). As fotos foram obtidas pela investigadora C. C. C. R. de Carvalho. Este kit, de acordo com a informação do produto (Molecular Probes) permite a discriminação entre bactérias Gram positivas e Gram negativas, para além de, com base na integridade da membrana plasmática, distinguir entre bactérias viáveis e não viáveis. Estas características são visualizadas nas imagens com as seguintes cores:

- Bactérias Gram negativas: Viáveis - azul; Não viáveis - verde
- Bactérias Gram positivas: Viáveis - interior azul + exterior vermelho;
Não viáveis - interior verde + exterior vermelho.

5.3.4 Estratégia Experimental

Na Figura 5.2 encontra-se um resumo gráfico das experiências efetuadas. O primeiro período experimental (1ª experiência) teve como objetivo comprovar a possibilidade de obter a granulação aeróbia e caracterizar os grânulos desenvolvidos. O segundo período experimental (2ª experiência) foi implementado com o intuito de avaliar a possibilidade de re-arranque do sistema após um armazenamento prolongado dos grânulos anteriormente obtidos.

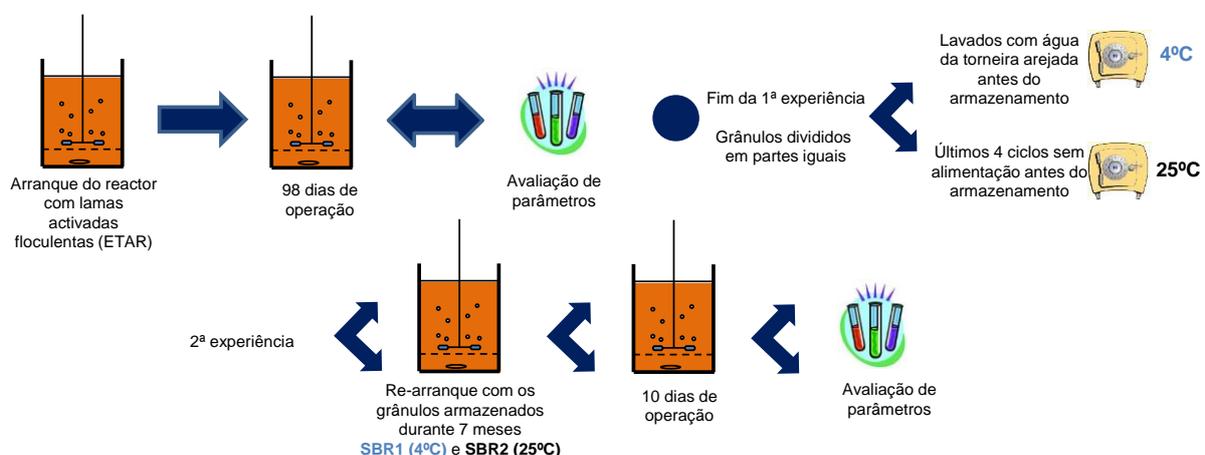


Figura 5.2 – Descrição gráfica das duas experiências efetuadas

Em ambas as experiências o reator SBR foi operado apenas com a fase reacional inteiramente aeróbia.

A **1ª experiência** decorreu durante 98 dias, que se dividiram nos períodos I, II, III e IV. Os diferentes períodos correspondem à imposição de diferentes valores de tempo de sedimentação e/ou de carga orgânica (ver Tabela 5.1).

No período I, o reator foi inoculado e operado inicialmente com um tempo de sedimentação de 40 minutos para minimizar a perda de biomassa durante a sua adaptação ao substrato. O tempo de sedimentação foi reduzido para 10 minutos no dia 6, e para 5 minutos no dia 10. O período II iniciou-se com a redução do tempo de sedimentação para 3 minutos no dia 18, e o período III com nova redução, para 2 minutos, no dia 26. O período IV foi operado de novo com um valor de 3 minutos a partir do dia 64. No mesmo dia 64, alterou-se também a carga orgânica alimentada de 1,5 para 2,0 kgCOD/(m³.d) e o sistema manteve-se nestas condições até ao último dia operatório da primeira experiência.

Tabela 5.1 – Resumo das condições operatórias utilizadas no SBR único durante a primeira experiência e nos SBR1 e SBR2 durante a segunda experiência.

	1ª Experiência (SBR único)				2ª Experiência	
	[I]	[II]	[III]	[IV]	SBR1 (4°C)	SBR2 (25°C)
Dias operacionais	1 a 17	18 a 25	26 a 63	64 a 98	1 a 15	1 a 10
Inóculo	Lamas floculentas				Grânulos do dia 98 (IV) armazenados 7 meses a 4°C	Grânulos do dia 98 (IV) armazenados 7 meses a 25°C
Enchimento (sem agitação, sem arejamento)	15 min				15 min	
Reação aeróbia (com agitação)	5 h				5 h	
Sedimentação	40 a 5 min	3 min	2 min	3 min	3 min	
Descarga	1 min				1 min	
Paragem (<i>idle</i>)	4 a 39 min	41 min	42 min	41 min	41 min	
Ciclo total	6 h				6h	
Carga orgânica alimentada [kgCOD/(m ³ .d)]	1,5	1,5	1,5	2,0	2,0	
Duração do período experimental (dias)	17	8	38	35	15	10

No dia 98, fim da 1ª experiência, a biomassa granular foi dividida em duas partes iguais, tendo-se armazenado uma parte com refrigeração a 4°C e a outra a 25°C numa câmara termoestabilizada, por um período de 7 meses. Na **2ª experiência** foram inoculados dois reatores com os grânulos armazenados, respetivamente o SBR1 (4°C) e o SBR2 (25°C), que foram subsequentemente operados nas mesmas condições utilizadas no período IV, como se encontra descrito na Tabela 5.1, tendo o primeiro sido operado por 15 dias e o segundo por 10 dias.

(intencionalmente em branco)

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Primeira experiência - Propriedades de sedimentação, concentração da biomassa e morfologia da biomassa

A estratégia experimental escolhida para a operação do reator baseou-se nas informações disponíveis na literatura sobre os parâmetros que induzem a granulação, designadamente, um tempo de sedimentação curto (Morgenroth et al. 1997, Heijnen e van Loosdrecht 1998, Beun et al. 1999, Tay et al. 2001b, Liu e Fang 2003, Liu e Tay 2004, de Kreuk et al. 2007), uma tensão de corte elevada (Heijnen e van Loosdrecht 1998, Tay et al. 2001a, Liu e Tay 2004, de Kreuk et al. 2007, Lopez et al. 2012), aqui obtida por imposição da taxa de arejamento a 2 v.v.m., um valor baixo de tempo de retenção hidráulico (Morgenroth et al. 1997, Beun et al. 1999, Liu e Tay 2004), neste caso de 12 h, um valor relativamente elevado de carga orgânica alimentada (de Kreuk e van Loosdrecht 2006, Van Loosdrecht e de Kreuk 2006, Liu 2008), aqui imposto a 1,5 e subsequentemente aumentado para 2,0 kgCOD/(m³.d) e operação em regime de fatura/fome (Morgenroth et al. 1997, Beun et al. 2000a, Beun et al. 2001, Tay et al. 2001b, de Kreuk e van Loosdrecht 2004, McSwain et al. 2004, de Kreuk et al. 2005c), que deverá neste sistema, resultar do regime de alimentação descontínua do SBR, acentuado pelo facto da fase arejada ser longa (5 h) e mantida sob um teor elevado de O₂ dissolvido, perto da saturação.

O arranque do SBR foi feito com um inóculo floculento de lamas ativadas e durante os primeiros 6 dias do **período I** o reator foi operado com vista à adaptação da biomassa ao substrato, utilizando-se por isso um tempo de sedimentação elevado com vista à minimização da perda de biomassa. No entanto, como se pode ver na Figura 5.3 e Figura 5.4, devido ao valor de SVI inicial ser muito elevado mesmo para uma biomassa floculenta, ocorreu uma perda significativa de lamas na primeira descarga do efluente (TSS a cerca de 1,5 g/L).

O tempo de sedimentação foi sendo progressivamente reduzido ao longo do tempo da experiência, pois este parâmetro é essencial na indução da granulação (Morgenroth et al. 1997, Heijnen e van Loosdrecht 1998, Beun et al. 1999, Tay et al. 2001a, Liu e Fang 2003, Liu e Tay 2004, de Kreuk et al. 2007). Pretendeu-se chegar a um tempo de sedimentação suficientemente curto para que restasse no reator apenas a biomassa com uma velocidade de sedimentação de pelo menos 10 m/h, preferencialmente de 15 m/h, como aconselhado por Heijnen e van Loosdrecht (1998) para a obtenção de grânulos.

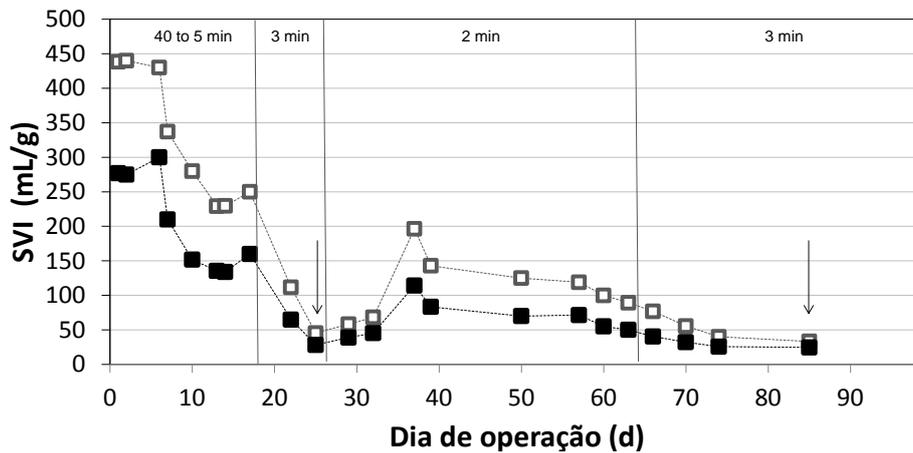


Figura 5.3 – Valores de índice de volume de lamas (SVI) medidos ao longo do tempo de operação do SBR durante a primeira experiência: ■ SVI₃₀, □ SVI₅. As setas representam os valores de SVI mais baixos obtidos durante esta fase experimental. São também indicados os valores de tempo de sedimentação impostos em cada período.

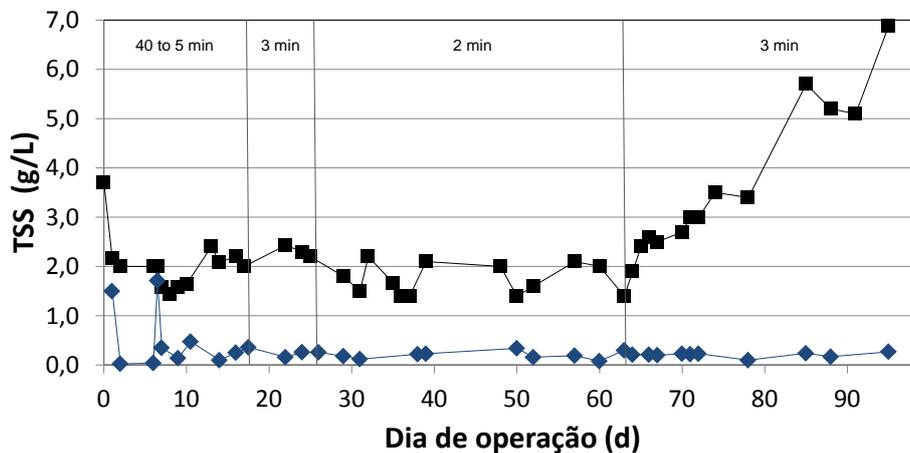


Figura 5.4 - Valores de sólidos suspensos totais (TSS) ao longo do tempo de operação do SBR durante a primeira experiência: ■ licor misto, ◆ efluente. São também indicados os valores de tempo de sedimentação impostos em cada período.

No dia 6 reduziu-se o tempo de sedimentação para 10 minutos ocorrendo ainda uma perda elevada de biomassa. Subsequentemente, as reduções do tempo de sedimentação foram efetuadas após observação visual da capacidade de sedimentação da biomassa, evitando-se assim perdas significativas no efluente (ver Figura 5.4). Foi este o caso da diminuição do tempo de sedimentação para 5 minutos no dia 10. O valor médio estimado para a idade de lamas nesta fase foi de 3 dias.

Verificou-se que, a partir do dia 6, com a diminuição progressiva do tempo de sedimentação para 10 e posteriormente para 5 minutos, o valor de SVI diminuiu rapidamente de 300 (dia 6) para 134 mL/g (dia 14).

No período II, após a redução do tempo de sedimentação para 3 minutos no dia 18, observou-se, passados poucos dias (dia 22) uma diminuição drástica nos valores de SVI, para níveis muito abaixo dos usuais em lamas ativadas flocculentas, o que indica que ocorreu uma alteração da morfologia da biomassa. De facto, no dia 25 o SVI₃₀ atingiu o valor de 28 mL/g, concomitantemente com a aproximação dos valores de SVI₅ e SVI₃₀, uma importante confirmação da extraordinária rapidez de sedimentação apenas reportada para biomassa granular (Schwarzenbeck et al. 2004). Estes valores são indicados com uma primeira seta na Figura 5.3. A idade de lamas média no período II foi estimada em 4 dias.

Acompanhando a redução nos valores de SVI, a **velocidade de sedimentação** da biomassa aumentou como se pode ver na Tabela 5.2, atingindo o valor 14,9 m/h no dia 25 (período II), confirmando o desenvolvimento de grânulos aeróbios (Heijnen e van Loosdrecht, 1998).

Tabela 5.2- Velocidade de sedimentação da biomassa ao longo do período operacional

Dia [período]	Velocidade de sedimentação (m/h)
10 [I]	3,5
17 [II]	4,3
25 [III]	14,9
74 [IV]	14,2

No que respeita ao resultados obtidos para a evolução do SVI, à dimensão dos grânulos e ao número de dias necessários para obter a granulação, esta primeira experiência está de acordo com o reportado por outros investigadores para diferentes substratos (de Kreuk et al. 2005a, Swarzenbeck et al. 2005, de Kreuk e van Loosdrecht 2006, Wang et al. 2007, Figueroa et al. 2011, Rosman et al. 2013) (ver Tabela 3.1). Estes investigadores, partindo de inóculo flocculento obtiveram os primeiros grânulos entre os dias de operação 10 a 39, com valores de SVI₃₀ de 22 a 50 mL/g. Nesta primeira experiência, o período de 25 dias necessário para se obter a granulação e o valor de SVI₃₀ de 28 mL/g obtido, estão assim ao nível dos resultados obtidos em reatores tubulares, o que é notável. Também López Palau et al. (2009) reportaram o sucesso da granulação num reator com um valor da razão H/D baixo (3/1) alimentado com acetato, mas em condições de carga orgânica muito diferentes das utilizadas pela generalidade dos investigadores, cerca de quinze vezes superiores aos níveis utilizados no presente estudo.

Após o período II, a redução do tempo de sedimentação para 2 minutos no **período III** deteriorou as propriedades de sedimentação da biomassa, com o valor de SVI₃₀ a atingir níveis acima de 100 mL/g. Apesar da tendência de redução dos valores deste parâmetro ainda observada no decorrer deste período, não se conseguiu promover a acumulação de

biomassa. A concentração desta manteve-se durante todo o período à volta de 2 g/L ou menos. O sistema manteve uma idade de lamas média de 4 dias. Aparentemente, para esta configuração de reator o tempo de sedimentação de 2 minutos revela-se demasiado baixo, provocando instabilidade no sistema.

O retorno ao tempo de sedimentação de 3 minutos no **período IV** reforçou as tendências de restabelecimento de uma gama de valores de SVI_{30} baixos e de aproximação dos valores de SVI_{30} e SVI_5 . Tão ou mais importante, o regime operacional deste período permitiu a acumulação de biomassa no reator, elevando seu teor de 2 para 7 g/L como se pode ver na Figura 5.4. É de realçar que neste período o teor de sólidos no efluente apresentou um valor médio de 220 mg/L, ou seja, manteve-se estável relativamente aos valores de períodos anteriores apesar da concentração de biomassa no licor misto ter mais do que triplicado. A idade de lamas média neste período IV foi de 6 dias, mas na sua fase final, com o sistema estabilizado, a idade de lamas atingiu os 9 dias (dias 85 a 98 com 5 a 7 g/L). Naturalmente foi também nesta última fase que se obteve o melhor SVI_{30} de toda a experiência, 25 mL/g, que se encontra destacado na Figura 5.3 com uma segunda seta. Tendo em conta que os sistemas granulares usualmente operam com concentrações de biomassa acima dos 10 g/L, tal significa que se o teor de biomassa no efluente se puder manter nos valores observados nesta primeira experiência, este reator poderá operar a um valor de idade de lamas superior a 20 dias, permitindo o desenvolvimento de uma gama mais larga de tipos de populações bacterianas.

Exemplos típicos de imagens obtidas por **microscopia** encontram-se na Figura 5.5 onde se pode ver o inóculo floculento inicial e a biomassa agregada obtida no dia 25 (período II) e no dia 68 (período IV), ambas com uma concentração no licor misto um pouco acima de 2 g/L. Verifica-se que se obtiveram grânulos com a dimensão aproximada de 0,7 mm. A dimensão dos grânulos está um pouco abaixo da gama reportada por vários autores, que se situa entre 1 e 2,5 mm após tempos de operação entre 20 e 39 dias (de Kreuk et al. 2005a, Swarzenbeck et al. 2005, de Kreuk e van Loosdrecht 2006, Wang et al. 2007, Figueroa et al. 2011, Rosman et al. 2013). Uma explicação para a menor dimensão dos grânulos na presente experiência pode ser a configuração não tubular do reator (menor pressão seletiva) e a existência de agitação por turbina (200 r.p.m.) durante as 5 h de reação. De acordo com de Kreuk e van Loosdrecht (2004) a agitação mecânica pode danificar os grânulos. De facto, os investigadores que estudaram a dimensão dos grânulos num reator também com agitação de 200 r.p.m. e um H/D relativamente baixo de 5,5 (Yilmaz et al. 2008, Verawaty et al. 2013) confirmam a hipótese anterior. Estes estudos indicam que, partindo de inóculos granulares de diferentes dimensões (0,425 a 1,125 mm) após 50 dias de operação os grânulos estabelecidos apresentam todos um tamanho uniforme de 0,6 a 0,8 mm (Verawaty et al. 2013). Ainda assim, é possível que estes grânulos apesar das suas menores

dimensões, possuam todas as características físicas e biológicas dos grânulos de maiores dimensões, pois de acordo com Lemaire et al. (2008), o oxigénio penetra até cerca de 250 μm abaixo da superfície dos grânulos durante o período de arejamento, o que num grânulo de 0,7 mm permite a existência de um núcleo anóxico ou anaeróbio de cerca de 200 μm de diâmetro.

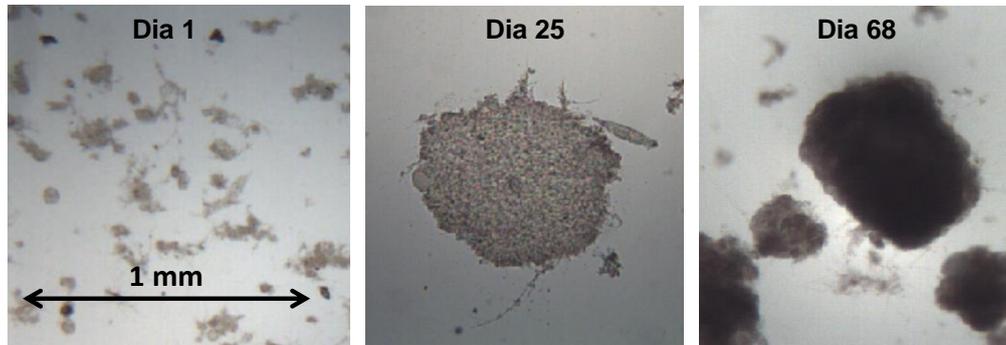


Figura 5.5 – Exemplos típicos de imagens, observadas por microscopia óptica, da biomassa do reactor em vários dias de operação: dia 1 (período I), dia 25 (período II), dia 68 (período IV).

Os grânulos obtidos apresentam por outro lado uma boa integridade como era de esperar dado o ambiente de *stress* em termos de agitação mecânica em que foram cultivados. Esta foi medida no período IV obtendo-se para o **coeficiente de integridade** um valor médio de 85% (ver Tabela 5.5).

Tay et al. (2002a) reportaram valores mais elevados de coeficiente de integridade, de 97 e 98%, para grânulos desenvolvidos na presença de glucose e acetato, respetivamente, num reator tubular ($H/D=24$). É de referir, contudo, que o valor um pouco mais baixo obtido neste estudo pode não ter a ver com a integridade dos grânulos formados mas com uma inadequação do teste à análise de amostras com teores diferentes de biomassa não agregada. A configuração não tubular do reator usado no presente estudo pela menor pressão seletiva aplicada permite mais facilmente a existência de biomassa não agregada. Esta é quantificada no teste de integridade como proveniente da desintegração dos grânulos. De facto, quando os resultados do teste foram re-examinados e foi descontada a contribuição da biomassa presente no sobrenadante numa amostra antes de ser sujeita a agitação, os valores obtidos foram $>95\%$ o que parece denotar a grande robustez dos grânulos formados.

No período IV os grânulos foram observados através da coloração **Red⁺ Bacterial Gram Stain and Viability Kit** e alguns resultados representativos são apresentados na Figura 5.6. Verificou-se que a biomassa era maioritariamente constituída por bactérias Gram negativas viáveis (cor azul) e algumas bactérias Gram negativas não viáveis (cor verde). Observa-se

ainda nas imagens alguns pontos de cor vermelha/laranja correspondentes a bactérias Gram positivas (ver imagem A). Neste caso não se efetuou a análise quantitativa do grau de viabilidade, mas a informação qualitativa obtida apenas pela observação das imagens parece estar na mesma ordem de grandeza dos valores reportados por outros investigadores, que são de 80, 92 e 90% (Zeng et al. 2007, Wan et al. 2014a, Wan et al. 2014b) respetivamente.

Relativamente às bactérias Gram positivas a observação de várias imagens (colhidas em diferentes dias) revelou que estas bactérias estavam confinadas a uma morfologia específica e na forma de agregados. Ainda na imagem A encontra-se uma ampliação mostrando que os aglomerados parecem ser quartetos de cocos (*coccus*). É possível que estas bactérias sejam do grupo G-bacteria Gram positivas, nomeadamente PAO do género *Tetrasphaera*, como sugerido por Moreira et al. (2011) num estudo em SBR alimentado com a mesma fonte de carbono, operado em regime anaeróbio/aeróbio com lamas ativadas floculentas. O regime fome/fartura imposto pelo ciclo do SBR permite a presença de PAO (Barnard 1975), e a presença de fosfatos em concentração elevada na alimentação desta experiência (700 ppm, ver Tabela 5.3) reforça esta hipótese.

No entanto não se observa uma quantidade elevada de PAO, provavelmente porque a fase de fartura anaeróbia existe apenas por um período muito curto na fase de enchimento, dado que a alimentação é realizada no topo do reator, não permitindo um contacto eficiente entre o substrato e as bactérias. A fase de fome corresponde às últimas 4 h aeróbias do ciclo. É de realçar que o género *Tetrasphaera* tem sido identificado em alguns estudos como o género dominante da comunidade PAO em sistemas de lamas ativadas (Eschenhagen et al. 2003, Kong et al. 2005) e para além disso parece ser capaz de fermentar glucose (Kong et al. 2005, Kristiansen et al. 2013), o que sugere que esta proposta de identificação é razoável.

Na Figura 5.6 a imagem C é interessante pois nela podem ver-se nitidamente as bactérias imersas numa matriz escura, não corada pelo *kit*. Esta massa escura parece corresponder ao material polimérico extracelular (EPS) que é produzido pelas bactérias e que constitui a estrutura de suporte dos grânulos (Liu e Tay 2004). De acordo com os dados apresentados por Adav e Lee (2008) os grânulos aeróbios contêm cerca de 60% de EPS em base seca (ver pag. 61), o que está de acordo com o observado nesta imagem em que o EPS aparentemente ocupa uma área significativa na imagem do grânulo.

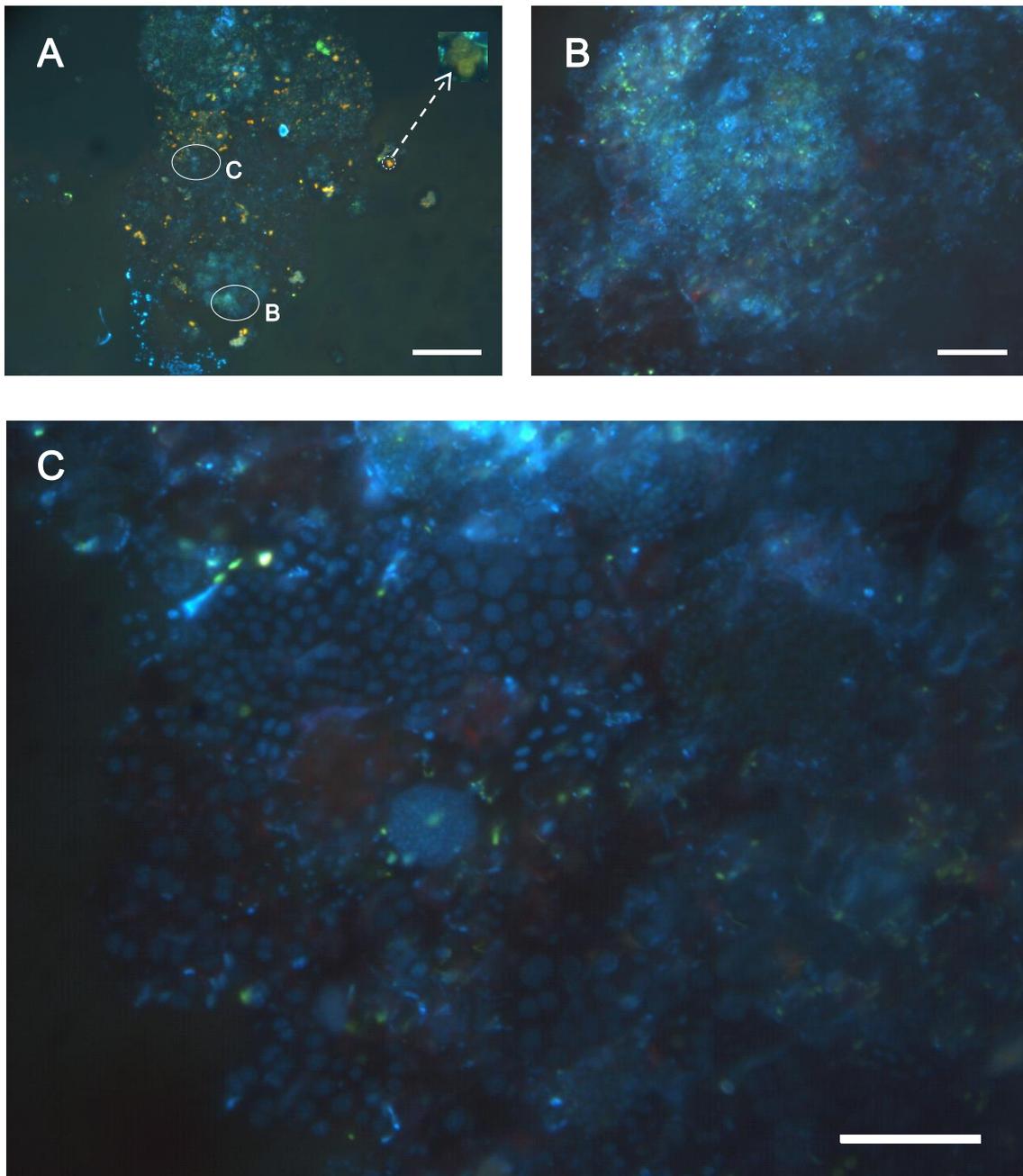


Figura 5.6 Imagens representativas dos resultados da aplicação do *ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability Kit* à amostra do dia de operação 98 (fotos de C.C.C.R. de Carvalho). A barra corresponde a 100 μm em A e a 10 μm em B e C. B e C são ampliações das zonas indicadas em A. A figura C é representativa da composição da superfície exterior dos grânulos observada em várias amostras. Bactérias Gram positivas: viáveis - azul, não viáveis - verde; Bactérias Gram Positivas: viáveis - interior azul + exterior vermelho, não viáveis - interior verde + exterior vermelho.

Em resumo, na última fase do período IV foi estabelecido com sucesso um processo granular aeróbio estável neste SBR não tubular e mecanicamente agitado. Ao longo deste período o teor de sólidos no efluente manteve-se também estável e houve acumulação de biomassa no licor misto, o que significa que o reator pode ser levado a operar a um valor

elevado de idade de lamas caso tal seja pretendido. Ficou demonstrada a importância do ajuste do parâmetro tempo de sedimentação, que como descrito na literatura, se for demasiado elevado não promove a granulação, e se for demasiado baixo destabiliza o sistema, não permitindo a desejável acumulação de biomassa no reator.

Que seja do conhecimento da autora, esta é experiência em que foi utilizado com sucesso para a granulação aeróbia o reator SBR com o menor valor da razão H/D (2,5), ou seja, um reator não tubular. Os reatores utilizados pela maioria dos estudos reportados têm valores de H/D mais elevados, de 5,5 a 30 (Tay et al. 2005, de Kreuk et al. 2005a, Swarzenbeck et al. 2005, Wang et al. 2007, Figueroa et al. 2011, Rosman et al. 2013, Wan et al. 2014b). Liu et al. (2008) refere que uma razão H/D elevada assegura uma trajetória circular no movimento dos agregados de microrganismos, que provoca um atrito hidráulico efetivo sobre estes, melhora a transferência de oxigénio e permite uma seleção mais facilitada da velocidade de sedimentação mínima da biomassa. No entanto, a geometria em coluna pode não ser uma geometria fácil de implantar à escala real. Daí o interesse desta investigação que utiliza um SBR cujo *scale up* para a dimensão dum reator para unidades industriais de pequena e média dimensão poderá ser mais direto. Evita também os custos acrescidos da implementação dum sistema do tipo *Nereda*[®], que necessita de um investimento extra nos difusores de fundo e de uma configuração com descarga a várias alturas, com a consequente complexidade de utilização em fases diferenciadas do ciclo.

5.4.2 Primeira experiência - Eficiência do tratamento

A evolução da remoção da carência química de oxigénio (COD) ao longo do ciclo em vários dias representativos da primeira experiência, bem como os correspondentes perfis, podem ser observados na Figura 5.7. A taxa de remoção aumentou ao longo do tempo de operação, por exemplo, no dia 24 obteve-se uma remoção de COD de 65% na primeira hora de reação aeróbia enquanto no período IV este valor aumentou para 80%. A maioria dos investigadores considera necessária a existência de um regime de fartura/fome para a obtenção de uma granulação aeróbia estável, independentemente de o ciclo ser totalmente aeróbio ou incluir uma fase anaeróbia inicial (Morgenroth et al. 1997, Beun et al. 2000a, Beun et al. 2001, Tay et al. 2001b, de Kreuk e van Loosdrecht 2004, McSwain et al. 2004, de Kreuk et al. 2005c) e que o regime de fome prolongado é benéfico para a estabilidade dos grânulos (Liu et al. 2007). López-Palau et al. (2012) referem que para um tratamento otimizado de efluentes da indústria vinícola por grânulos aeróbios deve existir um período de fome duas vezes mais prolongado que o período de abundância, no sistema totalmente aeróbio utilizado por estes investigadores. Nesta primeira experiência, em especial na fase mais estável que constituiu o período IV, observou-se de facto um regime de fartura na primeira hora de reação podendo considerar-se que nas quatro horas seguintes de reação a biomassa se encontrava em regime de fome.

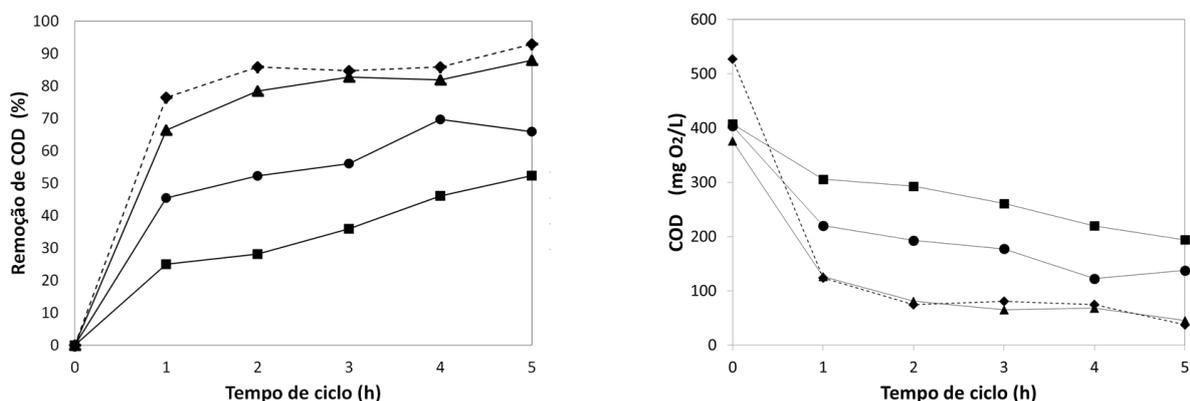


Figura 5.7– Representação da evolução do rendimento de remoção de COD e do respetivo teor no licor misto ao longo do ciclo SBR em dias seleccionados: ■ dia 2, ● dia 6, ▲ dia 24, ◆ dia 87. As linhas contínuas e tracejadas indicam ciclos sob valores de carga orgânica alimentada de 1,5 e de 2,0 kgCOD/(m³.d), respetivamente.

A qualidade do efluente foi consistentemente boa no que respeita à remoção de COD, sendo que a partir do dia de operação 6 o teor de COD foi sempre abaixo de 150 mgO₂/L

(legislados no DL-236/98 como máximo para a descarga de águas tratadas no meio hídrico - ver Tabela 2.8). No período IV, obteve-se uma excelente qualidade no efluente com um COD médio de 65 mgO₂/L, que corresponde a uma de remoção média de 88%, atingindo-se um valor de 40 mgO₂/L no dia 87. A remoção de COD obtida para este substrato é mais elevada do que a obtida em estudos anteriores do mesmo grupo de investigação, que foi de cerca de 80%, em SBR anaeróbio/aeróbio com lamas ativadas floculentas, operado com ciclos de 24 horas, das quais 8 h ou mais operadas em aerobiose (Lourenço et al., 2001, 2003, 2006) o que denota a grande eficiência do tratamento por grânulos aeróbios.

É de realçar, que se o cálculo for realizado com base nos teores de COD na água residual sintética alimentada a eficiência de remoção de COD é mais elevada, correspondendo a uma remoção média no período IV de 94%. Ainda assim este valor é um pouco abaixo dos níveis de remoção usualmente obtidos para glucose, que apresenta valores normalmente mais próximos de 100%, sendo por exemplo de 97% num estudo com grânulos aeróbios reportado por Tay et al. (2002a). Tal pode dever-se a impurezas presentes no produto comercial Emsize E1.

Verifica-se ainda, observando a Figura 5.8 que não há uma relação direta entre a carga de COD removida por unidade de biomassa e o rendimento global de remoção de COD, em particular no período final em que se conseguiu a acumulação de biomassa no sistema. Tal indica que o sistema, na situação final, provavelmente conseguiria remover cargas mais elevadas com eficiência comparável. A carga média de COD removida em todo o período de operação foi próxima de $\approx 0,6$ KgCOD/(kgVSS.d).

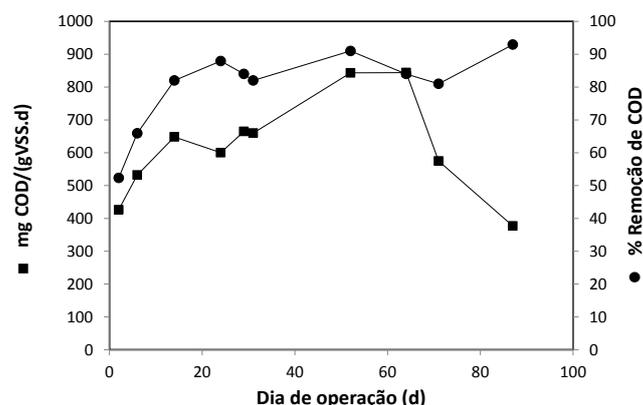


Figura 5.8 – Valores de carga de COD removida por unidade de massa de biomassa no licor misto e de rendimento de remoção de COD ao longo do período da primeira experiência.

Sendo o COD exaurido nas primeiras 1 a 2 h do ciclo, é de referir que poderia ter ocorrido nitrificação. Contudo, tal não se verificou devido à composição da alimentação que apresentou valores das razões mássicas COD/N/P de 100/5,0/40 (até dia 64) e de 100/3,7/30 (dias 64 a 98), correspondendo a uma situação em que o azoto amoniacal não está em excesso. A análise por **cromatografia iónica** efetuada ao efluente do SBR no dia 52, cujos resultados se encontram na Tabela 5.3, confirma a ausência de nitrato no efluente.

Tabela 5.3 – Resultados da análise por cromatografia iónica realizada a uma amostra do efluente do SBR no dia 52 e valores estimados para o conteúdo em aniões da alimentação.

	Cloreto mgCl/L	Nitrito mgNO ₂ ⁻ /L	Nitrato mgNO ₃ ⁻ /L	Fosfato mgPO ₄ ³⁻ /L	Sulfato mgSO ₄ ²⁻ /L
Alimentação (valores estimados)	360	0	0	754	18
Efluente SBR dia 52 (III)	450	não detetado	não detetado	720	150

Os valores medidos por cromatografia iónica no efluente são concordantes com os valores presentes na alimentação, no pressuposto de não ter ocorrido consumo significativo dos aniões analisados. Apenas o sulfato apresenta um valor mais elevado do que o esperado, que pode dever-se à sua presença na água da torneira usada na preparação da alimentação, uma vez que este valor pode atingir um máximo de 250 mgSO₄²⁻/L na água de consumo segundo o Decreto-Lei 306/2007.

O valor da **taxa específica de consumo de oxigénio (SOUR)** tem relação direta com a taxa metabólica em biomassa aeróbia (Vollertsen et al. 2001) e pode ser utilizado para avaliar a taxa de biodegradação de um substrato, estimar a evolução da concentração de um substrato biodegradável ao longo de um ciclo reacional, ou avaliar a bioatividade da biomassa sujeita a diferentes condições (por exemplo, inibidores) na presença do mesmo substrato. Na Tabela 5.4 encontram-se os valores de SOUR medidos ao longo da fase reacional aeróbia em alguns dos ciclos do período IV.

Verifica-se, como era de esperar, que os valores de SOUR diminuem ao longo da fase reacional aeróbia, devido ao esgotamento da fonte de carbono. O valor médio das medidas no período IV foi de 55 mgO₂/(gMLVSS.h) no início do arejamento e de 9 mgO₂/(gMLVSS.h) no fim da fase reacional aeróbia.

Tabela 5.4 - Valores da taxa específica de consumo de oxigênio (SOUR) medidos em vários momentos ao longo de alguns dos ciclos no período IV da 1ª experiência. São também indicados alguns valores retirados da bibliografia publicada sobre granulação aeróbia.

	SOUR [mgO ₂ /(gMLVSS.h)]		
	Início do arejamento	Após 1h de arejamento	Fim do arejamento (5h)
Dia de operação do SBR			
66	55	23	9
67	56	25	10
71	52	---	9
72	54	20	8
Média	55	23	9
Desvio padrão	2	3	1
Valores da bibliografia			
Tay et al 2002a	56 ⁽¹⁾ , 69 ⁽²⁾		
Muda et al. 2010	51 ⁽³⁾		

⁽¹⁾acetato ⁽²⁾glucose ⁽³⁾glucose+acetato+etanol+corantes ⁽⁴⁾acetato/propionato (3:1)

Os valores de SOUR obtidos para os grânulos são comparáveis aos das lamas ativadas convencionais que apresentam um valor típico de 60 mgO₂/(gMLVSS.h) (Tay et al. 2002a). Relativamente aos valores de SOUR obtidos noutros estudos com grânulos aeróbios, o valor médio do período IV está um pouco abaixo dos valores obtidos por Tay et al. (2002a) na presença de glucose e próximo do obtido com acetato, bem como próximo dos valores reportados por Muda et al. (2010) na presença duma mistura de fontes de carbono (glucose+acetato+etanol). Tal pode eventualmente significar que a fonte de carbono utilizada, um derivado de amido hidrolisado, não é tão facilmente assimilada como a glucose, o que é concordante com os menores valores de remoção de COD (ver pág. 120) para este substrato.

5.4.3 Segunda experiência - Propriedades de sedimentação, concentração e morfologia da biomassa

Como referido no capítulo 5.3, os grânulos aeróbios desenvolvidos durante a primeira experiência foram armazenados durante 7 meses a dois valores de temperatura, 4 e 25°C.

Com o objetivo de estudar a capacidade de recuperação dos grânulos após este longo período de armazenamento, uma característica importante para sistemas de tratamento de águas residuais em indústrias em que ocorrem paragens na produção, foram inoculados dois reatores, o SBR1 (inóculo armazenado a 4°C) e o SBR2 (inóculo armazenado a 25°C) e operados nas mesmas condições do período IV da experiência anterior (ver Tabela 5.1).

Como se pode ver na Figura 5.9, houve uma perda significativa de biomassa no dia 1 em ambos os reatores, como resultado do efeito de *washout* da biomassa desagregada promovido pelo tempo de sedimentação reduzido (3 min). Observa-se que a perda de biomassa sofrida pelo SBR2 que recebeu o inóculo armazenado a 25°C (SBR2) foi mais do dobro da sofrida pelo SBR1, que recebeu o inóculo armazenado a 4°C, indicando que ocorreu naquele um maior grau de desagregação como consequência do armazenamento. Seguiu-se uma rápida recuperação dos níveis de TSS em ambos os reatores imediatamente depois do dia 1. Relativamente aos níveis de TSS no efluente decantado, estes evoluíram positivamente atingindo valores de 170 e 140 mg/L no SBR1 (4°C) e no SBR2 (25°C), respetivamente, que são equivalentes aos obtidos na primeira experiência.

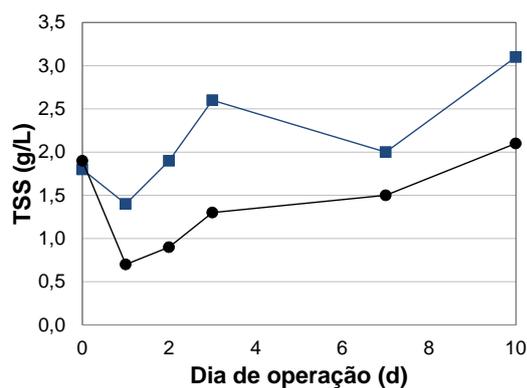


Figura 5.9 - Valores de TSS medidos no licor misto dos reatores SBR ao longo do tempo operacional durante a 2ª experiência:

- SBR1 (inóculo armazenado a 4°C)
- SBR2 (inóculo armazenado a 25°C)

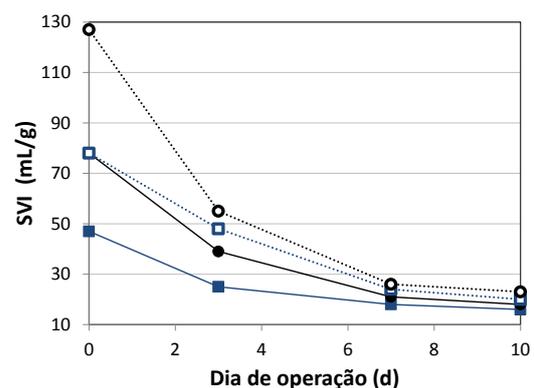


Figura 5.10 - Valores de SVI medidos na biomassa dos reatores SBR ao longo do tempo operacional durante a 2ª experiência:

- SVI₃₀ (SBR1), ● SVI₃₀ (SBR2)
- SVI₅ (SBR1), ○ SVI₅ (SBR2)

As propriedades de sedimentação da biomassa também melhoraram rapidamente como se constata pela Figura 5.10, sendo atingidos no dia 7 valores de SVI_{30} e SVI_5 baixos e próximos entre si, comparáveis aos obtidos na primeira experiência. Também aqui os grânulos armazenados a 4°C tiveram um melhor desempenho de recuperação que os armazenados a 25°C, sendo que no dia 10 já não se observavam diferenças significativas entre a capacidade de sedimentação das biomassas nos dois reatores.

Foram realizadas **observações microscópicas** a amostras de biomassa, sendo algumas imagens típicas apresentadas na Figura 5.11. O armazenamento a 4°C preservou claramente melhor a estrutura dos grânulos, tendo a temperatura de 25°C levado a uma elevada desintegração dos mesmos. No entanto, após o re-arranque dos dois SBR verificou-se, logo ao dia 10, como indicado também pelos resultados de SVI, uma recuperação total da estrutura granular e não se observam diferenças morfológicas significativas entre as biomassas dos dois reatores.

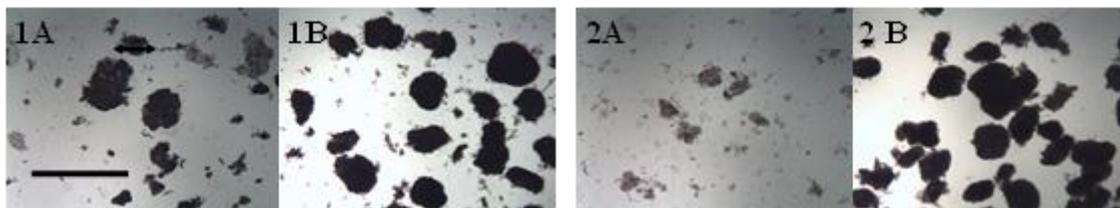


Figura 5.11 Imagens representativas de observações de microscopia óptica da biomassa nos SBR durante a segunda experiência. A escala corresponde a 1mm. 1A: SBR1 (armazenamento a 4°C), dia 0 (inóculo); 1B: SBR1, dia 10; 2A: SBR2 (armazenamento a 25°C), dia 0 (inóculo); 2B: SBR2, dia 10.

As indicações fornecidas pelos valores de **coeficiente de integridade** medidos nos grânulos, cujos resultados se encontram na Tabela 5.5, corroboram as observações microscópicas. A biomassa apresenta valores de 26 e 15% para o dia 0, e de 85 e 74% para o dia 10, nos reatores inoculados com biomassa armazenada a 4 e 25°C, respectivamente. Estes valores denotam a rápida recuperação da integridade dos grânulos, sendo que os valores do dia 10 são iguais ou próximos dos apresentados pela biomassa antes do armazenamento (1ª Experiência, período IV). Outros autores indicam também que após armazenagem prolongada a várias temperaturas a integridade de grânulos aeróbios após reativação em SBR foi recuperada em 4 a 16 dias (Tay et al. 2002a, Zeng et al. 2007, Wang et al. 2008, Gao et al. 2012, Wan et al. 2014a, Wan et al. 2014b).

Gao et al. (2012) estudaram o efeito da armazenagem de grânulos aeróbios durante 8 meses e indicam valores bastante diferentes dos obtidos no presente estudo. Nomeadamente, reportam apenas um pequeno abaixamento do coeficiente de integridade de 100% (inicial) para 89 e 86% nos grânulos armazenados a 4°C e à temperatura ambiente

respetivamente (ambos armazenados em água destilada). Contudo, também reportam, como sucedeu no presente estudo (ver Figura 5.10), uma deterioração substancial nos valores de SVI₃₀ com os iniciais 29 mL/g a passarem para 94 e 170 mL/g (armazenamentos a 4°C e à temperatura ambiente, respetivamente). Wang et al. (2008) também indicam que a dimensão, estrutura e integridade de grânulos aeróbios foram mantidas após armazenagem (7 meses, 4°C), mas que se observaram cavidades nos mesmos (por microscopia SEM) e a sua velocidade de sedimentação diminuiu.

Tabela 5.5 - Valores medidos para o coeficiente de integridade de grânulos de biomassa em alguns dias do período operacional da primeira experiência, e na segunda experiência após armazenamento prolongado durante 7 meses a 4 e 25°C (dia 0 e dia 10).

Dia		Coeficiente de integridade (%)	
1ª experiência	dia de operação	SBR único	
	dia 74	85	
	dia 91	87	
	dia 96	82	
	Média	85	
	Desvio padrão	3	
2ª experiência	dia de operação	SBR1 (4°C)	SBR2 (25°C)
	dia 0 (inóculo)	26	15
	dia 10	85	74

A razão para a desintegração dos grânulos após armazenagem prolongada relaciona-se provavelmente com a atividade biológica anaeróbia, eventualmente concentrada no interior dos grânulos. Num dos estudos consultados foi observado que o teor do EPS presente nos grânulos diminuiu drasticamente após o armazenamento, para 60% do nível inicial, quando este decorreu à temperatura ambiente, e manteve-se relativamente elevado (90% do inicial) quando decorreu a 4°C (Gao et al. 2012). Também Zeng et al. (2007) observaram uma diminuição do teor em EPS nos grânulos armazenados (8 semanas, 4°C), resultando em níveis de 69 a 93% dos iniciais. O autoconsumo de 40% do EPS durante a armazenagem à temperatura ambiente (Gao et al. 2012), está de acordo com os dados de Wang et al. (2007b) que reportam que os grânulos podem degradar cerca de metade do EPS acumulado quando incubados na ausência de outra fonte de carbono exógena, mas que o restante EPS não é biodegradado. Sendo o EPS considerado o principal responsável pela estrutura da matriz de agregação celular, o seu consumo justifica a maior fragilidade dos grânulos e a conseqüente perda de integridade. A respiração endógena contribui assim de forma significativa para a destruição dos agregados (Gao et al. 2012) envolvendo também lise celular. Assim, é natural que a desintegração resultante seja tanto mais acentuada

quanto maior for o nível de atividade celular durante a armazenagem, ou seja, quanto maior for a temperatura em que esta decorre. Tal foi observado nesta 2ª experiência.

Os grânulos foram observados ao microscópico sob a coloração pelo **Red⁺ Bacterial Gram Stain and Viability Kit** e alguns exemplos representativos das imagens obtidas apresentam-se na Figura 5.. Observa-se que, mesmo após 7 meses de armazenamento (dia 0 da 2ª experiência), se encontra ainda uma significativa abundância de células viáveis (cor azul) e curiosamente não é evidente nas imagens um menor grau de viabilidade nos grânulos armazenados à temperatura ambiente (25°C). Na imagem 1b e 1c do SBR1 (4°C) observa-se que as bactérias não viáveis (verde) não surgem distribuídas indiscriminadamente em todo o grânulo mas sim concentradas em algumas zonas. Por outro lado as imagens 2b e 2c do SBR2 (25°C), na Figura 5.12, parecem indicar que os agregados de menores dimensões contêm menos células viáveis. Na literatura consultada, a quantificação da viabilidade das células em grânulos aeróbios após armazenagem apresenta resultados díspares. Seng et al. (2007) reportam valores de 3 a 15% de viabilidade após 8 semanas a 4°C, para grânulos desenvolvidos na presença de ácido ftálico como única fonte de carbono. Wan et al. (2014b) reportam 60% de viabilidade após 1 ano a 4°C, para grânulos desenvolvidos em acetato/propionato (e armazenados em água destilada). Pela observação qualitativa das imagens 1 e 2 da Figura 5.12, deduz-se que o grau de viabilidade da biomassa após 7 meses a 4°C poderá estar mais próximo do nível reportado por estes últimos autores.

Nas imagens do dia de operação 3, observam-se em ambos os reatores grânulos com zonas extensas maioritariamente viáveis (azuis). É natural que estes últimos correspondam a “biomassa nova” pois o crescimento (aumento dos TSS) a partir do dia 1 é proporcionalmente igual nos dois SBR, havendo pelo menos 46,2% de “biomassa nova” em ambos. Assim, é natural não se observarem grandes diferenças em termos de viabilidade, pelo menos cerca de 50% da biomassa é “nova” e por isso naturalmente viável.

Relativamente às bactérias Gram-positivas, estas encontram-se em ambos os reatores e a observação de várias imagens exibindo estas bactérias com cor alaranjada sugerem que serão os mesmos aglomerados encontrados nas imagens de grânulos da 1ª experiência (em que se colocou a hipótese de serem PAO, do género *Tetrasphaera*). Na imagem 4b do SBR2 (25°C), na Figura 5.12, encontram-se estas bactérias em grande quantidade numa zona aparentemente menos renovada dos grânulos, ou seja, numa zona de escassez de bactérias Gram negativas viáveis. Não se encontrou esta mesma abundância das bactérias com cor alaranjada no SBR1 (4°C) nem na biomassa da primeira experiência, mas teriam de ser realizadas mais observações para se comprovar ou não esta diferença. É ainda de notar que se observam também algumas (muito poucas) zonas avermelhadas (ver 2a e 4b, Figura

5.12) que podem eventualmente corresponder às bactérias anteriormente referidas com cor alaranjada (e diferente viabilidade), ou a um tipo diferente de bactérias Gram-positivas. Como não se observou a forma de *coccus* nestas bactérias coloridas de vermelho, a última hipótese parece ser a mais plausível.

Em resumo, verificou-se que os grânulos sofreram deterioração em termos de capacidade de sedimentação, integridade e viabilidade como consequência do armazenamento prolongado, de forma mais pronunciada quando este decorreu a 25°C. No entanto, os grânulos sujeitos às duas condições de armazenamento recuperam rapidamente as suas características de sedimentabilidade e integridade ao fim de apenas 10 dias de operação em SBR. Isto é um excelente resultado no que respeita à robustez deste sistema SBR não tubular agitado mecanicamente, numa perspetiva de tratamento de efluentes industriais sujeitos a interrupções na sua produção.

(intencionalmente em branco)

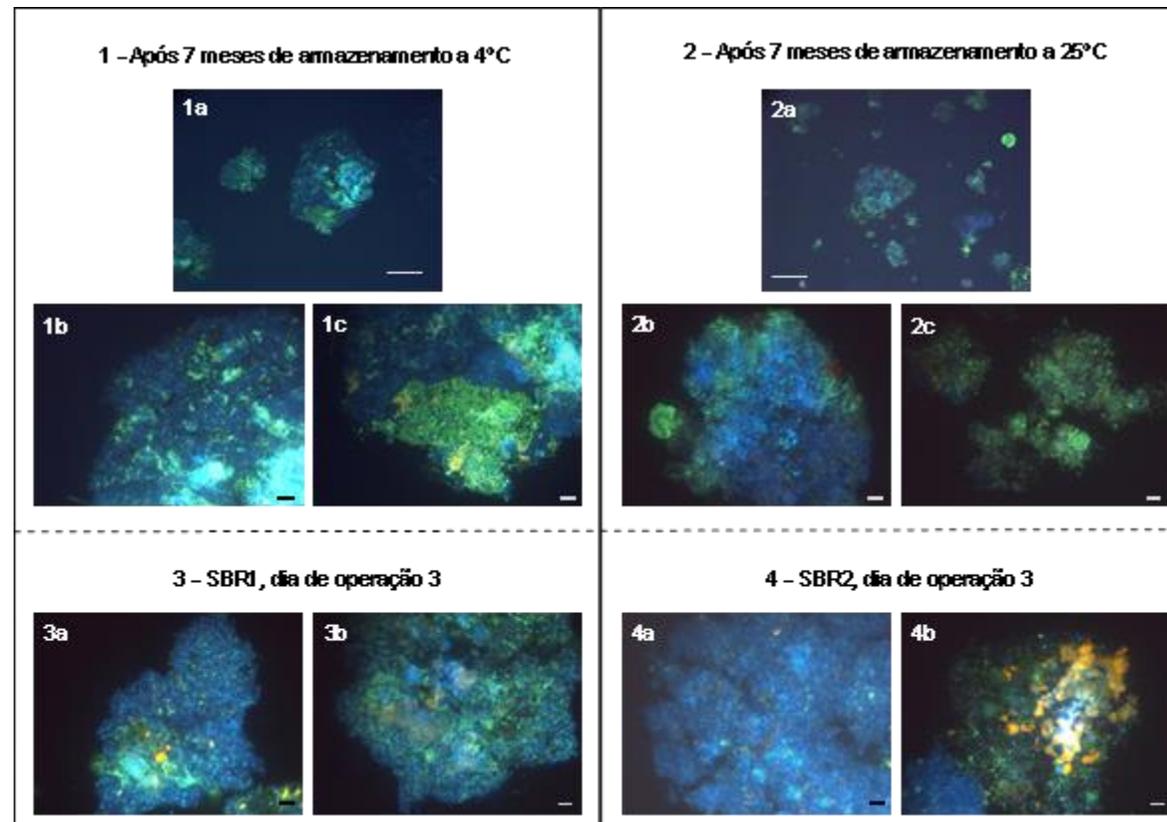


Figura 5.12 - Imagens de observação microscópica de amostras de biomassa da segunda experiência, após coloração com *ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability Kit* **1-** grânulos armazenados a 4°C (dia 0), **2-** grânulos armazenados a 25°C (dia 0); **3-** grânulos do SBR1 (4°C) (dia 3); **4** – grânulos do SBR2 (25°C) (dia 3). A barra corresponde a 100 µm em 1a e 2a e a 10 µm nas restantes imagens (1b, 1c, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 4b). Bactérias Gram positivas: viáveis - azul, não viáveis - verde; Bactérias Gram Positivas: viáveis - interior azul + exterior vermelho, não viáveis - interior verde + exterior vermelho.]

5.4.4 Segunda Experiência - Eficiência do tratamento

A evolução da concentração de COD ao longo do ciclo em vários dias após a inoculação dos reatores SBR1 (4°C) e SBR2 (25°C) pode observar-se na Figura 5.11. Verifica-se que a remoção de COD melhora significativamente ao longo tempo operacional, aproximando-se das gamas desempenho obtidas na 1ª experiência, período IV. Em termos de remoção de COD, no dia 7 foram atingidos valores de 71% e 52%, sendo a carga de COD removida nos mesmos dias de 1,0 e 0,9 kgCOD/ (kgVSS.d), respetivamente no SBR1 (4°C) e no SBR2 (25°C). Ou seja, a biomassa armazenada a 4°C recupera mais rapidamente a eficiência de remoção de COD. Não obstante, quando se analisa a carga de COD removida por unidade de biomassa, é notável o desempenho da biomassa do SBR2, que foi deixada durante 7 meses a 25°C.

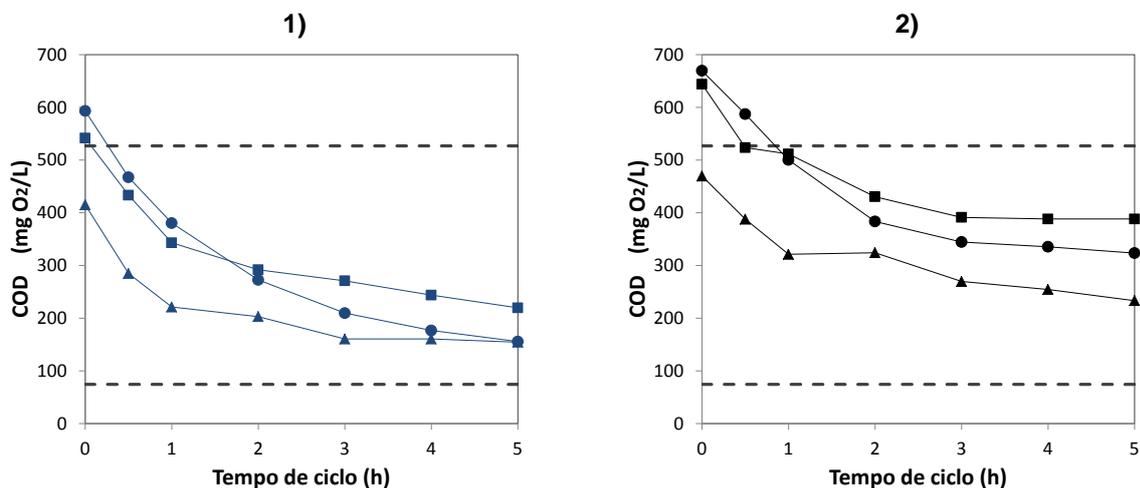


Figura 5.9 - Variação da concentração de COD no licor misto ao longo do ciclo dos reatores SBR em alguns dias da segunda experiência: ■ dia 3, ● dia 7, ▲ dia 10. 1) SBR1 (inóculo armazenado a 4°C) e 2) SBR2 (inóculo armazenado a 25°C). As linhas a tracejado correspondem aos valores médios de teor de COD medidos no início e no fim de ciclos do SBR operado na 1ª experiência com igual carga orgânica (período IV, 2,0 kgCOD/(m³.d)).

Estes níveis de recuperação em termos de desempenho de remoção de COD após armazenamento é comparável aos obtidos por outros investigadores. Foram reportados níveis de remoção de COD de 78% após 3 dias de reativação e de 90% ao fim de 7 dias, com grânulos sujeitos a 7 semanas armazenamento à temperatura ambiente (Zhu e Wilderer 2003). Foi indicado um período de somente 5 dias para a recuperação da eficiência de remoção de TOC após armazenamento durante 8 semanas a 4°C (Zeng et al. 2007). Foram reportados períodos de recuperação de 16 dias para populações heterotróficas e de 11 dias para populações nitrificantes em grânulos sujeitos a armazenamento durante 7 meses a 4°C (Wang et al. 2008) e recuperação em 15 dias após 6 meses a 4°C (Wan et al. 2014a). Aparentemente quanto mais longo é o período de armazenagem indicado para a

biomassa granular maior é o tempo necessário para a recuperação das suas funções biológicas.

Na Tabela 5.6 encontram-se os resultados de medidas de SOUR medidos ao longo da fase reacional aeróbia em alguns dos ciclos do SBR1 (inóculo armazenado a 4°C) entre os dias 10 e 15 da segunda experiência. Constata-se que os valores são em geral mais baixos do que a média dos valores medidos no período IV da primeira experiência, correspondendo a 64%, 70% e 67% destes (início, meio e fim do arejamento respetivamente). Gao et al. (2012) indicaram que grânulos aeróbios armazenados a diferentes temperaturas, durante 8 meses, perderam praticamente toda a atividade metabólica, medida pelos níveis de SOUR, mas que a recuperaram após 1 mês de reativação, atingindo valores de SOUR muito próximos dos iniciais (pré-armazenamento).

Tendo em conta os resultados de consumo de COD das duas experiências, o valor de SOUR mais baixo medido na 2ª experiência era expectável. Isto porque no período IV da 1ª experiência a utilização de substrato pela biomassa é muito rápida, com uma remoção média de COD de 76% ao fim de 1 h, enquanto na 2ª experiência o nível máximo de remoção de COD registado para o mesmo tempo de ciclo é de apenas 47%, no SBR1.

Tabela 5.6- Valores da taxa específica de consumo de oxigénio (SOUR) medidos em vários momentos ao longo de alguns dos ciclos no SBR1 (inóculo armazenado a 4°C) nos últimos dias da 2ª experiência.

	SOUR [mgO ₂ /(gMLVSS.h)]		
	Início do arejamento	A meio do arejamento	Fim do arejamento
SBR1 (4°C):			
Dia de operação	---	17	---
10	34	15	5
13	36	16	6
15			---
Média	35	16	6
Desvio Padrão	2	1	0,2

Os resultados das medidas de SOUR obtidos estão também em concordância com as observações da biomassa sob coloração com o *ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability Kit*. Observaram-se áreas significativas de biomassa não viável no dia 3. Ainda que estas pudessem ser menores no dia 10, poderiam ainda assim justificar valores de SOUR mais baixos por comparação com as observações de biomassa do período IV da primeira experiência, sob a mesma coloração (Figura 5. e Figura 5.6), em que a fração de células não viáveis surge muito menor. Num estudo recente, Wan et al. (2014b) confirmam esta relação direta entre a percentagem de células viáveis após armazenamento e os valores de

SOUR medidos nos grânulos. Estes autores reportam um nível de viabilidade de 47% e um valor de SOUR de 52% relativamente ao valor medido em grânulos antes do armazenamento para grânulos armazenados em água destilada. As mesmas medidas indicam níveis de viabilidade de 88% e de SOUR de 93% para grânulos armazenados numa solução salina (3% NaCl) e níveis de viabilidade de 92% e de SOUR de 100% para os grânulos antes do armazenamento.

Em resumo, verificou-se que os grânulos após armazenagem prolongada sofrem deterioração em termos da sua atividade biológica e que esta é recuperada mais lentamente do que as suas características físicas (sedimentabilidade, integridade). Contudo, ao fim de apenas 7 dias, o rendimento de remoção do substrato é já de 70% para os grânulos armazenados a 4°C e de 50% para os grânulos armazenados a 25°C. Estes resultados são extremamente promissores para a aplicação desta tecnologia, o tratamento por grânulos aeróbios num SBR não tubular agitado mecanicamente. Foi, assim, testada com sucesso a recuperação de uma situação extrema, correspondente a uma paragem na operação do SBR por um período superior a meio ano. Paragens de 1 mês na atividade industrial, mais comuns, seriam, assim, presumivelmente suportadas pelo sistema sem significativa perda de desempenho.

5.5 Conclusões

Este trabalho demonstrou a produção com sucesso de grânulos aeróbios a partir de um inóculo floculento de lamas ativadas num SBR não tubular agitado mecanicamente, com uma fase reacional exclusivamente aeróbia. Tal foi conseguido através da redução gradual do tempo de sedimentação no ciclo operacional, verificando-se que o mesmo é um parâmetro crítico do sistema. Que seja do conhecimento da autora, este é o reator granular com o valor da razão H/D mais baixo reportado até à data e a importância desta configuração prende-se com a perspectiva duma maior facilidade na transposição da tecnologia para sistemas à escala real. A configuração do SBR e a presença de agitação mecânica pareceram condicionar a dimensão dos grânulos, que resultou um pouco menor do que a gama usual descrita, ficando-se por cerca de 0,7 mm. Não obstante, estes grânulos apresentaram uma elevada velocidade de sedimentação, valores de SVI baixos e um bom nível de integridade. Obteve-se ainda com este sistema uma gama melhorada de rendimentos de remoção de COD em relação às anteriormente obtidas para o mesmo substrato, com SBR de lamas floculentas. O arranque do SBR com grânulos aeróbios submetidos a um longo período de armazenagem, 7 meses, proporcionou resultados

notáveis, revelando uma rápida recuperação das propriedades de sedimentação, taxa de crescimento e integridade dos grânulos, mesmo para os armazenados a 25°C.

Estes resultados evidenciam a viabilidade e robustez do tratamento de efluentes industriais utilizando a tecnologia de lamas granulares aeróbias aplicada através de um SBR não tubular com agitação mecânica. São possíveis excelentes eficiências de tratamento com a vantagem adicional de a operação do sistema poder ser suspensa por períodos prolongados, mantendo este a capacidade de re-arranque rápido, em somente alguns dias.

**6 GRANULAÇÃO DE LAMAS ATIVADAS NUM SBR
ANAERÓBIO-AERÓBIO USADO NO TRATAMENTO DE
UM EFLUENTE TÊXTIL SIMULADO**

6.1 Resumo

O objetivo desta fase do trabalho foi avaliar a possibilidade de desenvolvimento de grânulos aeróbios, partindo de um inóculo de lamas ativadas de morfologia em flocos, num reator SBR não tubular alimentado com um efluente têxtil simulado contendo o corante azo *Acid Red 14*. Um segundo SBR foi operado em paralelo, sem corante na solução alimentada. A estratégia experimental iniciou-se com a operação em ciclos de 6 h com a etapa de reação dividida em duas fases, nomeadamente, uma anaeróbia de 3 h, com vista a obter a biodescoloração redutiva, seguida duma aeróbia de 2 h, com vista a completar a mineralização da carga orgânica alimentada. Verificou-se que a granulação foi induzida pela redução gradual do tempo de sedimentação para 5 minutos, mas não se chegou a obter valores de SVI₅ e SVI₃₀ semelhantes, o que indicaria um processo de granulação completo. A observação microscópica da biomassa indicou que este resultado foi acompanhado da persistência de biomassa em flocos e da acumulação de exopolímeros (EPS) numa forma dispersa. A comparação dos dois SBR revelou que a presença do corante na alimentação conduziu a um maior grau de remoção de COD durante a fase anaeróbia e à formação de grânulos mais definidos, não se observando EPS disperso, surgindo o mesmo na estrutura dos grânulos ou em agregados isolados com morfologia semelhante a estes. A alteração do ciclo reacional para um regime de arejamento intermitente, mantendo-se a duração total dos períodos anaeróbio e aeróbio, levou à redução da quantidade de EPS disperso e à formação de agregados mais densos, não se tendo contudo conseguido completar o processo de granulação. Obtiveram-se, nos dois regimes reacionais, valores similares para os rendimentos globais de remoção de COD (80%), e de cor (> 80%). No entanto, a taxa inicial de remoção de cor foi menor no regime de arejamento intermitente. Conclui-se que a duração do período reacional anaeróbio é um fator importante na estabilidade dos grânulos e na eficiência da biodescoloração, requerendo estudos adicionais, mas que inequivocamente foi estabelecido o potencial dos biorreatores granulares aeróbios para o tratamento de efluentes têxteis.

6.2 Introdução

Os efluentes têxteis causam um impacto ambiental negativo a nível mundial sendo em alguns casos responsáveis pela deterioração da qualidade da água dos meios recetores. Estes efluentes são muito carregados no que respeita a matéria orgânica e cor, sendo esta última conferida em 70% dos casos por corantes azo (Maas e Chaudhari 2005). Para o tratamento destes efluentes contendo corantes azo têm sido propostos sistemas biológicos baseados em biomassa floculenta que combinam uma fase anaeróbia e uma aeróbia, em que na fase anaeróbia ocorre a redução do corante (quebra da ligação azo com consequente descoloração) e na fase aeróbia se completa a remoção de carga orgânica, podendo também ocorrer a subsequente oxidação dos metabolitos resultantes da redução do corante (aminas aromáticas) (Lourenço et al. 2001, Sponza e Işık 2002, van der Zee e Villaverde 2005). Para tal, podem ser utilizados reatores sequenciais descontínuos (SBR), que têm a vantagem de serem sistemas muito flexíveis em que o tempo de permanência em cada fase pode ser ajustado às necessidades. Por outro lado, a tecnologia de grânulos aeróbios em SBR é considerada uma alternativa muito vantajosa à tecnologia de lamas ativadas com biomassa floculenta, apresentando elevadas concentrações de biomassa com excelente sedimentabilidade, o que permite o tratamento de efluentes muito carregados (de Bruin et al. 2004). Para além disso, o facto de poderem existir no mesmo grânulo zonas aeróbias e anóxicas/anaeróbias, em conjugação com a possibilidade de imposição de fases sem arejamento / arejadas em SBR, dotam o sistema de características únicas para a remoção de nutrientes, permitindo a ocorrência de várias reações biológicas na fase arejada: a acumulação de polifosfatos e nitrificação na camada exterior dos grânulos e a desnitrificação no seu interior (de Kreuk e van Loosdrecht 2004, de Kreuk et al. 2005a, de Kreuk et al. 2007, Winkler et al. 2012). A aplicação desta tecnologia para o tratamento de efluentes têxteis é muito promissora, mas encontra-se ainda numa fase incipiente, estando a dar os primeiros passos (Muda et al. 2010, Muda et al. 2011, Kolekar et al. 2012, Lotito et al. 2012b).

O objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade do desenvolvimento de grânulos aeróbios num SBR alimentado com um efluente têxtil sintético contendo um corante azo utilizado como modelo (*Acid Red 14*) e operado num ciclo que inclui uma fase anaeróbia prolongada. Foi ainda estudada a estratégia de arejamento intermitente mantendo os períodos totais de arejamento/anaerobiose. Formar grânulos estáveis nestas condições foi o desafio principal. É de realçar que a configuração do SBR utilizada com H/D de 2,5 (não tubular) é bastante diferentes das razões de 12 a 30 normalmente utilizadas (Beun et al. 1999, Tay et al. 2005, Muda et al. 2010). De acordo com estudos anteriores (Lourenço et al. 2001, 2006) é expectável que a descoloração ocorra na fase anaeróbia, devido à redução da ligação azo com a correspondente formação de aminas aromáticas incolores. No

presente estudo foram inoculados dois reatores idênticos com biomassa floculenta, sendo um dos SBR utilizado como controlo, ou seja, alimentado com um efluente sintético sem a presença de corante.

6.3 Materiais e Métodos

6.3.1 Inóculo e substratos

Inóculo de Lamas Ativadas: Os reatores foram inoculados com lamas ativadas floculentas recolhidas numa ETAR municipal (Chelas, Lisboa). Antes de ser utilizada, a biomassa foi peneirada (rede de 1 mm), sedimentada e lavada duas vezes com água da torneira arejada. A concentração inicial nos reatores foi ajustada para um teor em sólidos suspensos totais (TSS) de 2,5 g/L.

Fonte de carbono (solução-mãe): A fonte de carbono usada consistiu num derivado de amido denominado Emsize E1 (hidroxipropil-amido, Emsland-Starke GmbH, Alemanha). Este foi pré-hidrolisado em condições alcalinas (NaOH) seguido de ajuste de pH a 7,0 (HCl) e diluído com água desionizada a 100 g/L, de acordo com o descrito anteriormente por Lourenço et al. (2001) e O'Neill et al. (2000).

Corante azo (solução-mãe): O corante azo testado foi o *Acid Red 14* (Chromotrope FB, Sigma-Aldrich, com um teor de corante de 50%, Figura 2.1), sendo usado diretamente sem nenhuma etapa adicional de purificação. O corante foi dissolvido em água desionizada a 3,0 g/L.

Solução base de alimentação: A solução de alimentação foi preparada em água desionizada utilizando a solução-mãe da fonte de carbono, diluída a 1000 mg O₂/L, e suplementada com tampão fosfato para manutenção do pH e outros nutrientes. As concentrações foram as seguintes: KH₂PO₄ (760 mg/L), Na₂HPO₄.12H₂O (2310 mg/L), NH₄Cl (140 mg/L), MgSO₄.7H₂O (23 mg/L), CaCl₂ (28 mg/L), FeCl₃.6H₂O (250 µg/L), MnSO₄.4H₂O (40 µg/L), H₃BO₃ (57 µg/L), ZnSO₄.7H₂O (43 µg/L), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (35 µg/L). Todos os sais utilizados foram de grau analítico. Esta solução corresponde à razão mássica COD/N/P de 100/3,7/30.

Efluente têxtil sintético: Este efluente corresponde à solução de alimentação contendo corante e foi obtido adicionando 10 mL da solução-mãe de corante a 750 mL de solução base de alimentação. A solução-mãe de corante foi adicionada diretamente a um dos SBR

em cada ciclo, no final da fase de enchimento, correspondendo a uma concentração de 20 mg/L de corante no licor misto.

6.3.2 Sistema Experimental

O sistema experimental incluiu dois SBR com um volume de trabalho de 1,5 litros, operados nas mesmas condições com exceção da alimentação. O SBR1 foi alimentado com a solução base de alimentação e o SBR2 foi alimentado em todos os ciclos com esta solução e a solução-mãe do corante azo, ou seja, com o efluente têxtil sintético.

O esquema do sistema reacional é apresentado na Figura 6.1. Os SBR são iguais aos utilizados na experiência anterior (Capítulo 5). Cada SBR foi adaptado a partir de um reator de vidro de 1 litro (SCHOTT-DURAN) contendo uma boca GL45 e um agitador magnético (tipo âncora) suportado numa tampa de rosca equipada com duas entradas GL14. As adaptações foram feitas no frasco de vidro e incluíram uma extensão vertical para 1,5 L e a inserção de duas entradas GL45 (a 45°) na parte superior do vaso de vidro cilíndrico. A extensão vertical resultou numa razão altura/diâmetro de 2,5 relativamente ao volume de trabalho. O agitador magnético utilizado foi o modelo bioMIXdrive 1 controlado pela unidade bioMIXcontrol MS4 fixada a 200 r.p.m. (ambos da marca 2mag, Alemanha).

A solução base de alimentação foi inserida pelo fundo do reator, ao nível do difusor de ar, utilizando uma bomba peristáltica para cada reator (Mini-S 660, Ismatec, Switzerland). A descarga rápida foi realizada com única bomba de carretos para os dois reatores (Reglo-Z, Ismatec, Switzerland). Uma bomba peristáltica adicional foi utilizada para alimentar o corante ao SBR2 (entrada pelo topo, através de uma porta GL14). O arejamento foi efetuado usando um compressor modelo SPP 15 (Highblow, Japão) através de uma membrana difusora porosa colocada no fundo de cada reator. O caudal de ar foi aproximadamente de 3.0 L/min em cada reator, correspondendo a uma taxa de arejamento de 2 v.v.m (volume de ar por volume de líquido por minuto).

As funções de bombagem, arejamento e agitação foram automaticamente controladas, através de uma interface usando um programa dedicado instalado num PC.

Os reatores foram operados com um ciclo de 6 horas, compreendendo 5 h de reação e 1h repartida entre o enchimento, sedimentação, descarga e paragem (*idle*). A reação incluiu um período anaeróbio seguido de um período aeróbio. O tempo de enchimento (sem agitação e sem arejamento) foi fixado em 15 minutos e o tempo de descarga a 1 minuto (descarga rápida). A *volumetric exchange ratio* foi de 50%, sendo o efluente removido a meia

altura do volume útil do reator o que corresponde a um tempo de retenção hidráulico de 12h. A carga orgânica volumétrica foi de 2.0 kgCOD/(m³.d) (ou kgO₂/(m³.d)). Estas condições gerais foram mantidas durante todo o tempo da experiência, exceto no Período II em que o tempo de reação foi estendido para 5,5h (por encurtamento do tempo *idle*).

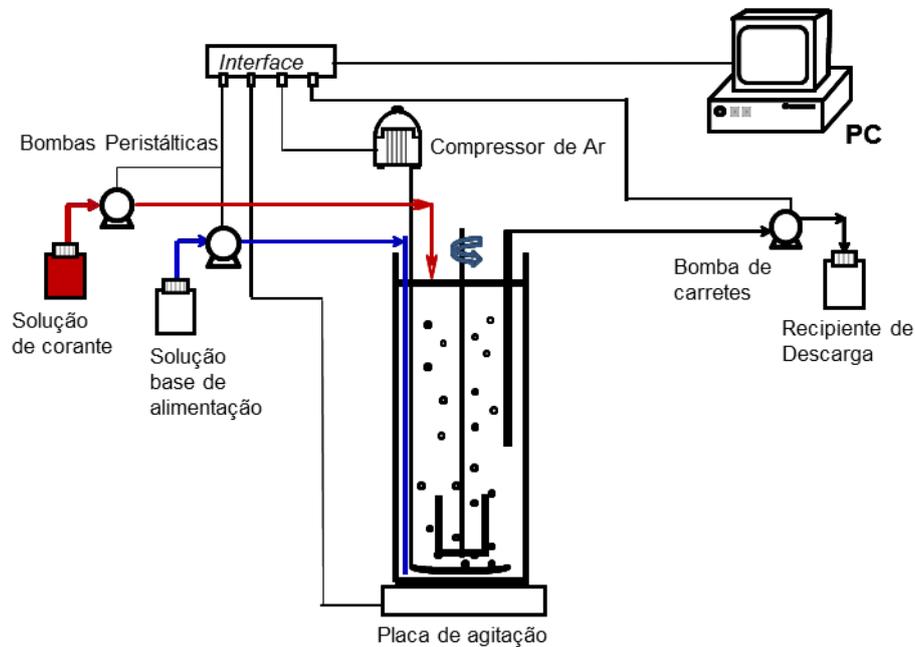


Figura 6.1 - Esquema do sistema reacional para o SBR2 (alimentação com corante)

O pH não foi controlado, mas foi mantido entre 6,2 a 6,8 pela presença do tampão fosfato na solução de alimentação base. Os reatores foram operados à temperatura ambiente, entre 21 e 26°C. Foi utilizada refrigeração durante os períodos mais quentes no verão.

A remoção deliberada de biomassa dos reatores foi limitada às necessidades de amostragem. A maior perda ocorreu na descarga do efluente tratado (descarga de 50% do volume em cada ciclo, após sedimentação).

6.3.3 Métodos Analíticos

Os parâmetros medidos *in situ* foram o potencial de oxidação redução (ORP), o oxigênio dissolvido e a temperatura. Os restantes parâmetros foram medidos em amostras recolhidas dos reatores. Para a determinação da carência química de oxigênio (COD), concentração de corante e pH, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 4000 r.p.m., e as medidas efetuadas no sobrenadante. O COD foi determinado através do método normalizado de digestão com dicromato de potássio e titulação com sulfato ferroso amoniacal (APHA 1998)

utilizando um digestor AccuBlock™ Digital Dry Bath (Model: D1200) da Labnet International, Inc. (EUA). Para cada amostra a análise foi realizada em duplicado e os valores reportados correspondem à média. O erro padrão relativo (RSD) médio foi de 1,4% e o RSD máximo de 6,0%. A contribuição do corante azo para o valor de COD (a um máximo de 20 mg/L) foi medida e revelou-se insignificante, abaixo do limite de detecção do método ($\leq 10 \text{ mgO}_2/\text{L}$).

Os **sólidos suspensos totais** (TSS) e os sólidos suspensos voláteis (VSS) foram medidos através de métodos normalizados (APHA 1998) em amostras de licor misto retiradas dos biorreatores e em amostras do efluente descarregado. Para cada amostra a análise foi realizada em duplicado e os valores reportados correspondem à média. Para os TSS, o RSD médio foi de 2,5% e o máximo de 21%.

O **índice de volume de lamas** (SVI) foi determinado pelo volume ocupado pela lama sedimentada de 1 litro de licor misto, após sedimentação de 5 min (SVI₅) e 30 min (SVI₃₀), dividido pelo respetivo valor de TSS; esta medição foi efetuada *offline* num cone Imhoff e o licor misto foi prontamente retornado ao reator.

A **concentração de corante** azo foi determinada espectrofotometricamente, por leitura da absorvência das amostras a 515 nm (comprimento de onda de absorvência máxima do corante, na região do visível), contra água desionizada. O espectrofotómetro utilizado foi o Specord 200 (Analytik Jena, Alemanha) com células de quartzo com 1 cm de comprimento de percurso ótico. Para cada amostra a análise foi realizada em duplicado e os valores reportados correspondem à média. O RSD médio foi de 0,2% e o máximo de 2,4%.

As amostras centrifugadas (sobrenadante) foram analisadas por **cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)** utilizando um sistema Merck-Hitachi (Alemanha), que compreende uma bomba inteligente L-6200A, um detetor UV-Vis L-4250 e um amostrador automático L-7200, com uma interface D7000 controlada por computador. O sistema estava equipado com uma coluna de fase reversa RP-18, LiChroCART 250-4 (Merck, Alemanha) e a deteção espectrofotométrica foi realizada a 220 nm. A fase móvel foi composta por tampão de fosfato de sódio (25 mM, pH = 5,5) e acetonitrilo (tampão:acetonitrilo), com um caudal de 0,7 mL/min. O método foi desenvolvido com vista a uma boa separação e quantificação dos picos (6 meses) tendo-se chegado ao seguinte programa: um gradiente linear de 30 min de 100:0 a 50:50 (v/v), seguido de um gradiente linear de 5 minutos até 15:85 (v/v) e terminando com um passo de 100:0 mantido por um período adicional de 10 min. A identificação e quantificação dos picos foi realizada através de soluções padrão de corante *Acid Red 14* e de amina 4A1NS (4-amino-1-naftaleno sulfonato) (Sigma, EUA), ambos em água desionizada. O desvio padrão (STD) do método foi determinado com valores obtidos em 10 ensaios para a mesma amostra. Para a amostra padrão de 1 mg/L obteve-se um STD

de 5,7% para o corante e 2,7% para a amina. Para a amostra padrão de 10 mg/L obteve-se um STD de 1,0% para o corante e 0,5% para a amina. Para cada amostra a análise foi realizada em duplicado e os valores reportados correspondem à média. O RSD médio foi de 0,1% e o máximo de 0,9%.

Foram observadas amostras de biomassa de ambos os reatores em ampliações de 40 e 100x, através de um **microscópio** de transmissão de luz (BA200, Motic, China) equipado com câmara e respetivo *software* (Moticam 1000, Motic, China).

O valor de **pH** foi medido *offline* em amostras centrifugadas utilizando um elétrodo de vidro Metrohm 6.0202.100 ligado a um potenciómetro Metrohm 691 (Suíça).

O **potencial redox** foi medido *in situ*, utilizando um elétrodo SenTix ORP (WTW, Alemanha) ligado a um medidor de pH digital (pH 538, WTW, Alemanha). Os valores medidos foram convertidos para a base do elétrodo de hidrogénio padrão (E^0), por soma de 207 mV à leitura (indicação do fabricante).

O **oxigénio dissolvido** foi medido *in situ*, utilizando uma sonda padrão luminescente, LDO101 (Hach, EUA), ligada a um medidor multiparamétrico HQ40d (Hach, EUA) equipado com uma sonda de temperatura. As taxas de consumo de oxigénio (OUR) foram medidas durante a fase de reação aeróbia, por interrupção breve do arejamento (até 5 minutos), registando-se a evolução dos valores de oxigénio dissolvido ao longo do tempo. Para isso, a sonda era imersa no licor misto (mantendo a mistura em agitação), a uma profundidade de cerca de 3 cm.

6.3.4 Estratégia Experimental

Os dois reatores foram inoculados com lamas ativadas flocculentas e operados durante 112 dias, incluindo quatro períodos distintos, (I, II, III, IV) em termos de condições operacionais do sistema, ver Tabela 6.1.

Durante o **período I** os reatores foram operados com 3 h de reação anaeróbia (sem arejamento e com agitação) seguida de 2 h de reação aeróbia (com arejamento e com agitação). Durante os primeiros 4 dias o tempo de sedimentação foi de 40 min para minimizar as perdas de biomassa enquanto esta se adaptava ao efluente sintético. Em seguida, o tempo de sedimentação foi reduzido para 10 min (dias 5-12), para 5 min (dias 13-28) e para 4 min (dias 29-33) para induzir a granulação. Todas as reduções do tempo de

sedimentação, à exceção da primeira, foram introduzidas logo que os sólidos suspensos no efluente do SBR2 (com corante) atingiam um valor de cerca de 100 mg/L.

No **período II** (dias 34-52) os reatores foram operados com uma fase anaeróbia maior, de 3,5 h, mantendo em seguida um arejamento de 2h e um tempo de sedimentação de 4 min. A intenção foi avaliar a possibilidade de melhorar a remoção de corante e a formação dos grânulos. Nenhum dos objetivos foi alcançado por isso esta estratégia não foi continuada após o dia 52.

A mudança das condições operacionais, no dia 53, provocou uma falha, originando uma descarga do reator com a agitação e arejamento em funcionamento, o que levou a uma enorme perda de biomassa (não recuperada) em ambos os reatores.

Tabela 6.1 – Resumo das condições operacionais utilizadas nos dois SBR nos diferentes períodos experimentais.

	Período I	Período II	Período III	Período IV
Tempo	Dias 1 a 33	Dias 34 a 52	Dias 53 a 89	Dias 90 a 112
Enchimento (sem agitação, sem arejamento)	15 min	15 min	15 min	15 min
Reação anaeróbia (com agitação)	3 h	3.5 h	3 h	Arejamento intermitente 6 x (30 min anaeróbiose + 20 min aerobiose)
Reação aeróbia (com agitação, com arejamento)	2 h	2 h	2 h	
Sedimentação	40 to 4 min	4 min	3 min	3 min
Descarga	1 min	1 min	1 min	1 min
Paragem (<i>idle</i>)	4 to 39 min	9 to 11 min	41 min	41 min
Ciclo total	6 h	6 h	6 h	6 h
Observações	--	---	Perda de biomassa acidental no dia 53	---
Duração do período experimental (dias)	33	19	37	23

No **período III** (dias 53-89) os reatores foram operados de novo com 3 h de reação anaeróbia seguida de 2h de aerobiose e com o tempo de sedimentação reduzido para 3 min. O nível de sólidos nos reatores no início deste período era baixo, e o objetivo foi promover a granulação da biomassa e o seu crescimento. O tempo de sedimentação de 3 min foi escolhido por ter produzido uma granulação eficiente no SBR1 operado

anteriormente com 5 h de reação totalmente arejadas, de acordo com os resultados descritos no Capítulo 5 desta dissertação (Mata et al. 2012).

No **período IV** (dias 90-112) as 5 h de reação ocorreram em regime de arejamento intermitente, 30 min *off* e 20 min *on*, num total de 6 ciclos *off-on*, iniciando-se com um período sem arejamento. O objetivo era testar se esta intermitência iria reduzir o material exopolimérico disperso que prejudicava a sedimentação da biomassa e a remoção de COD, e se ao mesmo tempo permitia manter uma boa remoção de cor.

(intencionalmente em branco)

6.4 Resultados e Discussão

6.4.1 Concentração da biomassa, propriedades de sedimentação e morfologia

A evolução dos níveis de sólidos suspensos totais (TSS) nos dois SBR ao longo dos quatro períodos experimentais é apresentada na Figura 6.2 e na Figura 6.3 para o licor misto e para o efluente descarregado, respetivamente. A idade de lamas foi determinada pelo nível de sólidos perdidos no efluente e retirados na amostragem (menos do que 10% do total), não tendo sido efetuada mais nenhuma remoção deliberada de biomassa. Com base no balanço feito a partir dos dados de TSS, a idade de lamas média global foi de 5 dias para o SBR1 (controlo) e de 12 dias para o SBR2 (com corante). A idade de lamas média foi de 4, 6, 5 e 6 dias para o SBR1 e de 11, 12, 7 e 15 dias para o SBR2 (com corante) para os períodos I, II, III e IV, respetivamente.

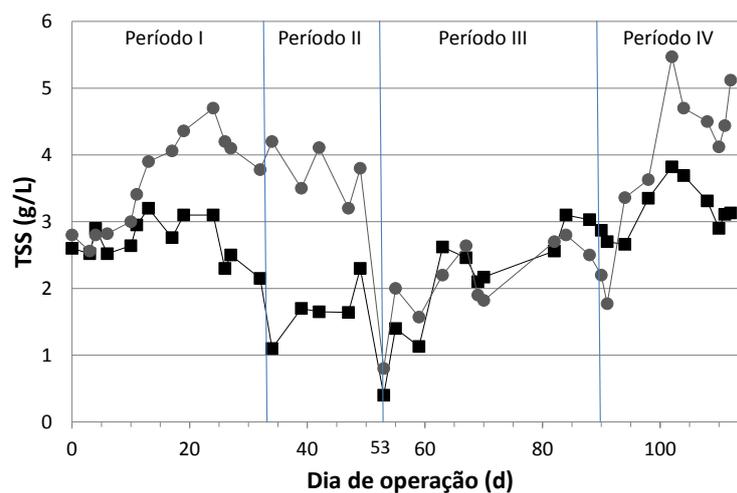


Figura 6.2 - Sólidos suspensos totais (TSS) no licor misto do SBR1 – controlo (■) e SBR2 – com corante(●) ao longo dos quatro períodos experimentais identificados na Tabela 6.1.

Os níveis de biomassa no licor misto foram mantidos (SBR1) ou aumentados (SBR2) durante a primeira parte do **período I**, apesar das sucessivas reduções no tempo de sedimentação que resultaram em elevados níveis de perda de biomassa no efluente. A acumulação de biomassa no SBR2 (com corante) parece ter sido o resultado de um melhor processo de granulação, com níveis mais baixos de perdas de no efluente (*washout*).

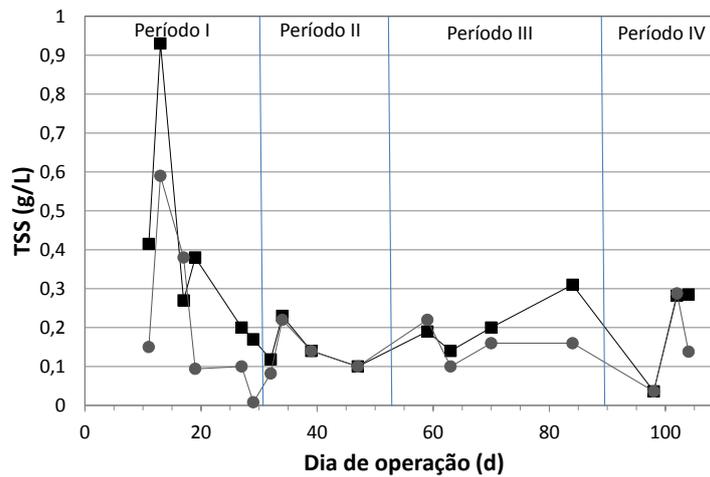


Figura 6.3 - Sólidos suspensos totais (TSS) no efluente descarregado do SBR1 (controle, ■) e SBR2 (com corante; ●) ao longo dos quatro períodos experimentais identificados na Tabela 6.1.

No período I, a concentração de biomassa mais elevada foi atingida no dia 24 (3,1 e 4,7 g/L no SBR1 e SBR2, respetivamente), após a redução do tempo de sedimentação para 5 min. A partir do dia 24 observou-se uma diminuição dos níveis de biomassa no licor misto, tanto com 5 min como com 4 min de tempo de sedimentação, apesar de se ter verificado uma tendência decrescente nos níveis de perda de biomassa no efluente descarregado até o final deste período I. O prolongamento da fase anaeróbia no **período II** deteriorou ainda mais os níveis de concentração de biomassa nos reatores.

Após a descarga acidental de biomassa no dia 53, ambos os reatores acumularam biomassa de forma semelhante ao longo do **período III**, embora os níveis de perda de biomassa no efluente se mantivessem altos devido à redução do tempo de sedimentação para 3 min (e maiores no SBR1 que no SBR2). A introdução do arejamento intermitente no **período IV** levou a uma aceleração da acumulação de biomassa em relação ao período anterior, aparentemente superior no SBR2, apesar da perda de biomassa no efluente se manter semelhante à do período III. No geral, houve uma diferença significativa em relação aos níveis de biomassa entre o SBR1 e o SBR2 (com corante), tendo este último alcançado valores de TSS mais elevados no licor misto, com um máximo de 5,5 g/L e uma média de 4,5 g/L (dias 98 a 112), bem como menores perdas de biomassa no efluente descarregado, com uma média de 150 mg/L (dias 98 a 112). Estes valores de concentração de biomassa no SBR2 (com corante) em regime intermitente (60% anaerob., 40% arejamento) são comparáveis com os obtidos por Muda et al. (2010) no tratamento de um efluente têxtil com grânulos aeróbios num SBR tubular, em regime intermitente de duas etapas anaeróbio/aeróbio (24% anaerob., 76% arejamento). De facto, neste SBR tubular foi obtido um valor de VSS de 5,6 g/L no licor misto e níveis de biomassa de 300 a 500 mg/L de TSS no efluente descarregado, pelo que se pode considerar que o efluente final obtido no SBR2

foi de melhor qualidade relativamente a este parâmetro. É de realçar no entanto, que os valores de TSS obtidos no efluente do SBR2 não atingem ainda a qualidade necessária para descarga direta no meio recetor cujo limite é de 60 mg/L (ver Tabela 2.8).

Comparando os resultados de TSS obtidos no SBR1 (controlo) no período IV com os resultados obtidos anteriormente para este reator em regime totalmente aeróbio (Mata et al. 2012), descritos no Capítulo 5, verifica-se que a acumulação de biomassa foi agora bastante menor para os mesmos 3 min de sedimentação. O valor máximo obtido foi de 3,8 g/L de SST contra 6,9 g/L de TSS obtidos em regime totalmente aeróbio. Aparentemente, para este sistema contendo amido hidrolisado como substrato, a introdução da fase anaeróbia (60% anaerob., 40% arejamento) não foi favorável à agregação e acumulação de biomassa. No entanto, num estudo efetuado por de Kreuk e van Loosdrecht (2006) num reator tubular usando também um substrato simples (acetato), o mesmo tempo de sedimentação (3 min) e uma fase anaeróbia mais curta (35% anaerob., 65% arejamento), foi atingida uma concentração de biomassa elevada, de 8,5 g/L.

A granulação foi seguida ao longo dos quatro períodos experimentais através da medição do índice de volume de lamas (SVI) como forma de quantificar as **propriedades de sedimentação** das lamas, em particular os valores de SVI₅ e SVI₃₀, cuja aproximação é típica de uma boa granulação (Schwarzenbeck et al. 2004, de Kreuk et al. 2007, Liu 2008). Na Figura 6.4 apresentam-se os resultados obtidos para estes dois índices.

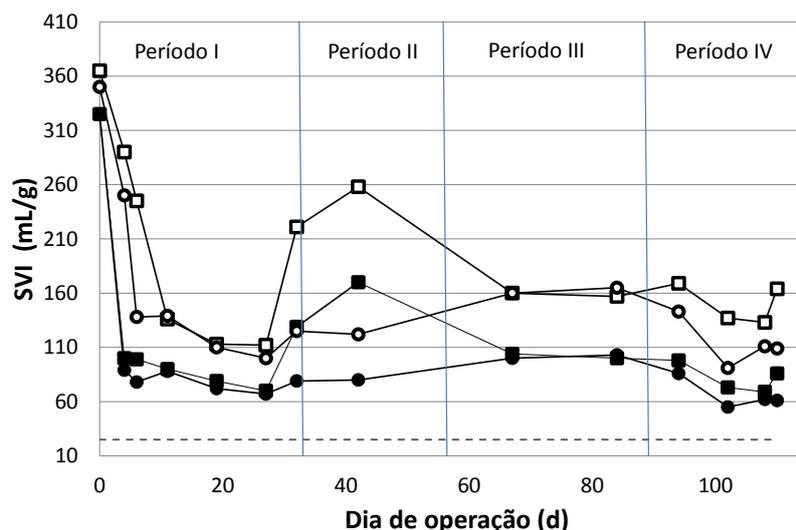


Figura 6.4 – Índice de volume de lamas (SVI) medido ao longo dos períodos experimental (identificados na Tabela 6.1): no SBR1 (□, ■; sem corante) e SBR2 (○, ●; com corante); SVI₅ – símbolos abertos, SVI₃₀ – símbolos fechados. A linha tracejada horizontal representa o melhor valor de SVI₃₀ obtido na experiência anterior com o SBR1 (sem corante) em modo de reação totalmente arejado (Mata et al. 2012).

Durante o período I observou-se uma forte queda dos valores SVI, seguida por uma redução mais lenta até ao dia 27, tendo o SBR2 (com corante) apresentado consistentemente valores menores do que o SBR1. No entanto, os valores de SVI_{30} foram sempre muito superiores aos atingidos na experiência de granulação anterior com o SBR1 em modo de reação totalmente arejado (linha a tracejado na Figura 6.4, $SVI_{30} = 25 \text{ mL/g}$) (Mata et al. 2012). Além disso, os valores de SVI_5 permaneceram bastante acima dos valores do SVI_{30} , sugerindo uma sedimentação mais impedida. A redução do tempo de sedimentação para 4 min (ainda no período I) deteriorou acentuadamente os valores SVI no SBR1 e também no SBR2 (com corante), mas em menor escala. Mantendo este tempo de sedimentação e aumentando o tempo de reação anaeróbia para 3,5 h (período II), os valores de SVI no SBR1 aumentaram ainda mais e não melhoraram no SBR2.

Após o incidente de perda de biomassa no dia 53, as condições operacionais do período III (tempo de sedimentação de 3 min e 3h de anaerobiose), aproximaram os valores de SVI dos dois SBR, mas tanto o SVI_5 como o SVI_{30} ficaram em valores cerca de 1,5 vezes mais elevados do que os obtidos com um tempo de sedimentação de 5 min durante o período I. A introdução do arejamento intermitente no período IV melhorou significativamente o SVI no SBR2 (com corante), resultando nos valores mais baixos durante todo o período experimental (55 mL/g), mas a alteração foi muito menos notada no SBR1 (controlo). Estes valores de SVI estão próximos, para melhor, dos obtidos por Muda et al. (2010) no tratamento de um efluente têxtil num reator tubular, cujo melhor SVI foi de 69 mL/g para uma sedimentação de 5 min.

Um tempo de sedimentação de 3 min nos reatores do presente estudo ($H_{\text{útil}} = 22 \text{ cm}$) corresponde a uma seleção de biomassa com velocidade de sedimentação mínima de 2,2 m/h e no caso do reator tubular utilizado por Muda et al. (2010) corresponde a 4,8 m/h. Este último valor representa uma maior pressão seletiva que teoricamente originaria valores inferiores de SVI, reforçados pelo facto de o inóculo ter consistido numa mistura de biomassa floculenta e grânulos anaeróbios em oposição ao inóculo de biomassa floculenta no caso dos reatores não tubulares SBR1 e SBR2, mas tal não se verifica.

Uma **força de corte elevada** é indicada como favorecendo a granulação aeróbia (Heijnen e van Loosdrecht 1998, Tay et al. 2001a, Liu e Tay 2004, de Kreuk et al. 2007, Lopez et al. 2012), observando-se uma melhor formação de grânulos a valores de velocidade ascendente superficial mais elevados que dependem do caudal de arejamento. Assim, um tempo de reação anaeróbio longo, como o aplicado ao SBR1 e SBR2, diminui o tempo de exposição da biomassa a uma tensão de corte elevada e pode ser uma das causas importantes para a granulação menos conseguida. Os resultados do período intermitente reforçam o papel da tensão de corte na granulação, pois apesar de o tempo total em

anaerobiose ter sido mantido, houve uma exposição da biomassa de 30 em 30 minutos a uma tensão de corte elevada durante a fase de arejamento e obteve-se uma granulação nos reatores mais eficiente.

Segundo de Kreuk e van Loosdrecht (2004), outro fator que pode influenciar negativamente a integridade dos grânulos aeróbios é a **agitação mecânica**, que no caso do sistema em estudo foi elevada (200 r.p.m.), especialmente quando comparada com os sistemas tubulares em que a fase anaeróbia corresponde a um enchimento lento sem agitação e a mistura é apenas promovida pelo arejamento.

Os resultados de SVI, em particular a aproximação incompleta dos valores de SVI_5 e SVI_{30} , sugerem que o processo de granulação ocorreu no SBR1 e SBR2 mas não foi completado com sucesso. A Figura 6.5 mostra imagens de **microscopia** de amostras de biomassa dos períodos de I e II, e confirma a ocorrência da granulação, sendo visível um forte contraste entre o tamanho e a morfologia do inóculo flocculento e a biomassa granular desenvolvida em ambos os reatores.

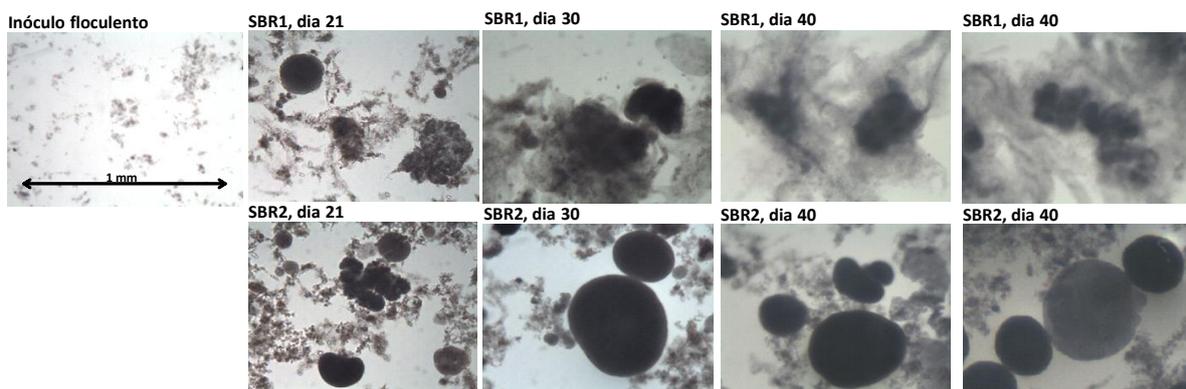


Figura 6.5 - Imagens de microscopia (ampliação de 100x) de amostras de biomassa do SBR1 (controle) e SBR2 (com corante) durante o período experimental I (dias 21 e 30) e o período II (dia 40).

A granulação prosseguiu melhor no SBR2 (com corante), com grânulos bem definidos de forma redonda/oval a serem observados a partir do dia 21, atingindo a dimensão de 0,5 mm no dia 30 (Figura 6.5). No entanto, os agregados flocculentos permaneceram, possivelmente introduzindo o efeito de aparente impedimento na taxa de sedimentação. O tempo de 21 dias para obtenção de grânulos partindo de flocos é similar aos ≈ 20 dias reportados em sistemas anaeróbios/aeróbios que tratam efluentes sintéticos simples ou águas residuais urbanas em SBR tubular (de Kreuk et al. 2005a, de Kreuk e van Loosdrecht 2006), bem como aos 25 dias da experiência em fase totalmente arejada do SBR1 (Mata et al. 2012, Capítulo

5). No entanto, a dimensão dos grânulos reportada em todos estes casos é maior, de ≈ 1 mm e o formato é mais irregular.

No SBR1 (controlo), embora os grânulos possam ser encontrados no dia 21, mostram já no dia 30 contornos menos bem definidos, estando aparentemente rodeados por um revestimento difuso de material exopolimérico. Esta observação acompanhou a redução do tempo de sedimentação de 5 para 4 min com um aumento acentuado dos valores de SVI, agravando-se no período II.

Os grânulos do SBR2 (com corante) mantiveram o seu tamanho e forma, e a sua abundância até aumentou no período II, no entanto também aqui os valores de SVI aumentaram com a redução do tempo de sedimentação de 4 para 5 minutos. Alguns destes grânulos são notáveis pela sua cor esbranquiçada (Figura 6.5, dia 40, SBR2) parecendo ser constituídos apenas por material exopolimérico (EPS). A presença de EPS é referida como essencial para a agregação, manutenção e estabilidade dos grânulos aeróbios (Liu e Fang 2003, Liu e Tay 2004, Wang et al. 2005, 2008), mas não se encontrou na literatura consultada nenhuma descrição semelhante à formação deste tipo de “grânulos de EPS”.

O tempo de sedimentação é um dos fatores que determina a formação de grânulos apesar de ainda não se conhecerem exatamente as causas. De facto, os grânulos não são estáveis se apesar de serem mantidas todas as outras condições favoráveis, o período de sedimentação for longo (McSwain et al. 2005). Pensa-se também que as bactérias comunicam entre si (*quorum-sensing*), enviando sinais para se agregarem e interagirem da melhor forma com o meio ambiente (Liu e Tay 2004, Ren et al., 2010). Assim, é possível que a redução do tempo de sedimentação de 5 para 4 min possa ter induzido um nível de *stress* tão elevado que as bactérias tenham respondido ao mesmo com uma produção exagerada de EPS, que no caso do SBR1 (controlo) apareceu com uma estrutura dispersa e difusa e no caso do SBR2 (com corante) de forma agregada.

Após a elevada perda de biomassa devido ao incidente de dia 53, observou-se o desenvolvimento de agregados, mas permaneceram essencialmente ausentes grânulos bem definidos durante todo o período operacional III. São apresentados exemplos na Figura 6.6. De notar que o material macio que envolve os agregados nas imagens do SBR1 não parece consistir em bactérias filamentosas, como reportado por Tay et al. (2001b) em grânulos desenvolvidos na presença de glucose, mas sim numa versão do material disperso já visto nas imagens do SBR1 na Figura 6.5. Este material é muito menos abundante em imagens do SBR2.

A mudança para o arejamento intermitente no período IV aparentemente reduziu a acumulação do material exopolimérico (Figura 6.6), mas, por outro lado, foi observado

algum crescimento filamentoso no SBR1 (controlo). Verificou-se o desenvolvimento de agregados de biomassa densos e maiores, que apesar de não terem uma forma redonda/oval, apresentavam dimensões semelhantes às dos grânulos anteriormente formados, o que está de acordo com os valores de SVI obtidos, baixos e próximos dos do período I, em especial no SBR2 (com corante). Na Figura 6.7 encontram-se imagens mais ampliadas dos agregados que se formaram.

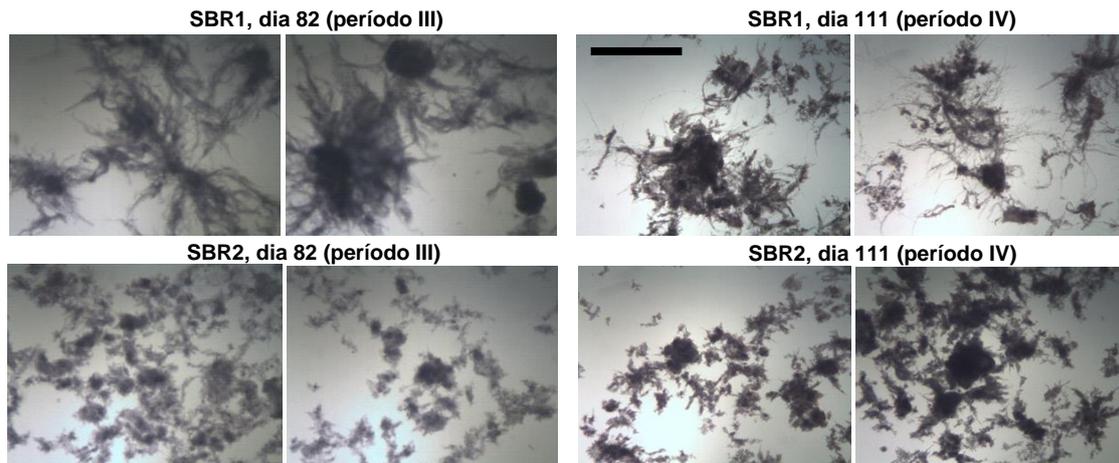


Figura 6.6 - Imagens de microscopia (ampliação de 40x) de amostras de biomassa do SBR1 (controlo) e SBR2 (com corante) durante o período experimental III e IV. A barra corresponde a 1 mm.

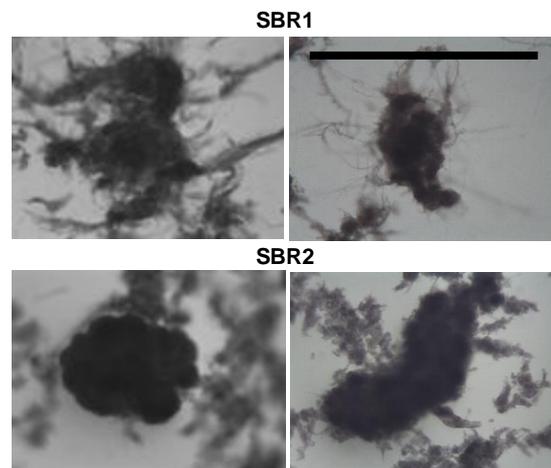


Figura 6.7 - Imagens de microscopia (ampliação de 100x) de amostras de biomassa do SBR1 (controlo) e SBR2 (com corante) durante o período experimental IV (dia 111). A barra corresponde a 1 mm.

6.4.2 Eficiência do tratamento

6.4.2.1 Transformação da fonte de carbono

Na Figura 6.8 encontram-se exemplos representativos do COD solúvel ao longo das 5 h de fase reacional do SBR1 (controlo) e SBR2 (com corante) para cada um dos períodos experimentais I, II, III e IV.

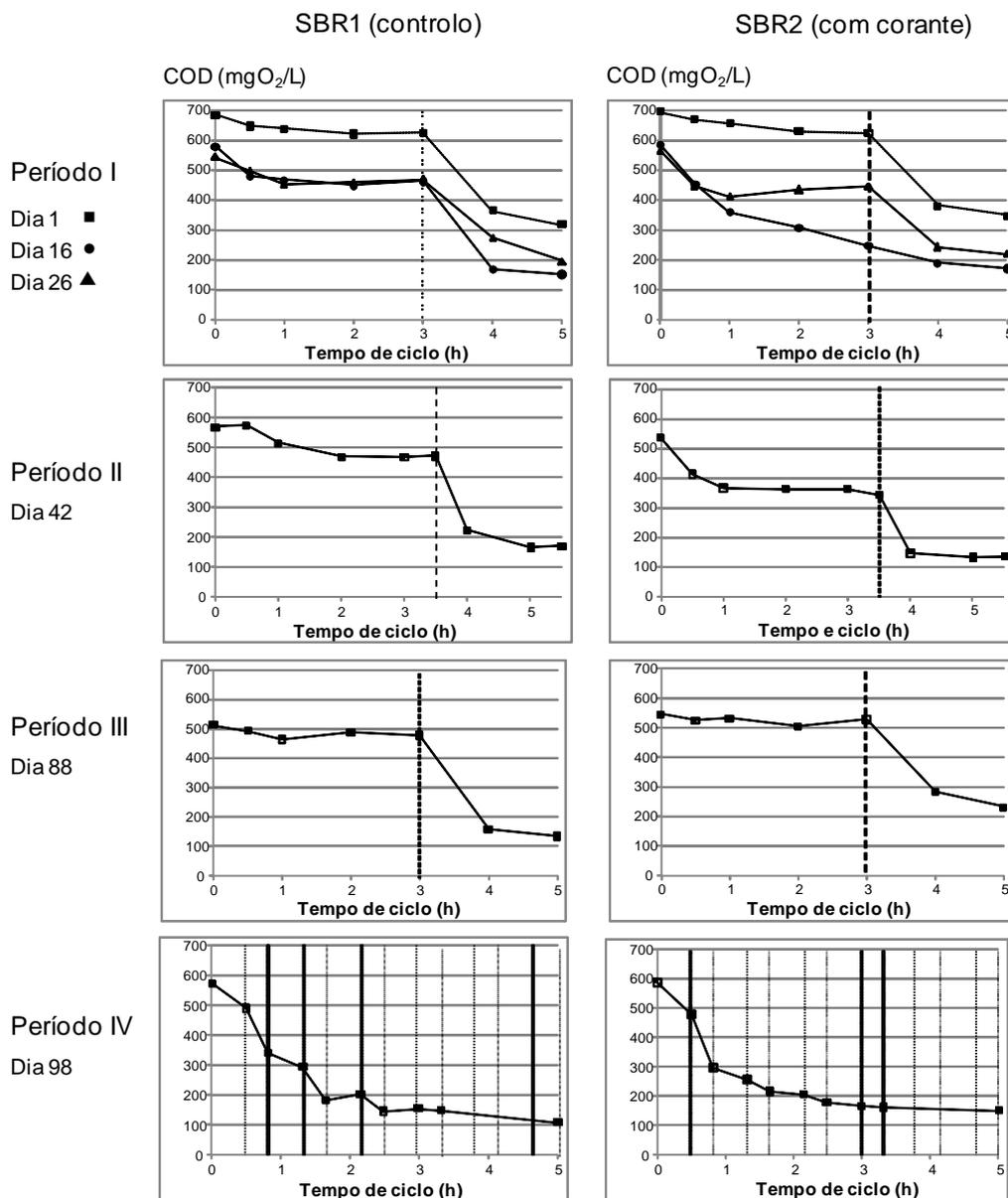


Figura 6.8 - Perfis representativos de remoção de COD solúvel ao longo das 5 h de fase reacional do SBR1 (controlo) e SBR2 (com corante) para cada um dos períodos experimentais I, II, III e IV. A linha vertical tracejada nos gráficos dos períodos I a II representa o início do arejamento; no período IV as linhas verticais representam a mudança entre fase arejada e fase não arejada, sendo a fase inicial não arejada.

O perfil do dia 1 (Figura 6.8) corresponde à resposta da biomassa não adaptada, o inóculo floculento proveniente da ETAR Municipal de Chelas, Lisboa. Após cerca de duas semanas, o desempenho na remoção de COD evoluiu para o perfil típico do período I com uma remoção global de COD de cerca de 70% em ambos os reatores. A remoção anaeróbia de COD no SBR2 (com corante) foi consistentemente mais elevada (até 30%) que no SBR1 (menos de 20%). O perfil de dia 16 no SBR2 foi atípico, não se tendo voltado a observar neste período experimental.

No período II com a fase anaeróbia alargada para 3,5 h, a remoção global de COD foi mantida ou até ligeiramente aumentada (75%) quando comparada com o período I, em especial no SBR2 (com corante). A remoção de COD na fase anaeróbia foi mantida no SBR1 mas aumentou no SBR2 atingindo os 36%.

Após o incidente de perda de biomassa, registaram-se no período III remoções globais de COD menores, por comparação com os períodos anteriores, baixando também muito a remoção no período anaeróbio (menos de 10%) em ambos os reatores.

No período IV, a remoção de COD na fase inicial anaeróbia subiu para 24% no SBR1 (controlo) e 30% no SBR2 (com corante). O regime de arejamento intermitente levou ao aumento da remoção global de COD, atingindo os 80%. Esta taxa de remoção global de COD é similar à observada com a mesma fonte de carbono (amido hidrolisado), em experiências anteriores com lamas ativadas floculentas em SBR anaeróbio/aeróbio, operado com ciclos de 24 h, dos quais 8 h ou mais eram em fase arejada (Lourenço et al., 2001, 2003, 2006). No entanto, é mais baixa que a obtida na presença de biomassa granular na experiência com o SBR1 operado com uma fase de reação totalmente arejada (Mata et al., 2012), na qual se obteve uma média de remoção de COD de 88%. Relativamente à remoção de COD na fase anaeróbia no SBR2 (com corante), esta é equivalente aos 30% aos obtidos por Lourenço et al. (2001) para o mesmo substrato, na presença do corante azo *Remazol Brilliant Violet 5R*, e uma idade de lamas de 15 dias, sendo que no período IV a idade de lamas média foi coincidente (15 dias).

De notar que o período com menor remoção de COD na fase anaeróbia no SBR2 (com corante) (10%) foi o período III, que corresponde à menor idade de lamas (7 dias), isto foi também observado anteriormente por Lourenço et al. (2001): 10% remoção para 10 dias de idade de lamas. Muda et al. (2010) obtiveram também uma baixa remoção anaeróbia de COD, de 15% (em 40 min) para uma idade de lamas de 8 dias no tratamento de efluente têxtil com grânulos aeróbios, sendo o substrato uma mistura de glucose, acetato e etanol (ver Tabela 3.2). Este período III, com a menor remoção de COD na fase anaeróbia (10%) corresponde também à granulação do SBR2 (com corante) onde se atingiu o valor de SVI

mais elevado (103 mL/g, Figura 6.4) e se observaram os menores agregados de biomassa (Figura 6.6). Aparentemente, um valor de idade de lamas igual ou superior a 15 dias é benéfica para a população microbiana responsável pela remoção de COD no período anaeróbio.

A maioria dos investigadores indica que é necessária a existência de um regime de fartura/fome para a obtenção de uma granulação aeróbia estável, independentemente de o ciclo ser totalmente aeróbio ou com uma fase anaeróbia inicial (Morgenroth et al. 1997, Beun et al. 2000a, Beun et al. 2001, Tay et al. 2001b, de Kreuk e van Loosdrecht 2004, McSwain et al. 2004, de Kreuk et al. 2005c), como discutido em 3.4.9 e em 5.4.2. Van Loosdrecht e de Kreuk (2006) indicam que para se obter bons grânulos, com velocidades de sedimentação elevadas, é determinante que a carga orgânica seja maioritariamente removida na fase anaeróbia, no mínimo 50% de remoção (de preferência 90%). Assim, a instabilidade verificada na granulação durante o presente estudo pode estar relacionada com a reduzida percentagem de remoção anaeróbia de COD que não favorece a existência deste regime de fartura/fome. De facto, verifica-se que os problemas na granulação foram mais acentuados no SBR1 (controlo), que teve em todos os períodos menor remoção de COD na fase anaeróbia em comparação com o SBR2 (com corante).

A melhor granulação obtida no SBR2 parece estar relacionada com a presença do corante azo. Este, ao funcionar como aceitador final de eletrões na respiração anaeróbia (descolorando), segundo o mecanismo proposto por Brigé et al. (2008) e Hong et al. (2009) apresentado na Figura 2.5, pode permitir uma vantagem adicional de energia disponível na fase anaeróbia para as células envolvidas. No entanto, é de realçar que a redução da ligação azo correspondente ao corante adicionado (20 mg/L, 50% de teor de corante, peso molecular 502,32 g/mol e uma ligação azo por molécula) corresponde a menos de 1 mgO₂/L como COD. Note-se ainda que, devido à composição escolhida para a solução de alimentação neste sistema experimental ser baixa em termos de azoto, (razão mássica COD/N/P de 100/3,7/30), não é expectável a formação significativa de nitrato, que poderia competir com vantagem (E⁰ elevado) com o corante azo como aceitador final desta reação.

É de referir ainda que este tratamento da água residual têxtil sintética por grânulos aeróbios, à exceção do período III (após a perda acidental de biomassa), atinge relativamente ao COD a qualidade necessária para descarga direta no meio recetor cujo limite é 150 mgO₂/L (ver Tabela 2.8), de acordo com o Anexo XVIII do Decreto-Lei 238/98.

6.4.2.2 Consumo específico de oxigénio e pH

O consumo específico de oxigénio (SOUR) medido nos ciclos ao longo dos quatro períodos experimentais pode ser encontrado na Tabela 6.2. O consumo de oxigénio (OUR) foi medido no início e no fim da fase arejada, correspondendo às horas de reação 3h01min e 4h55min nos períodos I e III, e às 3h31min e 5h25min no período II. Os valores medidos no período IV correspondem ao início da primeira e sexta fase de arejamento, nomeadamente às 0h31min e 4h55min de tempo de reação.

No início da fase aeróbia obtiveram-se valores elevados de SOUR, e no fim valores muito mais baixos como esperado. Os valores nos dois reatores foram relativamente similares. Os valores de SOUR iniciais dos períodos I e III, com uma média de 75 mgO₂/(gMLVSS.h), estão perto do valor reportado por Tay et al. (2001b), que foi de 69 mg mgO₂/(gMLVSS.h) para grânulos com glucose como fonte de carbono, num sistema apenas com fase de reação aeróbia, e ligeiramente acima tanto do valor obtido para o SBR1 só com reação aeróbia (média de 55 mgO₂/(gMLVSS.h) (Mata et al. 2012), como do valor reportado por Muda et al. (2010). Este último corresponde a 51 mgO₂/(gMLVSS.h), medidos no início do período de reação aeróbia (após fase anaeróbia) num sistema que tratava um efluente têxtil composto por uma mistura de glucose, acetato e etanol.

Tabela 6.2 - Consumo específico de oxigénio (SOUR) medido nos ciclos ao longo dos quatro períodos experimentais (I-IV). Os valores medidos no período IV correspondem ao início da primeira e sexta fase de arejamento.

Período	Dia	SOUR [mgO ₂ /(gMLVSS.h)]			
		SBR1		SBR2 (corante)	
		Início do arejamento	Fim do arejamento	Início do arejamento	Fim do arejamento
I	10	79	15	66	18
	17	62	15	66	16
	27	62	17	75	12
II	41	116	29	73	15
III	69	57	19	70	25
	87	75	16	100	19
IV	103	39	14	41	7
	109	41	17	49	8

No entanto, no período IV (arejamento intermitente), o SOUR foi significativamente mais baixo no início da fase arejada, em ambos os reatores, com uma média de 43 mgO₂/(gMLVSS.h), quando comparado com os períodos anteriores e com os valores acima referenciados. Os valores de SOUR no fim do período reacional também foram mais baixos no SBR2 (com corante), quando comparado com os períodos I-III, e equivalentes aos

obtidos na experiência com o SBR1 só com fase aeróbia, onde se obteve uma média de $9 \text{ mgO}_2/(\text{gMLVSS}\cdot\text{h})$ (Mata et al. 2012). O mesmo não se verificou para o SBR1.

Na Figura 6.9 apresentam-se perfis típicos representativos da variação de pH ao longo do ciclo, para cada um dos quatro períodos experimentais, não se tendo observado diferenças significativas entre o SBR1 (controlo) e o SBR2 (com corante). Verifica-se que, apesar do tampão fosfato incluído no efluente têxtil sintético ser suficiente para manter os valores de pH na gama de 6,2-6,8, há uma acidificação consistente durante a fase anaeróbia, que é rapidamente revertida após o início do arejamento. Este comportamento é provavelmente devido à rápida fermentação da fonte de carbono com produção de ácidos gordos voláteis e seu consumo subsequente. Assim, parece haver equivalentes redutores rapidamente disponíveis para a descoloração.

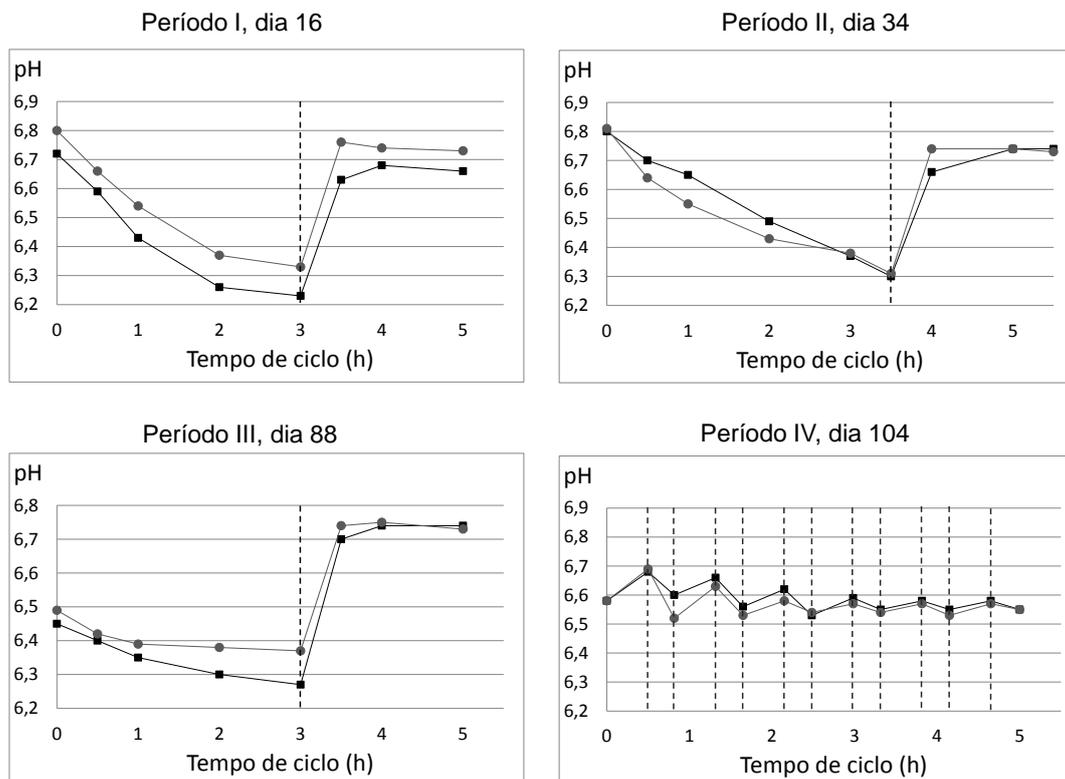


Figura 6.9 - Perfis típicos representativos da variação de pH ao longo do ciclo para cada um dos quatro períodos experimentais. SBR1 - controlo, (■) e SBR2 - com corante (●). A linha vertical tracejada nos gráficos dos períodos I a II representa o início do arejamento; no período IV as linhas verticais representam a mudança entre fase arejada e fase não arejada, sendo a fase inicial não arejada.

6.4.2.3 Descoloração do corante

Apresentam-se na Figura 6.10 perfis típicos representativos da variação da concentração de corante azo no SBR2 ao longo do ciclo, para cada um dos quatro períodos experimentais. Os resultados correspondem à cor residual medida por espectrofotometria a 515 nm (máxima absorvência do corante).

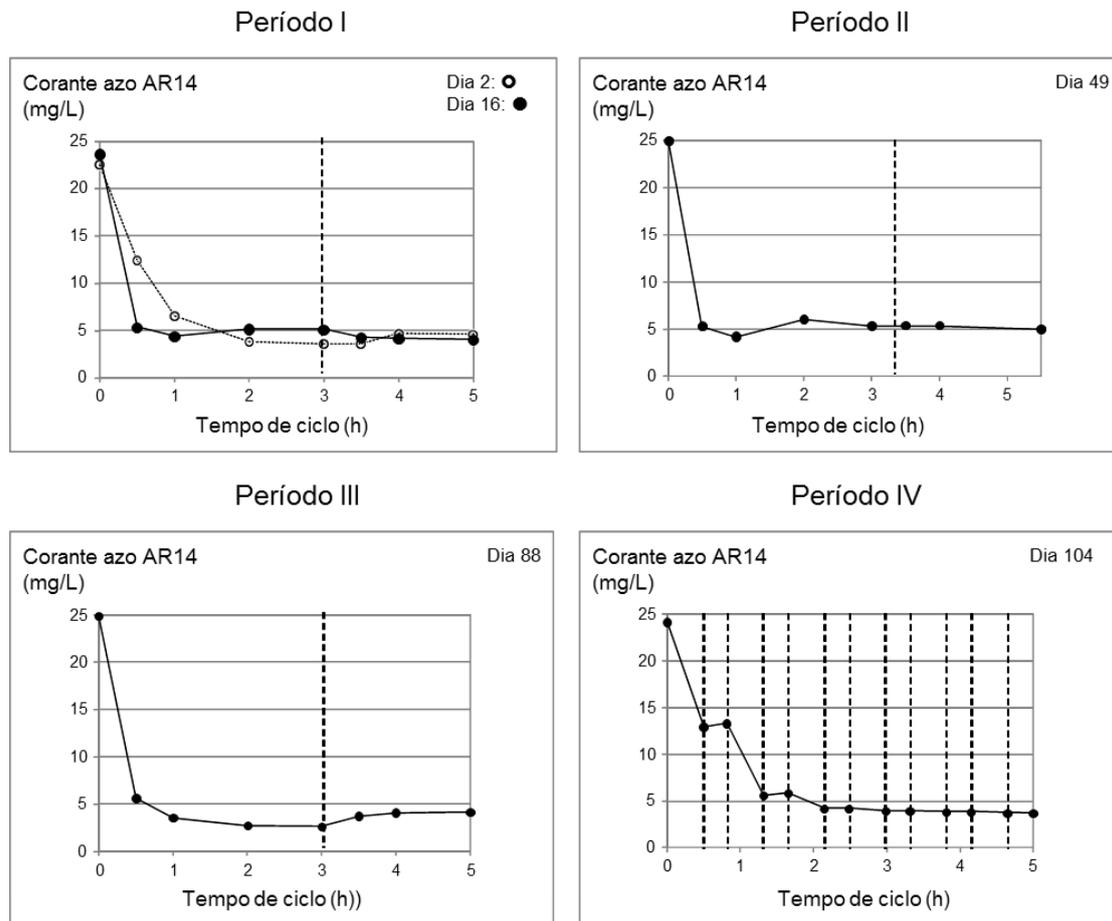


Figura 6.10 - Perfis típicos representativos da variação da concentração de corante (SBR2) ao longo do ciclo (espectrofotometria, 515 nm) para cada um dos quatro períodos experimentais. A linha vertical tracejada nos gráficos dos períodos I a III representa o início do arejamento; no período IV as linhas verticais representam a mudança entre fase arejada e fase não arejada, sendo a fase inicial não arejada.

A remoção de cor ao longo do ciclo manteve-se estável na gama dos 80 a 85% durante todo o período experimental, de acordo com a biodescoloração reportada por outros autores para este corante (Seshadri et al. 1994, Al-Amrani et al. 2014). Confirma-se também que a remoção de cor ocorre somente na fase anaeróbia de acordo com o indicado por vários autores (Lourenço et al. 2000, Peace et al. 2003, dos Santos et al. 2007, Solis et al. 2012). Além disso, verifica-se observando a Tabela 6.3, que nos períodos I a III a remoção de cor se dá essencialmente nos primeiros 30 min de reação anaeróbia. As exceções são apenas durante a adaptação do inóculo (dia 2) e no período de recuperação após o incidente de

perda de biomassa (dias 58 e 63). Contudo, no regime intermitente a remoção de cor nos primeiros 30 min da fase anaeróbia baixou para metade. Isto indica que o regime intermitente altera a população presente, ou pelo menos induz uma resposta diferente da mesma. Gonzalez-Martinez et al. (2010) reportaram respostas diferentes em termos de descoloração de um corante azo (*Direct Blue 2*) apesar da manutenção do mesmo HRT e dos respetivos períodos globais de tempo de reação em cada uma das fases anaeróbia/aeróbia. Estes autores obtiveram menor descoloração (45%) num regime alternado (12 h / 12 h), do que num regime combinado, em que a parte inferior do biofiltro (SBR) era anaeróbia (entrada da alimentação) e parte superior do biofiltro tinha arejamento. É de realçar no entanto que, ao contrário do reportado por estes autores, no SBR2 (com corante) a remoção global de cor se manteve elevada, nos mesmos níveis dos períodos experimentais anteriores.

Tabela 6.3 – Exemplos de remoção de cor obtidos no SBR2 (com corante) ao longo dos períodos experimentais I a IV. Valores medidos espectrofotometricamente a 515 nm.

Período	Dia	Remoção de cor (%)	
		Após os primeiros 30 min de reação anaeróbia	No fim da fase reacional (anaeróbia+aeróbia)
I	2	45	79
	16	77	83
	26	79	81
II	42	87	82
	49	79	80
III	58	49	83
	63	64	84
	88	78	84
IV	104	47	85
	112	46	85

É necessário ressaltar que a medição de cor a 515 m não reflete inteiramente a concentração residual do corante *Acid Red 14* ao longo dos ciclos de operação do SBR2, pois após a descoloração durante a fase anaeróbia observa-se o desenvolvimento de cor acastanhada durante a fase de reação arejada. Isto é provavelmente devido a reações envolvendo os metabolitos de redução do corante azo, incluindo a amina instável *orto* 2-amino-4-hidroxi-1-naftaleno-sulfonato (2A4H1NS). Vários autores referem que as aminas aromáticas *orto* podem formar oligómeros ou mesmo polímeros insolúveis (Field et al. 1995, Kudlich et al. 1999, Pereira et al. 2009), em especial na fase aeróbia. No entanto, neste caso não se detetou visualmente a existência de precipitados.

Na Figura 6.11 podem observar-se cromatogramas de HPLC de amostras recolhidas ao longo de um ciclo de operação do SBR2 (dia 16, período I). O perfil de metabolitos observado é representativo de todo o período experimental, à exceção do período IV para a amostra correspondente a 30 minutos de reação anaeróbia.

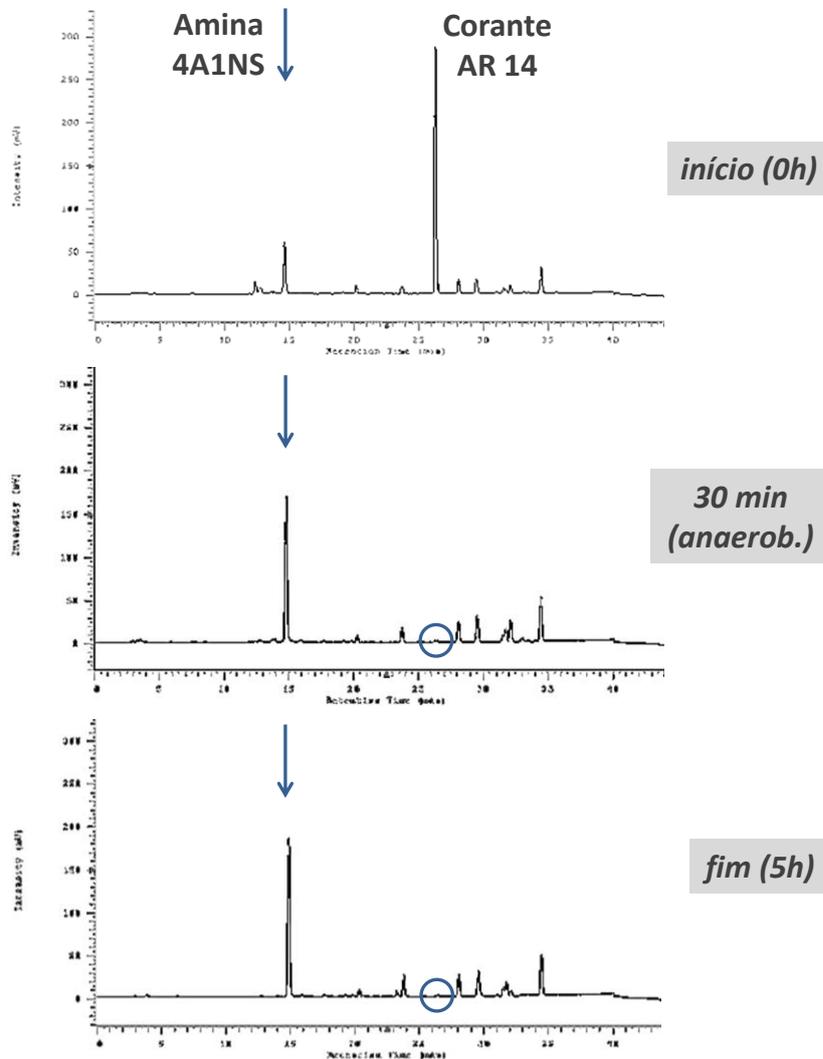


Figura 6.11 – Cromatogramas de HPLC de amostras (centrifugadas) recolhidas ao longo de um ciclo de operação do SBR2 (dia 16, período I). O perfil de metabolitos formados ao longo da reação é representativo de todo o período experimental (à exceção do período IV aos 30 min). O pico do corante AR14 e o pico de uma das aminas resultantes da redução do corante (4A1NS) foram identificados e quantificados através de padrões. A outra amina (2A4H1NS) é instável e não foi possível identificá-la. Nota: foi usada a mesma escala (x,y) nos três cromatogramas.

Como se pode ver na Figura 6.11, após 30 minutos de reação anaeróbia já se encontrava presente menos de 1% do corante azo inicial, em contraste com cerca de 80% de remoção de cor medida espectrofotometricamente em alíquotas da mesma amostra. Estes elevados níveis de remoção de corante revelados por HPLC, justificam o facto da extensão da fase anaeróbia para 3,5 h no período II não ter melhorado os níveis de descoloração determinados espectrofotometricamente.

O cromatograma obtido após 5 h de reação aeróbia é praticamente idêntico ao obtido após 30 min de reação anaeróbia, o que indica que a fase arejada não promoveu a degradação dos metabolitos da redução do corante. As dificuldades na mineralização aeróbia de aminas sulfonadas têm sido reportadas por vários investigadores (Lourenço et al. 2001, Pinheiro et al. 2004, van der Zee e Villaverde 2005), inclusivamente para a amina 4A1NS (Seshadri et al. 1994, Tan et al. 2005a). De facto, apesar de Koupaie et al. (2013) terem indicado uma remoção de 64% desta amina em condições aeróbias, a observação dos cromatogramas indica que há concomitantemente o aparecimento de um pico novo, com menor tempo de retenção (Koupaie et al. 2013, *supplementary data*), o que pode indicar a formação de um metabolito provavelmente mais oxidado e por isso mais polar, mas não a mineralização da amina aromática.

A Figura 6.12 apresenta os resultados obtidos por HPLC para a concentração do corante AR14 e da amina 4A1NS, no dia 16 (período I) e no dia 104 (representativo do período IV). Estes resultados confirmaram a remoção incompleta de cor após os primeiros 30 min da fase anaeróbia no período IV, como determinado anteriormente por espectrofotometria (Figura 6.10 e Tabela 6.3), tendo-se atingido a remoção completa na segunda etapa anaeróbia. Isto indica que a redução da ligação azo foi interrompida pelo arejamento entre as duas etapas anaeróbias. A presença de oxigénio, sendo um aceitador de eletrões mais eficiente que o corante azo, justifica esta interrupção (dos Santos et al. 2007).

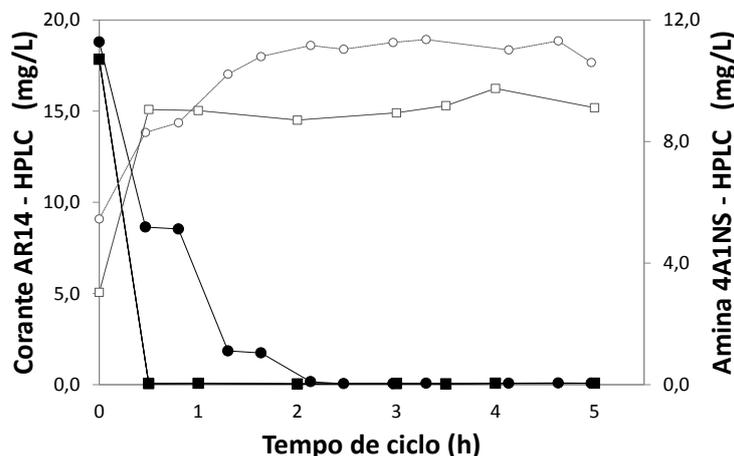


Figura 6.12 – Concentração do corante azo AR14 (símbolos fechados) e de um dos seus metabolitos de redução, a amina 4A1NS (símbolos abertos), determinados por HPLC ao longo da reação do SBR2 no dia 16, período I (■, □) que são representativos dos períodos experimentais I, II e III e do dia 104, representativo do período IV (●, ○). O pico do corante AR14 e o pico da amina 4A1NS foram identificados e quantificados através de padrões. O desvio padrão dos duplicados das amostras foi <1%.

Relativamente à amina 4A1NS, é muito interessante observar que no período IV com arejamento intermitente parece haver um ligeiro aumento da sua concentração durante as

duas primeiras fases arejadas (20 minutos cada, situadas entre o 2º e o 3º, e o 4º e 5º pontos (●) do gráfico da Figura 6.12), o poderia indicar a capacidade da biomassa granular em continuar a descoloração mesmo na presença de oxigénio. Dar-se-ia a respiração anaeróbia e a redução do corante azo pela aceitação de eletrões a partir da população localizada no interior dos grânulos (ver mecanismo na Figura 2.5), no entanto, as diferenças observadas não são suficientemente significativas para o comprovar.

Em resumo, foi obtida uma remoção praticamente total de corante azo e o efluente tratado cumpre as normas gerais Anexo XVIII do Decreto- Lei 238/98 para a descarga de águas residuais industriais no que respeita à cor (não visível numa diluição 1:20 – resultados não apresentados). Os produtos de biorredução do corante azo mantêm-se no efluente, no entanto está reportado que a amina 4A1NS não é tóxica (Tan et al. 2005a) nem mutagénica (Gottlieb et al. 2003, Hong et al. 2007b), por isso considera-se que o tratamento do corante azo AR14 por grânulos aeróbios foi obtido com sucesso.

6.4.2.4 Potencial de oxidação redução (ORP)

A monitorização do potencial de oxidação redução (ORP) foi realizada em alguns dos ciclos nos dois SBR e na Figura 6.13 encontram-se exemplos típicos de valores obtidos nos quatro períodos experimentais (os valores medidos foram convertidos para a base do elétrodo de hidrogénio padrão, E^0). Apesar das diferenças consistentes observadas nos perfis de ORP nos dois reatores (SBR1 e SBR2), os valores de oxigénio dissolvido foram similares, cerca de 0.05 mg O_2/L na fase anaeróbia e acima de 7 mg O_2/L na fase arejada. O SBR1 apresenta uma descida mais lenta do ORP na fase anaeróbia que o SBR2 (com corante), sendo que o último inicia esta fase já com um ORP de aproximadamente -50 mV (após fase de enchimento estático). Por outro lado, os valores de ORP no SBR2 tendem a estabilizar na gama dos -100 a -150 mV, incluindo no período em que a fase anaeróbia foi alargada (período II, Figura 6.13), enquanto no SBR1 os valores de ORP continuam a evoluir, atingindo até valores mínimos abaixo dos medidos no SBR2 (com corante).

No entanto, é de notar que a cinética de descoloração mais lenta (SBR2) observada no período IV com arejamento intermitente, (Tabela 6.3), não parece resultar de valores de ORP mais elevados, pois os valores de ORP mantiveram-se na gama dos -100 a -150 mV nas seis etapas anaeróbias (tal como nos períodos anteriores de I a III).

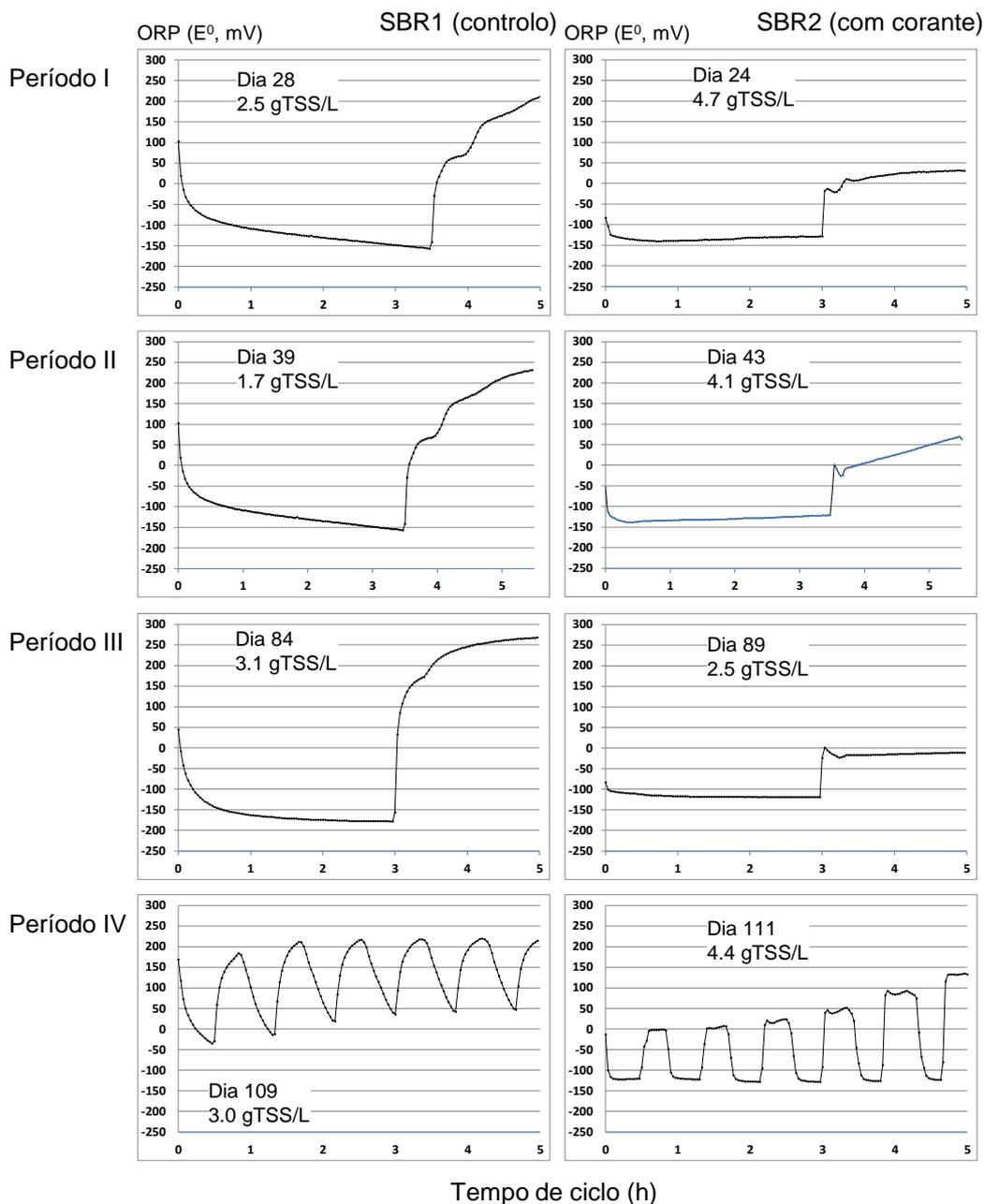


Figura 6.13 – Exemplos de perfis do potencial de oxidação redução (ORP) ao longo do ciclo para o SBR1 (controlo) e o SBR2 (com corante), para cada um dos períodos experimentais; em todos os perfis o aumento abrupto do ORP coincide com o início do arejamento.

O regime de arejamento intermitente (período IV) no SBR1 (controlo) é o que apresenta um perfil com diferenças mais significativas relativamente aos períodos anteriores, com valores mínimos de ORP nas etapas anaeróbias de -25 a +50 em contraste com os valores de -150 a -175 mV observados nos períodos anteriores (I, II, III). Por sua vez, os valores de ORP do SBR1 na última etapa arejada (IV) são similares aos dos períodos anteriores (I a III). Da mesma forma, também aqui, apesar das diferenças significativas observadas no período IV para os dois reatores em termos de perfil de ORP, os resultados do oxigénio dissolvido são similares, como se pode ver na Figura 6.14, notando-se apenas no início do ciclo valores ligeiramente mais elevados no SBR1 (controlo) nas fases arejadas.

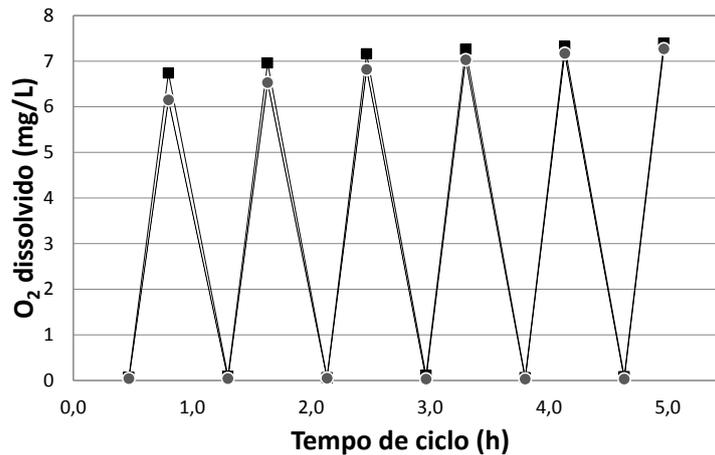


Figura 6.14 - Exemplos de perfis de oxigênio dissolvido para o período experimental IV (arejamento intermitente) ao longo de um ciclo para o SBR1 (■) e o SBR2 (com corante; ●). Os valores correspondem ao final de cada etapa anaeróbia ou arejada.

No início do arejamento ambos os reatores apresentaram perfis de ORP com um “ombro” inicial (Figura 6.13), sugerindo a existência de substâncias reduzidas acumuladas na fase anaeróbia a serem oxidadas de imediato (e.g. ácidos gordos voláteis). A sua depleção subsequente leva à segunda elevação dos valores de ORP. Também nos resultados do oxigênio dissolvido dos investigadores Muda et al. (2010) se observa este “ombro” na passagem da fase anaeróbia para aeróbia durante o tratamento de um efluente têxtil por grânulos aeróbios. A Figura 6.15 corrobora a interpretação sugerida, pois o arejamento da amostra após reação biológica de anaerobiose, na ausência de biomassa, não produz este tipo de perfil. Este fenómeno (“ombro”) é menos pronunciado no SBR1, tornando-se impercetível neste reator no período de arejamento intermitente (IV). Pelo contrário, no SBR2 (com corante) os valores de ORP quase não sobem acima do nível registado no “ombro” inicial, em particular no período III e IV. Este comportamento poderá estar relacionado com a presença de metabolitos da redução do corante azo, em particular da amina instável (2A4H1NS) que pode sofrer reações de oxidação, como é sugerido pelo desenvolvimento de cor já descrito. Estas reações são mediadas biologicamente, como comprova a Figura 6.15, em que a fase arejada na ausência de biomassa atinge um $E^0 = 190$ mV, enquanto na presença de biomassa a fase arejada no ciclo de reação biológica correspondente atingiu um máximo de 65 mV (ver Figura 6.13). Os valores de ORP na ausência de arejamento que se observam na Figura 6.15 são coincidentes com os -100 mV mencionados na literatura como valor de ORP típico dos pares corante azo/amina aromática (Libra et al. 1997, Lourenço e Pinheiro 2003).

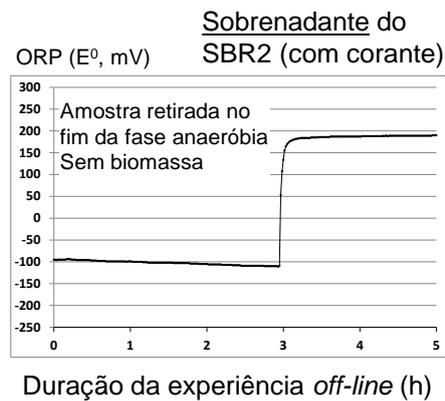


Figura 6.15 - Exemplo de perfil do potencial de oxidação redução (ORP) de amostra de sobrenadante do SBR2 recolhida na fase final da reação anaeróbia (representativa dos períodos I, II e III), ao longo de 3h sem arejamento seguida de 2h com arejamento. O aumento abrupto do ORP coincide com o início do arejamento.

6.5 Conclusões

A formação de grânulos aeróbios num SBR não tubular na presença de um efluente têxtil simulado contendo um corante azo foi efetuada com sucesso. A estratégia operacional testada, nomeadamente uma fase de reação anaeróbia de 3 ou 3,5 h e a redução do tempo de sedimentação para 4 ou 5 minutos, além de induzir a granulação, revelou uma boa remoção global de COD (80%) e de cor ($\geq 80\%$). Os resultados principais para o SBR de teste (com corante) e para o SBR controlo (sem corante) foram:

- Apesar de se ter obtido grânulos bem definidos aos 21 dias de operação no SBR de teste (com corante) e no SBR controlo (sem corante), a granulação completa com valores de SVI_5 e SVI_{30} similares não foi atingida; as imagens de microscopia sugerem que isto resultou da persistência de biomassa floculenta agravada pela existência de material polimérico disperso e crescimento filamentoso no SBR controlo (sem corante);

- A remoção de COD na fase anaeróbia foi significativamente mais alta no SBR de teste (com corante) do que no SBR controlo e coincidente com idade de lamas mais elevada (15 dias);

- A formação de grânulos aeróbios foi melhor conseguida na presença do efluente têxtil simulado contendo corante. A presença de corante aparentemente favoreceu o processo de granulação, possivelmente devido à energia adicional obtida pela respiração anaeróbia associada à redução do corante, que apesar de quantitativamente ter pouco significado, pode funcionar como um estímulo intracelular, obtendo-se um melhor desempenho na fase anaeróbia do SBR de teste (com corante) do que no SBR controlo;

- O SBR de teste (com corante) apresentou perfis de ORP marcadamente diferentes do SBR controle, tanto na fase anaeróbia como na fase aeróbia, atribuíveis à presença do corante e seus metabolitos, sendo ainda pouco claro se este fator afetou a granulação;
- A mudança para o regime de arejamento intermitente reduziu o EPS difuso do SBR de controle (sem corante) e levou à formação de agregados mais densos em ambos os reatores, mas sem que a granulação completa fosse atingida durante o período experimental reportado; a remoção global de COD e corante mantiveram-se elevadas, mas a taxa inicial de redução do corante baixou para metade;
- Em termos de legislação ambiental pode-se considerar que o tratamento do efluente têxtil simulado por grânulos aeróbios foi obtido com sucesso, cumprindo as normas gerais do Anexo XVIII do Decreto-Lei 238/98 para a descarga de águas residuais, no que respeita aos valores de COD e cor no efluente final, apenas os sólidos suspensos totais no efluente precisam de ser melhorados, o que se prende com a obtenção de uma granulação completa.

(intencionalmente em branco)

**7 TRATAMENTO DUM EFLUENTE TÊXTIL SIMULADO EM
BIORREATOR LABORATORIAL INOCULADO COM
GRÂNULOS AERÓBIOS DA ETAR DE FRIELAS**

7.1 Resumo

O objetivo desta etapa do trabalho foi testar a possibilidade de adaptação de um inóculo de lamas aeróbias granulares, colhido no biorreator de demonstração da ETAR de Frielas, à operação de um SBR laboratorial não tubular, alimentado com uma água residual têxtil simulada contendo o corante azo *Acid Red 14*. Foram operados dois biorreatores em paralelo, um sem corante na alimentação, mantendo o ciclo de 6 h das quais 5 h de reação, mas com redução do tempo de reação anaeróbia para 1,5 h (3,5 h sob arejamento). Logo após a inoculação, observou-se que a agitação mecânica utilizada na fase reacional do SBR provocou a desintegração dos grânulos do inóculo inicial. Tal aconteceu mesmo com um nível de agitação baixo (cerca de 60 rpm) e apenas durante a fase anaeróbia. Estas condições conduziram ao desenvolvimento de uma biomassa com grânulos de menor dimensão mas de sedimentabilidade excelente (SVI_5 e SVI_{30} de 15 e 17 mL/g, respetivamente). Após a fase de estabilização, tanto dos indicadores de desempenho como da morfologia dos grânulos, verificou-se que o grau de remoção de cor se mantinha em cerca de 82%, apesar da duração reduzida da fase anaeróbia. Foi possível acumular biomassa no sistema atingindo-se um valor de idade de lamas de 35 dias. A diminuição deste parâmetro de 35 para 15 dias, por introdução de uma purga controlada de biomassa, fez diminuir a eficiência de remoção de cor de 82 para 57%. Após recuperação da idade de lamas elevada, pela primeira vez as análises por HPLC revelaram o desaparecimento durante a fase aeróbia do pico cromatográfico correspondente à 4-amino-1-naftaleno-sulfonato, um dos metabolitos primários da biorredução do AR14, sem o aparecimento concomitante de outros metabolitos identificáveis pelo método de HPLC empregue, o que sugere uma degradação mais completa, ou mesmo a mineralização total. Sugere-se, assim, que o sistema de grânulos aeróbios aqui estabelecido permitiu o desenvolvimento de biomassa com capacidades de biodegradação de amins aromáticas que não são usuais em flocos de lamas ativadas.

7.2 Introdução

A tecnologia de lamas ativadas granulares aeróbias é um processo muito promissor para o tratamento de águas residuais, com a vantagem de uma rápida sedimentação e elevada concentração de biomassa, permitindo o tratamento de efluentes muito carregados e contendo compostos tóxicos (de Bruin et al. 2004, Adav et al. 2007). Este sistema melhora também os sistemas de lamas ativadas convencionais pelo menor consumo de energia e produtos químicos, por ser um sistema mais compacto e mais favorável em termos de capital inicial e custos operacionais (Giesen et al. 2013, Inocêncio et al. 2013). Existem já alguns exemplos de implementação destes sistemas à escala real, como o tratamento de efluentes industriais da indústria alimentar e a construção de raiz da primeira ETAR para o tratamento de águas residuais urbanas em Epe, Holanda, com o processo *Nereda*®, (Giesen et al. 2013)

A aplicação desta tecnologia para o tratamento de efluentes têxteis é muito promissora mas encontra-se ainda numa fase inicial, estando a dar os primeiros passos (Muda et al. 2010, Muda et al. 2011, Kolekar et al. 2012, Lotito et al. 2012b, Mata et al. 2015). No primeiro estudo de tratamento de um efluente têxtil sintético contendo um corante azo em SBR não tubular agitado, foram obtidas boas eficiências de remoção de cor e carga orgânica, mas a granulação completa com valores de SVI_5 e SVI_{30} próximos não foi atingida (Mata et al. 2015).

O objetivo deste trabalho foi testar diferentes condições de operação, no mesmo SBR não tubular, com vista à obtenção uma granulação mais estável, sendo a alteração mais importante a redução da fase anaeróbia de 3 para 1,5 h, pois parece suficiente para a biorredução do corante azo e permite uma fase aeróbia mais longa que pode levar a uma melhor granulação de acordo com os resultados obtidos por Mata et al. (2012) com uma única fase aeróbia de 5 h. Pretendeu-se também estudar a influência das condições hidrodinâmicas e da geometria do SBR ($H/D = 2,5$) na dimensão dos granulos e na manutenção da sua integridade. Com este propósito, o SBR não tubular foi inoculado com granulos aeróbios, recolhidos num reator de demonstração do processo *Nereda*® na ETAR de Frielas, e operado na presença do efluente têxtil sintético contendo o corante azo AR14.

7.3 Materiais e Métodos

Os materiais e métodos são equivalentes aos descritos no Capítulo 6 e em Mata et al. (2015) pois a instalação experimental é a mesma, com os dois SBR não tubulares, SBR1 e

SBR2. As diferenças consistem no inóculo inicial, que foram lamas ativadas granulares (e não floculentas) e na alimentação do corante azo que passou a ser efetuada pelo fundo do reator. Adicionalmente, houve uma redução do período anaeróbio para 1,5 h e uma extensão do período aeróbio para 3,5 h, mantendo um total de 5 h de reação. Utilizou-se ainda, pela primeira vez, um método de avaliação da dimensão dos grânulos por peneiração.

7.3.1 Inóculo e substratos

Inóculo de Lamas Ativadas: Os reatores foram inoculados com lamas ativadas granulares recolhidas no reator de demonstração Nereda® na ETAR Municipal de Frielas (Loures, Lisboa). Antes de ser utilizada a biomassa foi sedimentada e lavada duas vezes com água da torneira arejada. A concentração inicial no reator foi ajustada para um teor em sólidos suspensos totais (TSS) de $\approx 2,5$ g/L.

Fonte de carbono (solução-mãe): A fonte de carbono usada consistiu num derivado de amido denominado Emsize E1 (hidroxipropil-amido, Emsland-Starke GmbH, Alemanha). Este foi pré-hidrolisado em condições alcalinas (NaOH) seguido de ajuste de pH a 7,0 (HCl) e diluído com água desionizada a 100 g/L, de acordo com o descrito anteriormente por Lourenço et al. (2001) e O'Neill et al. (2000).

Corante azo (solução-mãe): O corante azo testado foi o *Acid Red 14* (Chromotrope FB, Sigma-Aldrich, com um teor de corante de 50%, Figura 2.1), sendo usado diretamente sem nenhuma etapa adicional de purificação. O corante foi dissolvido em água desionizada a 3,0 g/L.

Solução base de alimentação: A solução de alimentação foi preparada em água desionizada utilizando a solução-mãe da fonte de carbono, diluída a 1000 mg O₂/L, e suplementada com tampão fosfato para manutenção do pH e outros nutrientes. As concentrações foram as seguintes: KH₂PO₄ (760 mg/L), Na₂HPO₄.12H₂O (2310 mg/L), NH₄Cl (140 mg/L), MgSO₄.7H₂O (23 mg/L), CaCl₂ (28 mg/L), FeCl₃.6H₂O (250 µg/L), MnSO₄.4H₂O (40 µg/L), H₃BO₃ (57 µg/L), ZnSO₄.7H₂O (43 µg/L), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (35 µg/L). Todos os sais utilizados foram de grau analítico. Esta solução corresponde à razão mássica COD/N/P de 100/3,7/30.

Efluente têxtil sintético: Este efluente corresponde à solução de alimentação contendo corante e foi obtido adicionando 10 mL da solução-mãe de corante a 750 mL de solução base de alimentação. A solução-mãe de corante foi adicionada (pelo fundo) diretamente ao

SBR2 em cada ciclo, no final da fase de enchimento, correspondendo a uma concentração de 20 mg/L de corante no licor misto.

7.3.2 Sistema Experimental

O sistema experimental incluiu dois SBR com um volume de trabalho de 1,5 L, operados nas mesmas condições com exceção da alimentação. O SBR1 foi alimentado com a solução de alimentação base e o SBR2 foi alimentado em todos os ciclos com a solução de alimentação base e o corante azo, ou seja o efluente têxtil sintético.

Um esquema do sistema reacional é apresentado na Figura 7.1. Cada SBR tem um volume de 1,5 L e uma razão altura/diâmetro de 2,5 relativamente ao volume de trabalho. A solução de alimentação foi inserida pelo fundo do reator, ao nível do difusor de ar, sendo utilizada uma bomba peristáltica para cada reator. O corante azo foi alimentado também pelo fundo do reator ao SBR2 com uma bomba peristáltica independente. A descarga rápida foi realizada com única bomba de carretes para os dois reatores. O arejamento foi efetuado através de um compressor ligado a uma membrana difusora porosa colocada no fundo de cada reator. O caudal de ar foi aproximadamente de 3,0 L/min em cada reator, correspondendo a uma taxa de arejamento de 2 v.v.m (volume de ar por volume de líquido por minuto).

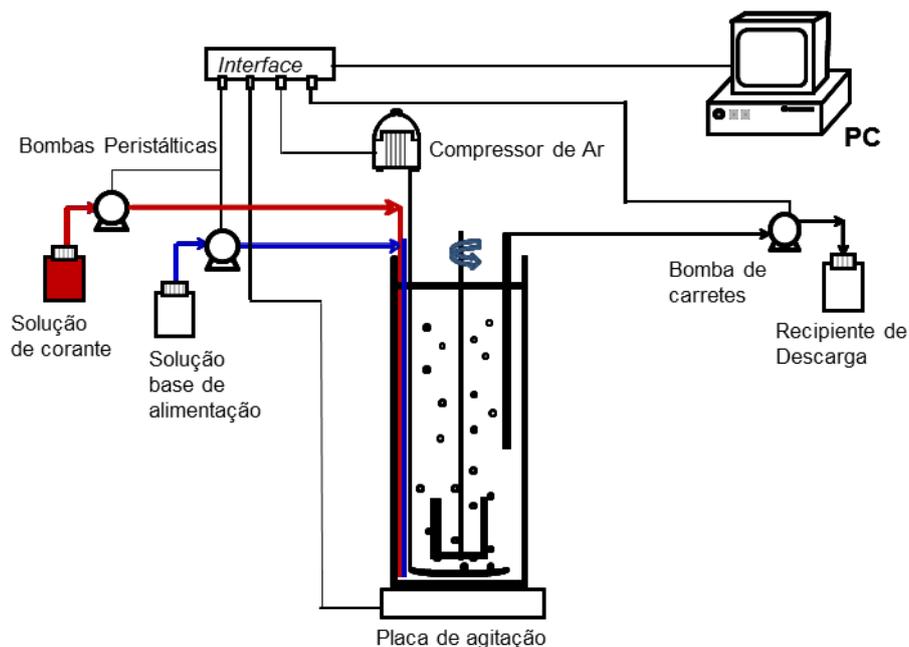


Figura 7.1 - Esquema do sistema reacional para o SBR2 (alimentação com efluente têxtil sintético contendo o corante azo AR14)

As funções de bombagem, arejamento e agitação foram automaticamente controladas, via uma interface, através de um programa dedicado instalado num PC.

Os reatores foram operados com um ciclo de 6 horas, compreendendo 5 h de reação, e 1h repartida entre o enchimento, sedimentação, descarga e paragem (*idle*). A reação incluiu um período anaeróbio com agitação seguido de um período aeróbio (sem agitação mecânica). O tempo de enchimento (sem agitação e sem arejamento) foi fixado em 15 minutos e o tempo de descarga a 1 minuto (descarga rápida). A *volumetric exchange ratio* foi de 50%, sendo o efluente removido a meia altura do volume útil do reator o que corresponde a um tempo retenção hidráulico de 12h.

O pH não foi controlado, mas foi mantido entre 6,5 a 6,7 pela presença do tampão fosfato na solução de alimentação base. Os reatores foram operados à temperatura ambiente, a uma temperatura média de 23°C.

A remoção deliberada de biomassa dos reatores foi limitada às necessidades de amostragem para que se desse uma acumulação de biomassa. A maior perda ocorreu na descarga do efluente tratado (descarga de 50% do volume em cada ciclo, após sedimentação). A idade de lamas foi controlada apenas entre os dias 50 e 60 (onde se ajustou para 15 dias).

7.3.3 Métodos Analíticos

Todos os parâmetros foram medidos em amostras recolhidas dos reatores. Para a determinação da carência química de oxigénio (COD), concentração de corante e pH, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 4000 r.p.m., e as medidas efetuadas no sobrenadante. O COD foi determinado através do método normalizado (APHA 1998). A contribuição do corante azo para o valor de COD (a um máximo de 20 mg/L) foi medida e revelou-se insignificante, abaixo do limite de deteção do método ($\leq 10 \text{ mgO}_2/\text{L}$).

Os **sólidos suspensos totais** (TSS) e os sólidos suspensos voláteis (VSS) foram medidos através de métodos normalizados (APHA 1998) em amostras de licor misto retiradas dos biorreatores e em amostras do efluente descarregado. O índice de volume de lamas (SVI) foi determinado pelo volume ocupado pela lama sedimentada de 1 litro de licor misto, após sedimentação de 5 min (SVI₅) e 30 min (SVI₃₀), dividido pelo respetivo valor de TSS; esta medição foi efetuada *offline* num cone Imhoff e o licor misto foi prontamente retornado ao reator.

A **concentração de corante** azo foi determinada espectrofotometricamente, por leitura da absorvência das amostras a 515 nm (comprimento de onda de absorvência máxima do corante, na região do visível), contra água desionizada. O espectrofotômetro utilizado foi o Specord 200 (Analytik Jena, Alemanha) com células de quartzo com 1 cm de comprimento de percurso ótico.

As amostras centrifugadas (sobrenadante) foram analisadas por **cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)** utilizando um sistema Merck-Hitachi (Alemanha), que compreende uma bomba inteligente L-6200A, um detetor UV-Vis L-4250 e um amostrador automático L-7200, com uma interface D7000 controlada por computador. O sistema estava equipado com uma coluna de fase reversa RP-18, LiChroCART 250-4 (Merck, Alemanha) e a detecção espectrofotométrica foi realizada a 220 nm. A fase móvel foi composta por tampão de fosfato de sódio (25 mM, pH = 5,5) e acetonitrilo (tampão:acetonitrilo), com um caudal de 0,7 mL/min, com o seguinte programa: um gradiente linear de 30 min de 100:0 a 50:50 (v/v), seguido de um gradiente linear de 5 minutos até 15:85 (v/v) e terminando com um passo de 100:0 mantido por um período adicional de 10 min. A identificação e quantificação dos picos foi realizada através de soluções padrão de corante *Acid Red 14* e de amina 4A1NS (4-amino-1-naftaleno sulfonato) (Sigma, EUA), ambos em água desionizada. O desvio padrão (STD) do método foi determinado com valores obtidos em 10 ensaios para a mesma amostra. Para a amostra padrão de 1 mg/L obteve-se um STD de 5,7% para o corante e 2,7% para a amina. Para a amostra padrão de 10 mg/L obteve-se um STD de 1,0% para o corante e 0,5% para a amina.

Foram observadas amostras de biomassa através de uma **lupa estereoscópica** (Stemi 2000-C, Zeiss) e através de um **microscópio** de transmissão de luz (BA200, Motic), equipados com câmara e respetivo *software* (Moticam 1000, Motic).

O valor de **pH** foi medido *offline* em amostras centrifugadas utilizando um elétrodo de vidro Metrohm 6.0202.100 ligado a um potenciômetro Metrohm 691.

A dimensão dos grânulos aeróbios foi acompanhada por **peneiração**, utilizando crivos de 0,65 mm (média de várias medições feitas na lupa) e de 0,25 mm (60 mesh). A quantidade de amostra peneirada foi de 20 mL e os peneiros foram lavados com 160 mL de água destilada. O teor em TSS de cada uma das três frações foi determinado por gravimetria após da filtração das mesmas. No caso da fração de menores dimensões (< 0,25 mm) a biomassa foi concentrada por centrifugação antes da filtração. Na Figura 7.2 encontra-se um exemplo da análise gravimétrica das três frações, > 0,65 mm, 0,65-0,25 mm e < 0,25 mm.



Figura 7.2 – Exemplo da determinação dos TSS de cada uma das frações das lamas granulares aeróbias (em cima à esquerda fração > 0,65 mm, em cima à direita fração entre os 0,65-0,25mm e em baixo fração <0,25 mm).

7.3.4 Estratégia Experimental

Com o objectivo de avaliar a influência das condições de operação dos SBR não tubulares na integridade das lamas ativadas granulares (AGS) usadas como inóculo, efetuaram-se ensaios prévios nas condições de agitação e de arejamento, utilizadas nos estudos anteriores (Mata et al. 2012, 2015), 200 r.p.m e 2 v.v.m, respectivamente. Os resultados destes ensaios foram utilizados para definir as condições operacionais a aplicar aos SBR em termos de agitação.

Os dois reatores foram inoculados com AGS e operados com 1,5 h de reação anaeróbia (sem arejamento e com velocidades de agitação entre 64 e 74 r.p.m) seguida de 3,5 h de reação aeróbia (com arejamento e sem agitação mecânica). O período anaeróbio de 1,5 h foi escolhido com base nos resultados obtidos para este SBR não tubular em experiências anteriores na presença de corante (Mata et al. 2015), pois parece ser suficiente para a obtenção de níveis elevados de biodescoloração. Por outro lado, a extensão do período aeróbio para 3,5 h pode promover uma granulação mais estável (ver Capítulo 5, Mata et al. 2012), por exposição mais longa a uma força de corte elevada (Heijnen e van Loosdrecht 1998, Tay et al. 2001a, Liu e Tay 2004, de Kreuk et al. 2007, Lopez et al. 2012).

As condições operacionais dos SBR não tubulares foram mantidas nos valores indicados na Tabela 7.1 durante todo o período experimental. Como a biomassa já se encontrava na forma granular, o tempo de sedimentação foi mantido (5 min) durante toda a experiência. Este valor de 5 min foi escolhido de acordo com as indicações obtidas em estudos anteriores (Mata et al. 2015), pois verificou-se que a diminuição do tempo de sedimentação de 5 para 4 minutos não favoreceu o sistema.

Tabela 7.1 – Condições operacionais do SBR1 e SBR2 (corante) inoculados com AGS recolhidas no reator de demonstração Nereda® na ETAR Municipal de Frielas (Loures, Lisboa)

Condições de operação do SBR1 (controlo) e SBR2 (corante)		
Inóculo		Lamas aeróbias granulares
Enchimento	(sem agitação, sem arejamento)	15 min
Reação anaeróbia	(com agitação "lenta", 64-74 r.p.m)	1,5 h
Reação aeróbia	(com arejamento)	3,5 h
Sedimentação		5 min
Descarga		1 min
Paragem (<i>idle</i>)		39 min
Ciclo total		6 h
Duração do período experimental (dias)		85

A experiência decorreu durante 85 dias sem interrupção e os dados foram divididos em quatro períodos representativos (I, II, III e IV), cujas características se encontram descritas na Tabela 7.2.

O período I corresponde à adaptação da biomassa ao efluente têxtil sintético e às condições operacionais dos biorreatores. Após esta adaptação, seguiu-se o período II com acumulação de biomassa sem controlo de idade de lamas. A remoção deliberada de biomassa dos reatores nos períodos I e II foi limitada apenas às necessidades de amostragem.

Tabela 7.2 – Resumo das características dos períodos experimentais analisados para os reatores SBR1 e SBR2 (corante), operados durante 85 dias de acordo com as condições descritas na Tabela 7.1.

	Período I	Período II	Período III	Período IV
	Adaptação	Acumulação de biomassa sem controlo de idade de lamas	Idade de lamas controlada a 15 d	Aumento da idade de lamas (sem controlo)
Dias de operação(*):	4 a 22	29 a 40	50 a 60	71 a 85
AR14 (mg/L) Concentração de corante na alimentação ao SBR2 (corante)			40	
COD (mg/L) Concentração de COD na alimentação ao SBR1 e SBR2			1000	
Carga orgânica [kgCOD/(m ³ .d)] no SBR1 e SBR2			2,0	
Duração do período (dias)	19	12	11	15

(*) o sistema foi operado durante 85 dias sem interrupção, mas os dias de operação apresentados correspondem apenas às fases representativas de cada período.

No período III a idade de lamas foi controlada através de purgas homogêneas do licor misto, tendo sido ajustada a um valor de 15 dias. Este valor foi escolhido por se ter revelado adequado à ocorrência da biodescoloração, tanto em sistemas baseados em biomassa floculenta (Lourenço et al. 2001), como em grânulos aeróbios (Mata et al. 2015).

No período IV, com o intuito de aumentar o valor da idade de lamas, este parâmetro não foi controlado, tendo havido acumulação de biomassa nos bioreactores.

7.4 Resultados e Discussão

7.4.1 Influência das condições hidrodinâmicas do SBR não tubular na integridade dos grânulos aeróbios

As lamas ativadas granulares recolhidas na ETAR de Frielas foram analisadas em termos de dimensão, tendo-se verificado que 74% desta biomassa apresentava uma dimensão superior a 0,65 mm e 24% estava abaixo dos 0,25 mm (2% entre 0,65-0,25mm). Confirmou-se por estereoscopia que a biomassa era constituída maioritariamente ($\frac{3}{4}$) por grânulos de dimensões elevadas, como se pode ver na Figura 7.3. No entanto, a biomassa parece ser uma mistura de duas frações distintas, grânulos e flocos, sendo a dimensão máxima dos grânulos observados de cerca de 5 mm. É de realçar a presença de uma zona de cor diferente e mais escura no interior dos grânulos.

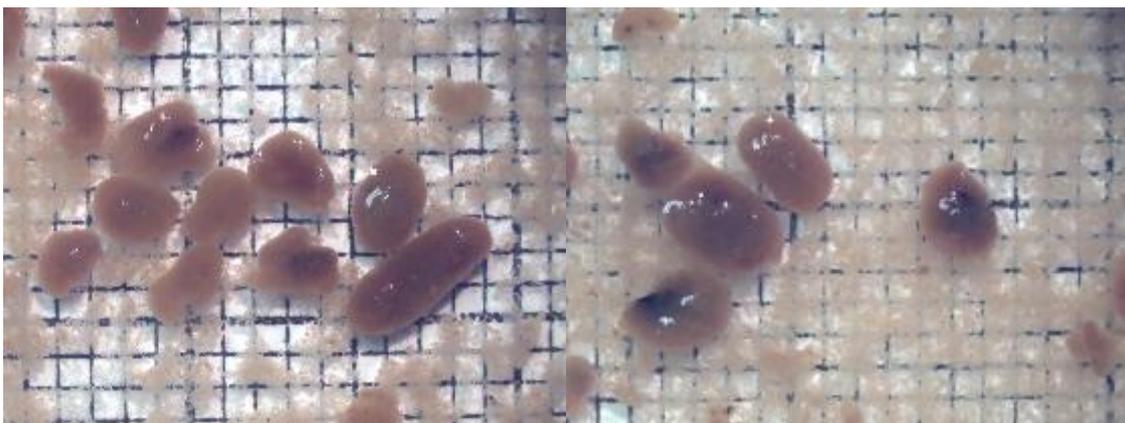


Figura 7.3 – Imagens obtidas por estereoscopia de amostras de lamas aeróbias granulares recolhidas na ETAR de Frielas e usadas como inóculo dos reactores SBR1 e SBR2. A quadrícula menor corresponde a 1 mm.

Para o estudo da influência das condições hidrodinâmicas na dimensão e na integridade das lamas aeróbias granulares, inoculou-se um SBR não tubular apenas com a fração de AGS de maiores dimensões (> 0,65 mm), em 1,5 L de água destilada. Durante 24 h, o reator foi operado com as condições de agitação equivalentes às usadas em estudos anteriores neste SBR não tubular e com os tempos de reação desejados para esta experiência: 200 r.p.m durante 1,5 h (fase anaeróbia) e 200 r.p.m. e arejamento durante 3,5 h (fase aeróbia) em cada ciclo de 6 h [Experiência 1.1 da Tabela 7.3].

Verificou-se visualmente e de forma imediata que nas condições anteriores houve desintegração dos grânulos. Assim realizaram-se duas novas experiências, ambas de 24 h, com a inoculação de AGS em dois reatores SBR não tubulares, um apenas com arejamento, e outro com arejamento e uma agitação lenta de 70 r.p.m. [Experiências 2.1 e 2.2 da Tabela 7.3, respetivamente].

Na Experiência 1.1 verificou-se que a agitação de 200 r.p.m. em conjunto com o arejamento conduziu à desintegração de 51% dos grânulos aeróbios, tendo-se observado visualmente o desaparecimento dos grânulos de maiores dimensões (2 a 5 mm) na fração > 0,65 mm. No entanto, os resultados da Experiência 2.1 indicam que o arejamento, isoladamente, não afeta a integridade dos grânulos. Na Experiência 2.2 verificou-se que o arejamento em conjunto com uma agitação mais lenta, de 70 r.p.m, reduziu a desintegração dos grânulos para 32%.

Tabela 7.3 – Resultados do estudo da influência das condições de agitação mecânica e arejamento na dimensão dos grânulos

Exp.nº	Condições operacionais aplicadas	Dimensão da biomassa		
		Fração > 0,65 mm (%)	Fração < 0,65 mm (%)	Grânulos Destruídos (%)
	Inóculo	99	1	--
1.1	200 r.p.m. e arejamento (24h em ciclos de 6h)	52	48	51
	Inóculo	97	3	--
2.1	Arejamento (24h)	94	6	3
2.2	70 r.p.m. e arejamento (24h)	66	34	32

Estes resultados comprovam que a agitação mecânica a uma velocidade de 200 r.p.m não permite a manutenção dos grânulos de maiores dimensões no SBR não tubular em estudo, o que está de acordo com as indicações de de Kreuk e van Loosdrecht (2004) e Verawaty et al. (2013), sugerindo que a agitação mecânica por ter contribuído para a obtenção de grânulos de dimensões reduzidas nos estudos apresentados no Capítulo 5 (Mata et al. 2012) e no Capítulo 6 (Mata et al. 2015).

De acordo com estes resultados e com vista a minorar a desintegração dos grânulos, o SBR1 e o SBR2 (corante) foram operados nas seguintes condições:

- agitação de ≈ 70 r.p.m. na fase anaeróbia (rotação mais baixa que ainda garante a mistura da biomassa com o efluente a tratar);
- fase arejada sem agitação (visto que o arejamento é suficiente para garantir a mistura da biomassa com o efluente no reator).

7.4.2 Evolução da biomassa e eficiências de remoção de corante e carga orgânica

No **período I**, deu-se a adaptação da biomassa ao efluente têxtil sintético. Verificou-se que no geral os resultados do SBR1 e SBR2 (corante) são semelhantes, ambos com uma idade de lamas inferior a 15 dias e com uma concentração de biomassa de 4 a 5 g/L (licor misto inicial com $\approx 2,5$ g/L). Como era de esperar pelos resultados discutidos na secção 7.4.1, houve uma alteração significativa da dimensão da biomassa relativamente ao inóculo inicial, com uma diminuição de 74 para 33% dos grânulos com dimensões $> 0,65$ mm. De notar que houve um aumento proporcional da fração de menores dimensões ($< 0,25$ mm), mas não da fração intermédia. A remoção de COD na fase anaeróbia situou-se entre 30 e 40%, com uma remoção total de cerca de 70%. A eficiência de remoção de cor no SBR2 foi de 77%. A remoção de COD apresentou valores similares aos obtidos anteriormente para o mesmo período operacional após arranque com lamas floculentas (Período I do Capítulo 6), mas a remoção de cor foi ligeiramente menor, podendo-se dever ao encurtamento da fase anaeróbia.

No **período II**, houve uma acumulação significativa de biomassa nos dois reatores, atingindo-se uma idade de lamas elevada de 30 dias e uma concentração de biomassa de cerca de 10 g/L. Concomitantemente, obteve-se uma diminuição de sólidos no efluente descarregado, um aumento na eficiência de remoção de COD na fase anaeróbia (45 e 42%) e na remoção de COD total (86 e 81%), bem como uma descoloração média de 82%. Isto indica uma adaptação bem sucedida da biomassa granular às condições operatórias dos reatores laboratoriais, atingindo-se valores de remoção de COD próximos dos obtidos com 5 h de reação aeróbia (Capítulo 5, Mata et al. 2012) e valores de remoção de cor próximos dos obtidos com 3 h de reação anaeróbia (Capítulo 6, Mata et al. 2015). Apesar da tendência de diminuição da fração granular de maior dimensão ($> 0,65$ mm), verificou-se uma descida dos valores de SVI (SVI₃₀ de 25 e 32 mL/gTSS, respetivamente no SBR1 e SBR2), indicando a formação de agregados de biomassa com boas propriedades de sedimentação.

No **período III**, realizou-se o controlo da idade de lamas para 15 dias, através da purga deliberada do licor misto. Os dois reatores demonstraram um comportamento semelhante, mantendo a boa remoção de COD e melhorando ainda as propriedades de sedimentação, atingindo-se valores e razão de SVI_{30}/SVI_5 tão boas ou melhores que as obtidas no sistema totalmente aeróbio (Mata et al. 2012). No entanto, a remoção de cor desceu drasticamente, atingindo um mínimo de 57% após o início do controlo da idade de lamas. As razões para este facto são desconhecidas, pois obteve-se anteriormente uma boa remoção de cor quer com idade de lamas, quer com concentração de biomassa bastante inferiores (período I desta experiência e Mata et al. 2015). Realça-se que a purga para controlo da idade de lamas foi realizada com o licor misto homogeneizado, para não retirar de forma preferencial nenhuma das frações de biomassa presentes, o que torna este resultado difícil de explicar. Uma hipótese é que haja uma resposta global da biomassa à sua extração, isto é, um comportamento social das bactérias, como o *quorum-sensing* (Liu e Tay 2004, Ren et al. 2010), em que a diminuição da biodescoloração é o resultado desta interação com o ambiente.

Tabela 7.4 – Resultados obtidos para o SBR1 e SBR2 para cada um dos períodos experimentais

	Período I		Período II		Período III		Período IV	
	Adaptação		Acumulação de biomassa sem controlo de idade de lamas		Idade de lamas controlada a 15 d		Aumento da idade de lamas (sem controlo).	
	Dias de operação: 4 a 22		29 a 40		50 a 60		71 a 85	
	SBR1	SBR2 corante	SBR1	SBR2 corante	SBR1	SBR2 corante	SBR1	SBR2 corante
Idade de lamas (dia)								
Média	8	12	30	30	16	15	34	35
min – Máx	6-11	10-14	25-34	25-37	14-16	14-15	28-43	27-38
TSS no reator (g/L)								
Média	4,4	5,0	11	10	10	7,9	12	10
min – Máx	3-7	3-7	10-13	7-13	8-11	7-8	10-13	8-12
TSS efluente (mg/L)								
Média	0,30	0,19	0,12	0,10	0,09	0,09	0,05	0,04
SVI (mL/gTSS)								
SVI₃₀	60	33	25	32	22	22	21	17
SVI ₅	102	57	41	51	30	31	30	20
rácio SVI ₃₀ / SVI ₅	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,9
Dimensão da biomassa								
Maior que 0,65 mm (%)	33	32	10	23	2	14	1	13
0,65 a 0,25 mm (%)	5	5	23	6	34	16	46	29
Menor que 0,25 mm (%)	62	63	67	71	64	70	53	58
Remoção COD (%)								
Fase anaeróbia	39	28	45	42	49	40	52	53
Fim aeróbia (Total)	75	69	86	81	84	83	86	86
Remoção de cor (%)								
Média		77		82		62		82
min – Máx		71-78		79-85		57-71		72-86

Também importa discutir que no caso de biomassa granular, a idade de lamas pode não ter o mesmo significado que nos sistemas de lamas ativadas floculentas, pois os grânulos de maiores dimensões, que sedimentam mais rápido tendem a manter-se no sistema, atingindo uma idade de lamas bastante superior à média calculada. Pelo contrário nos sistemas floculentos, o tempo de retenção no sistema é mais homogêneo em toda a biomassa.

No **período IV** a idade de lamas não foi controlada, evoluindo naturalmente para valores elevados, de aproximadamente 35 dias. Este período de recuperação de idade de lamas, revelou-se bastante estável, a biodescoloração foi retomada para os valores anteriores, acima de 80%, e a biomassa apresentou excelentes características de sedimentação nos dois reatores, atingindo no SBR2 (corante) os valores de SVI mais baixos de todas as experiências, e mais próximos entre si em termos de SVI₅ e SVI₃₀ (20 e 17 mL/gTSS respetivamente), o que indica uma granulação completa e estável (Schwarzenbeck et al. 2004). Os valores de sólidos suspensos no efluente tratado confirmam estas observações, uma vez que a perda de sólidos é diminuta para um sistema AGS, atingindo-se um efluente de excelente qualidade, com uma média de 40 mg/L. De referir que Muda et al. 2010 obtiveram um teor de sólidos no efluente entre 300 a 500 mg/L ao tratar um efluente têxtil por AGS num SBR tubular.

A remoção total de COD foi também elevada (86%), com uma remoção acima de 50% na fase anaeróbia em ambos os reatores, um fator importante para uma granulação eficiente de acordo com Van Loosdrecht e de Kreuk (2006). No SBR2 (corante) o efluente tratado apresenta um valor médio de COD inferior a 90 mg O₂/L, em que 80% do COD foi removido após 2 h de reação (1,5 h anaeróbia + 0,5 h aeróbia), provocando um regime de fome prolongado, o que é importante para a estabilidade dos grânulos (Liu et al. 2007). Este período de fome ocupa 3/5 do ciclo o que está de acordo com o indicado por López-Palau et al. (2012) para uma boa granulação.

Observou-se ainda um aumento da fração da biomassa com dimensões intermédias (0,65-0,25 mm), tendo diminuído a fração de menores dimensões (abaixo dos 0,25 mm). Os baixos valores de SVI observados sugerem que a biomassa com dimensão abaixo dos 0,25 mm (29% do total), não corresponda ao tipo floculento, mas sim a biomassa constituída por pequenos agregados mais densos. Na Figura 7.4 podem ver-se imagens desta biomassa, onde se confirma a existência de grânulos, desde uma dimensão máxima de 0,9 mm até pequenos aglomerados de 0,1 mm, e a ausência praticamente total de biomassa floculenta.

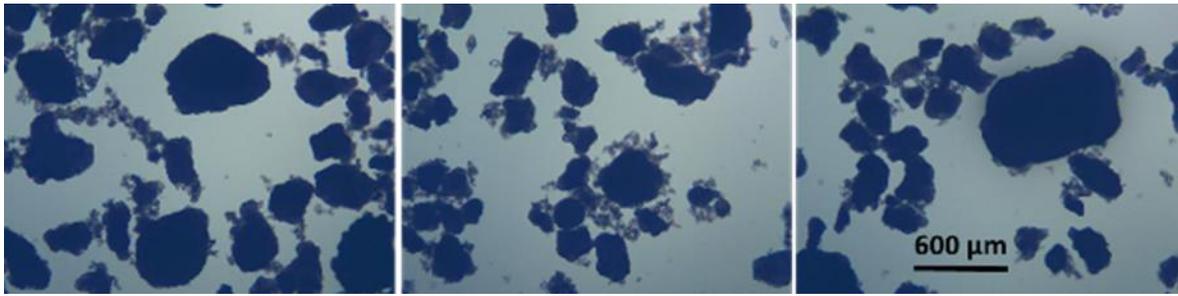


Figura 7.4 - Observações de microscopia óptica da biomassa do SBR2 (corante) no período IV, dia 85.

No geral, em termos de granulação observou-se um melhor desempenho do SBR2 (corante), uma vez que este apresentou valores de SVI um pouco mais baixos e valores de razão SVI_{30}/SVI_5 mais altos, de 0,9 *versus* 0,7 (SBR2 e SBR1 respetivamente). Também a fração de biomassa com dimensões acima de 0,65 mm é de 13% no SBR2 (corante) e de apenas 1% no SBR1. Aparentemente, os grânulos têm melhores características em termos de dimensão e sedimentabilidade quando alimentados com o efluente têxtil sintético, isto é, na presença do corante azo. Esta tendência já tinha sido identificada em estudos anteriores (Mata et al. 2015) e é concebível que a maior robustez destes grânulos esteja relacionada com o facto do corante azo atuar como um aceitador de eletrões na fase anaeróbia (apesar da reduzida quantidade de equivalentes redox envolvidos), permitindo rendimentos aumentados de energia metabólica.

O efluente obtido no período IV cumpre todos os critérios de qualidade relativamente à cor, COD e TSS estipulados quer na Portaria 423/97, de 25 de Junho relativa às normas de descarga para as indústrias do sector têxtil, quer do Anexo XVIII do Decreto-Lei 238/98, para a descarga de águas residuais (descargas no meio hídrico, ver tabela 2.8).

Em resumo, o período IV desta experiência demonstra o excelente tratamento obtido para um efluente têxtil sintético num sistema SBR não tubular de lamas granulares aeróbias.

7.4.3 Descoloração e seus metabolitos

No geral, os resultados de descoloração obtidos foram excelentes, acima de 80% quando medidos por espectrofotometria UV-vis, à exceção do período III como já discutido (caiu para 57% com a redução da idade de lamas para 15 dias). No entanto, os resultados de HPLC revelaram valores superiores para a biodescoloração, de 93% em média. De facto, a medição de cor, ao longo dos ciclos de operação do SBR2, avaliada por espectrofotometria a 515 nm não reflete inteiramente a concentração residual do corante AR14. Isto porque se observa um desenvolvimento de cor acastanhada após a redução do corante,

provavelmente devido às reações envolvendo o metabolito de redução instável, a amina *orto* 2-amino-4-hidroxi-1-naftaleno-sulfonato (2A4H1NS) (Field et al. 1995, Kudlich et al. 1999, Pereira et al. 2009).

Os resultados obtidos por HPLC encontram-se na Tabela 7.5. O corante AR14 e o metabolito de redução estável, a amina *para* 4-amino-1-naftaleno-sulfonato (4A1NS) foram quantificados através da reta de calibração dos respetivos padrões. O tempo de retenção do corante é de 26 min e o da amina 4A1NS de 14 min. Um composto não identificado surge aos 3,3 min. Como não é possível fazer a sua quantificação apresentam-se os resultados em área (área.10⁵).

Tabela 7.5 – Resultados de HPLC obtidos ao longo do período experimental em várias fases do ciclo para os picos do corante, amina e o composto oxidado desconhecido (pico a 3,3 min).

Período	Dia de operação	Fase do ciclo do SBR2	Pico a 3,3 min (área.10 ⁵)	Amina 4A1NS (mg/L)	Corante AR14 (mg/L)
Período I (Adaptação)	15	início do ciclo (0,0 h)	0,0	6,3	17,1
		1,5 h anaerobiose	0,0	11,9	0,7
		0,5 h ar	0,9	0,1	1,8
		1,5 h ar	4,4	7,3	1,2
		3,5 h ar, fim ciclo (5,0 h)	4,3	10,4	0,7
Período II (Acumulação de biomassa sem controlo de idade de lamas)	29	início do ciclo (0,0 h)	0,1	1,5	20,3
		1,5 h anaerobiose	0,1	11,7	2,3
		0,5 h ar	2,2	0,2	1,8
		1,5 h ar	10,3	10,6	2,2
		3,5 h ar, fim ciclo (5,0 h)	10,2	11,1	2,1
Período II (Acumulação de biomassa sem controlo de idade de lamas)	36	início do ciclo (0,0 h)	0,2	0,3	22,5
		1,5 h anaerobiose	0,2	7,2	1,4
		0,5 h ar	4,5	0,5	2,5
		1,5 h ar	17,2	8,5	1,7
		3,5 h ar, fim ciclo (5,0 h)	16,8	7,1	1,8
Período III (Idade de lamas controlada a 15 d)	57	início do ciclo (0,0 h)	0,0	0,2	24,0
		1,5 h anaerobiose	0,0	6,3	5,2
		0,5 h ar	2,8	0,1	4,6
		1,5 h ar	13,6	3,1	5,0
		3,5 h ar, fim ciclo (5,0 h)	13,4	0,1	5,0
Período IV (Aumento da idade de lamas)	79	início do ciclo (0,0 h)	0,9	0,5	20,1
		1,5 h anaerb.	0,0	6,6	1,6
		0,5 h ar	0,4	5,7	1,7
		1,5 h ar	2,6	2,5	1,7
		3,5 h ar, fim ciclo (5,0 h)	3,9	0,0	1,5
Período IV (Aumento da idade de lamas)	85	início do ciclo (0,0 h)	0,0	0,0	21,8
		1,5 h anaerobiose	0,0	5,8	1,6
		0,5 h ar	0,3	3,6	1,5
		1,5 h ar	2,5	0,2	1,5
		3,5 h ar, fim ciclo (5,0 h)	4,6	0,0	1,5

No período I (dia 15) os resultados obtidos para o corante e amina são os esperados tendo em conta os respetivos pesos moleculares, a concentração de corante AR14 no produto

comercial (50%) e a estequiometria da redução, obtendo-se resultados equivalentes aos do estudo anterior (Mata et al. 2015), ver Figura 6.11. Isto é, considerando que 20 mg/l de corante inicial são reduzidos, há uma contribuição de 5 mg/L de amina 4A1NS em cada ciclo, obtendo-se uma concentração final de 10mg/L da mesma devido às aminas pré-existentes resultantes do ciclo anterior (*renovação de volume por ciclo* de 50%). Deste modo, os valores experimentais são um espelho desta estequiometria, obtendo-se 10,4 mg/L de 4A1NS. Estes resultados estão de acordo com o reportado por outros investigadores, a maioria refere que é difícil a mineralização aeróbia de aminas sulfonadas (Lourenço et al. 2001, Pinheiro et al. 2004, van der Zee e Villaverde 2005).

Ainda no período I, observa-se na fase aeróbia o aparecimento de um composto de oxidação não identificado (pico a 3,3 min). Tendo em conta a estequiometria da redução não parece ser proveniente da oxidação da amina 4A1NS. Este pico tanto pode resultar de metabolitos oxidados provenientes da outra amina de redução (2A4H1NS), como da oxidação de impurezas presentes no corante (produto comercial - corante AR14 a 50%). É natural que estas impurezas sejam reagentes ou produtos secundários da reação de síntese do corante. Ainda se pode colocar a hipótese do pico ser resultante da oxidação de compostos presentes no produto comercial Emsize E1. Este produto apresenta sempre um COD residual após tratamento (ver 5.4.2), o que indica a presença de compostos não biodegradáveis.

É de realçar, que este composto oxidado é o mesmo que se obtém após 20 minutos de tratamento oxidativo com ozono, aplicado ao efluente final dos primeiros ensaios de granulação com efluente têxtil (ver capítulo 8). Para esta confirmação foi realizado um ensaio de HPLC a uma amostra de mistura de 1:1 de efluente ozonizado e efluente deste ensaio. Obteve-se um pico perfeito, ao mesmo tempo de retenção (3,3 min), demonstrando que o composto é o mesmo (ver Figura 8.6). Este resultado é extremamente importante pois demonstra a elevada capacidade oxidativa da biomassa granular presente. No entanto, apesar da existência do metabolito oxidado no fim do ciclo, no início do ciclo (após a fase *idle* e enchimento) ele não está presente. Aparentemente o composto oxidado é facilmente reversível em condições anóxicas. Este comportamento mantém-se durante todo o período operacional.

No período II, nos dias de operação 29 e 36, observa-se pela primeira vez uma alteração do perfil de concentração da amina estável 4A1NS ao longo do ciclo. Isto é, apesar do valor de concentração da amina no fim da fase anaeróbia ser aproximadamente a prevista, esta não foi detetada após 0,5 h de arejamento, voltando a estar presente após continuação do arejamento e até ao fim do ciclo. No entanto, após a fase de *idle* e enchimento, a amina volta a não se detetada. Por exemplo para o dia 29, a área total dos picos do cromatograma

neste ciclo (soma das áreas dos picos com tempo de retenção até 35 min) é de 52×10^5 no fim da fase anaeróbia, desce para 30×10^5 após 0,5 h de arejamento e volta aos 52×10^5 após 1,5 h de arejamento (mantendo-se até ao final do arejamento). O valor previsto para a amina no início do ciclo seria de ≈ 5 mg/L se o padrão de concentrações anteriores se mantivesse (Mata et al. 2015 e período I desta experiência), mas obtêm-se valores muito mais baixos, quase zero no dia 36. Estes resultados sugerem a conversão reversível da amina em outras estruturas não detetadas por HPLC. Verificou-se também que a amina não foi oxidada a 4-hidroxi-1-naftaleno-sulfonato (4H1NS) (ver figura 2.9), pois foi realizada a análise por HPLC deste composto e o seu cromatograma apresenta um pico perfeitamente definido a 19,0 min (ver Figura 8.6).

O **período III** corresponde a um período de controlo da idade de lamas. A idade de lamas foi reduzida de ≈ 30 para 15 dias e verificou-se uma diminuição da eficiência de descoloração. No entanto, relativamente à amina observou-se pela primeira vez no dia 57 o seu desaparecimento no fim da fase arejada e conseqüentemente a sua ausência no início do ciclo seguinte.

No **período IV**, a idade de lamas elevada (≥ 30 dias) foi reposta. Verificou-se que a amina 4A1NS não está presente no início do ciclo, tendo sido detetada por HPLC apenas no fim da fase anaeróbia com a estequiometria esperada devido à redução do corante alimentado nesse ciclo. Na fase arejada a concentração desta amina diminuiu, sendo praticamente indetetavel no fim do ciclo. Na literatura consultada, como já referido, a maioria dos investigadores indica que a mineralização aeróbia de aminas sulfonadas é difícil, havendo relatos específicos que a mesma não foi obtida para a amina 4A1NS (Seshadri et al. 1994, Tan et al. 2005a). Apenas Hosseini Koupaie et al. (2013) referiram que obtiveram uma remoção de 64% desta amina na fase aeróbia. No entanto, a observação dos cromatogramas destes autores indica que há concomitantemente, após a fase aeróbia, o aumento da área de um pico com menor tempo de retenção (Koupaie et al. 2013, *supplementary data*), o que pode indicar a formação de um metabolito desta amina.

Na Figura 7.5 podem observar-se os cromatogramas do fim do ciclo, do dia 15 (período I) e do dia 85 (período IV), adaptados para a mesma escala de intensidade. Verifica-se que no dia 85, apesar da ausência da amina (pico a ≈ 15 min) não se verifica concomitantemente o aparecimento de outros metabolitos, antes pelo contrário, alguns dos metabolitos existentes no dia 15 não estão presentes no dia 85. A área total dos picos dos cromatogramas (soma das áreas dos picos com tempo de retenção até 35 min) também o confirma, sendo de 46×10^5 no dia 15 e baixando para 20×10^5 no dia 85.

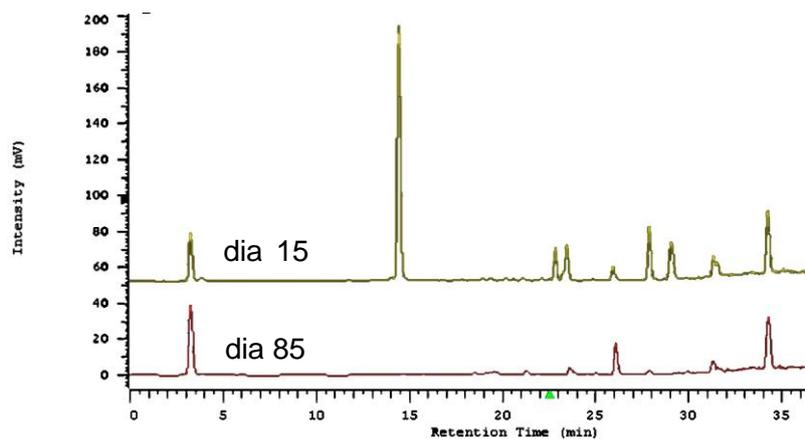


Figura 7.5 – Cromatogramas do período I, dia 15 e período IV, dia 85, fim do ciclo (observa-se a ausência da amina 4A1NS neste último).

Conclui-se que a amina deixou de ser detetada na fase aeróbia, ficando a dúvida se foi convertida noutra estrutura (como aconteceu no período II) não detetada por HPLC (apesar de neste caso não se observar a reversibilidade da mesma), ou se sofreu uma degradação adicional e eventual mineralização. A mineralização é uma hipótese plausível visto que tanto no dia 29 como no dia 85, o valor da concentração da amina no início do ciclo é praticamente zero. No entanto, no dia 29 no fim da fase anaeróbia a concentração é de aproximadamente 10 mg/L (ou seja há reversão total), mas no dia 85 a amina existente no fim da fase anaeróbia é só de ≈ 5 mg/L, correspondente apenas à resultante da redução do corante presente na nova alimentação. Isto já se verifica também no dia 79. Estes resultados reforçam a ideia de que há mesmo a partir de dia 57 uma degradação consistente da amina na fase aeróbia e não uma simples conversão noutra estrutura reversível como aconteceu numa fase mais inicial (período II). É possível que a amina passe inicialmente por esta estrutura reversível durante o processo de degradação.

Observando-se os dados no seu conjunto, a tendência parece ser uma resposta oxidativa cada vez mais eficaz da biomassa, ao longo do tempo experimental na transformação dos metabolitos produzidos pela redução anaeróbia do corante. Na Figura 7.6 apresentam-se os espectros UV-vis dos compostos envolvidos e espectros iniciais e finais do dia 15 e dia 85.

No gráfico A encontram-se os espectros individuais da amina 4A1NS, do corante AR14, da mistura de amina e corante e da fonte de carbono com macro e micronutrientes (corresponde à alimentação do SBR1). O espectro da amina 4A1NS apresenta duas zonas de absorvência características, a 220 e a 320 nm. O corante AR14 também apresenta absorvência aos comprimentos de onda característicos da amina, mas aos 320 nm não apresenta uma curva definida mas sim uma espécie de patamar de absorvência entre os 280 e os 236 nm. Como era de esperar, a solução contendo amina e corante apresenta uma

absorvência cumulativa dos dois compostos. De notar que a solução de alimentação sem corante apresenta um pico característico a 194 nm, atribuível à fonte de carbono, o produto comercial Emsize E1, hidroxipropil-amido, presente na alimentação na forma hidrolisada (glucose).

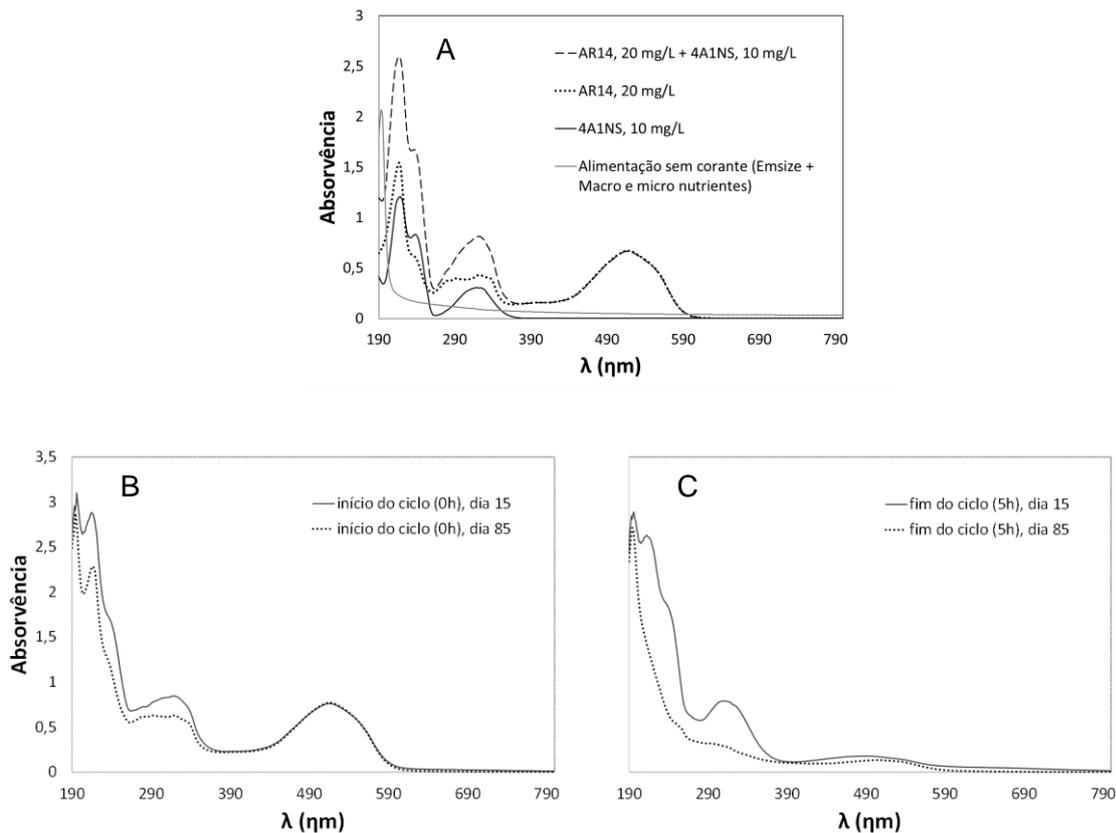


Figura 7.6 - Espectros UV-vis. Gráfico A: do corante AR14, da amina 4A1NS, da alimentação sem corante; Gráfico B: inícios do ciclo dia 15 e dia 85; Gráfico C: fim do ciclo dia 15 e dia 85.

Os gráficos B e C comparam o dia 15 com o dia 85, no início e no fim do ciclo, confirmando a hipótese de mineralização da amina, visto que no fim do ciclo, as amostras dos dias 15 e 85 apresentam espectros bastante diferentes. No final do ciclo de dia 15 o espectro apresenta a absorvência característica da amina 4A1NS, mas no dia 85 não (gráfico C). O espectro do fim do ciclo de dia 85 apresenta no geral um absorvência muito menor entre os 190 e os 390 nm e a ausência das bandas características da amina 4A1NS, aos 220 e 320 nm (gráfico C). Comparando os espectros do início do ciclo de dia 15 e 85 (gráfico B) observa-se que a absorvência característica do corante na zona do visível é igual, mas entre os 190 e 390 nm o espectro de dia 85 tem um abaixamento de absorvência, o que justifica a ausência de amina 4A1NS no início deste ciclo detetada por HPLC.

Os resultados aqui obtidos são extremamente importantes, pois demonstram pela primeira vez a degradação e eventual mineralização na fase aeróbia de um metabolito de redução de corante azo, a amina 4A1NS, pela lamas aeróbias granulares. A elevada capacidade oxidativa pode dever-se às sinergias do consórcio de microrganismos existentes nos grânulos, bem como ao facto da elevada idade de lamas da biomassa poder permitir o desenvolvimento de espécies com sistemas enzimáticos não usuais em lamas ativadas flocculentas. Por exemplo, as lacases são conhecidas por conseguirem degradar uma ampla gama de compostos aromáticos (Fang et al. 2012) como fenóis e aminas aromáticas (Wu et al. 2010), utilizando o oxigénio como aceitador de eletrões (Pereira et al. 2009). Sabe-se hoje que estas enzimas existem de forma generalizada em bactérias (Sharma et al. 2007), tendo já sido isoladas em biomassa recolhida num sistema de tratamento de efluentes da indústria têxtil (Wu et al. 2010). Deste modo, uma das hipóteses eventuais é que a mineralização aeróbia da amina 4A1NS possa ocorrer através de lacases bacterianas produzidas pelas lamas aeróbias granulares.

7.5 Conclusões

Neste estudo de granulação aeróbia para o tratamento de um efluente textil simulado em SBR com fase anaeróbia de 1,5 h e fase aeróbia de 3,5 h, comprovou-se que a agitação mecânica usada durante a fase reacional dos SBR é responsável pela desintegração dos grânulos aeróbios do inóculo, e conseqüentemente pela existência de grânulos com menores dimensões que o usual nestes SBR não tubulares agitados. Apesar disso, os grânulos formados neste sistema possuem excelentes valores de SVI_5 e SVI_{30} (22 e 17 mL/g respetivamente), próximos entre si, apresentando uma excelente sedimentabilidade e uma fração residual de biomassa não agregada. Aparentemente a extensão da fase aeróbia favoreceu a granulação. Após estabilização dos indicadores morfológicos, a eficiência de remoção de corante atingiu valores acima de 80%, apesar da fase anaeróbia ter a duração de apenas 1,5 h. A redução da idade de lamas de 35 para 15 dias resultou imediatamente numa diminuição da remoção de cor de 82 para 57%. Não foi possível explicar este fenómeno convenientemente visto que anteriormente se obtiveram boas remoções de cor com idades de lamas inferiores a 15 dias. É possível que resulte de um comportamento social das bactérias em resposta a uma alteração do ambiente.

Após recuperação da idade de lamas para valores superiores a 30 dias, o sistema demonstrou uma excelente eficiência de remoção de cor e de carga orgânica (82 e 86% respetivamente), possuindo o efluente descarregado uma qualidade notável para sistemas de lamas granulares aeróbias em termos do teor de sólidos em suspensão, com um valor de

apenas 40 mg/L. Este efluente cumpre assim com todos os parâmetros (cor, COD e TSS) das normas gerais do Anexo XVIII do Decreto-Lei 238/98 para a descarga de águas residuais em meio hídrico.

Demonstrou-se ainda que após biorredução do corante AR14, houve transformação da amina 4A1NS durante a fase aeróbia, sem formação concomitante de outros metabolitos detetáveis por HPLC ou varrimento UV-vis, o que sugere a sua biodegradação e eventual mineralização. A maior extensão da fase aeróbia da etapa reacional, em conjunto com os valores elevados de idade de lamas, parece ter permitido o estabelecimento de espécies com capacidade de formação de complexos enzimáticos oxidativos que biodegradam aminas aromáticas recalcitrantes.

8 OZONIZAÇÃO E IRRADIAÇÃO UV DE UM EFLUENTE TÊXTIL SIMULADO APÓS BIOTRATAMENTO EM SBR

8.1 Resumo

Nesta fase do trabalho, pretendeu-se verificar se a aplicação de processos avançados de oxidação, nomeadamente a ozonização e a irradiação UV, permite completar a mineralização dos metabolitos da biodescoloração de um corante azo presentes no efluente dum biorreator SBR operado num ciclo de 6 h, com uma etapa reacional dividida em 2 h de anaerobiose e 3 h de arejamento. As amostras colhidas ao longo dos ensaios de oxidação foram analisadas por HPLC, tendo-se examinado, como metabolito principal, a amina 4-amino-1-naftaleno-sulfonato (4A1NS). Esta está presente no efluente do biorreator na concentração estequiometricamente correspondente à biorredução praticamente total do corante AR14 presente na respetiva alimentação. Verificou-se que, logo após 5 minutos de ozonização do efluente do SBR, a concentração de 4A1NS diminuiu para um residual de 2 mg/L (85% de remoção). Contudo, o prolongamento da ozonização por mais de 20 minutos originou um produto de oxidação persistente, caracterizado por um pico cromatográfico com um tempo de retenção inferior ao de 4A1NS. O tratamento de irradiação UV é aparentemente mais eficiente dado que resulta na eliminação completa da amina 4A1NS sem que surjam novos subprodutos detetáveis pelo método de HPLC utilizado. No entanto, este resultado requereu um tratamento mais prolongado, tendo sido necessária uma exposição de 20 minutos à radiação para se obter um nível de remoção de 85% para a amina 4A1NS. Conclui-se que a aplicação destes processos de oxidação avançada ao efluente têxtil simulado, após o tratamento biológico, é uma hipótese a desenvolver com vista à obtenção de uma mineralização adicional ou total dos metabolitos persistentes.

8.2 Introdução

A utilização de sistemas biológicos com etapas anaeróbia e aeróbia para o tratamento de efluentes têxteis contendo corantes azo tem sido demonstrada com sucesso na remoção de cor e carga orgânica. No entanto, a degradação das aminas recalcitrantes resultantes da redução do corante azo não tem sido conseguida, demonstrando a necessidade da aplicação de um pós-tratamento para este efeito (Jonstrup et al. 2011, Lotito et al. 2012). Existem já alguns estudos em que após o tratamento biológico por culturas mistas são aplicados, como pós-tratamento, processos de oxidação química com ozono (Baban et al. 2003, García-Montañó et al. 2008, Kim et al. 2011, Lotito et al. 2012) ou do tipo foto-Fenton. Num dos estudos apresentados na Tabela 2.11, a ozonização é aplicada na corrente de recirculação do licor misto decantado ao tratamento biológico aeróbio, ocorrendo incrementos significativos na remoção de carência química de oxigênio e de cor (Lotito et al. 2012a).

Neste trabalho pretendeu-se verificar se era possível obter a mineralização dos metabolitos da biodescoloração do corante azo *Acid Red 14* presentes no efluente de um biorreator SBR com etapa reacional incluindo períodos anaeróbio e aeróbio. Em particular, foi examinada a conversão da amina estável 4A1NS, aplicando como pós-tratamentos os processos avançados de oxidação (AOP) de ozonização e de irradiação UV. Pretendeu-se também avaliar se era possível melhorar a qualidade global do efluente através da recirculação ao tratamento biológico do efluente resultante da aplicação dos AOP.

8.3 Materiais e Métodos

8.3.1 Amostra de efluente de SBR em estudo

A amostra estudada foi composta usando os efluentes produzidos em vários ciclos dum biorreator SBR de grânulos aeróbios operado em ciclos de 6 h, com a etapa reacional dividida em 2 h de anaerobiose e 3 h de arejamento e alimentado com um efluente têxtil sintético contendo o corante AR14. No período da recolha da amostra o sistema apresentava uma remoção de corante e carga orgânica estáveis e ambas acima de 80% (dados de operação do SBR não apresentados). O efluente composto foi recolhido durante dois dias consecutivos, tendo sido filtrado (filtros tipo 1-Qualitative, Cat nº1001090, da Whatman), homogeneizado e armazenado refrigerado a 4°C até à sua utilização.

Na caracterização deste efluente por HPLC identificou-se, como metabolito principal, a amina 4-amino-1-naftaleno-sulfonato (4A1NS), na concentração estequiométrica correspondente à biorredução praticamente total do corante AR14 alimentado ao SBR. Este mesmo padrão de redução foi descrito por Mata et al. (2015) (capítulo 6, Figura 6.11) e indica que não ocorreu degradação da amina 4A1NS na fase aeróbia da biorreação.

8.3.2 Descrição de processos de oxidação avançada (AOP) utilizados

8.3.2.1 Ozonização

Foi utilizado um ozonizador elétrico (*Electronic ozonizer*) de 60 Watt da marca Hailea, modelo HLO-820A (débito máximo: 15 L/min, 2000 mg O₃/h). O teor residual de ozono foi medido no meio líquido através de um *kit* Palintest obtendo-se uma concentração residual de 0,2 mg O₃/L nas condições operacionais ($\approx \frac{1}{3}$ do débito máximo). O reator utilizado consistiu numa proveta de 1 L com agitação magnética, sendo o ozono introduzido pelo fundo (ver Figura 8.1). O volume de efluente utilizado no ensaio foi de 800 mL e este foi ozonizado em contínuo, durante 60 minutos, tendo-se recolhido amostras de 15 mL do líquido ao longo deste período.



Figura 8.1 – Instalação laboratorial utilizada para aplicação da ozonização ao efluente SBR

8.3.2.2 Irradiação UV

Para a aplicação da irradiação UV ao efluente do SBR foi utilizada uma lâmpada de vapor de mercúrio de média pressão, de 150 watt, da marca Heraeus Noblelight, modelo TQ150 (Kleinnosheim, Alemanha), que emite radiação policromática entre 200 e 600 nm, como se pode ver na Figura 8.2.

Os ensaios de irradiação foram levados a cabo num fotorreator cilíndrico da Heraeus Nobleigh, de 850 cm³ de capacidade (Figura 8.2). Neste reator a lâmpada encontra-se colocada no eixo central, rodeada por uma camisa de quartzo na qual circula água de refrigeração. Tal permitu manter a temperatura da amostra a cerca de 25°C. O volume de efluente utilizado foi de 600 mL e este foi irradiado em contínuo, durante 30 minutos, tendo-se recolhido amostras de 15 mL do líquido ao longo deste período.

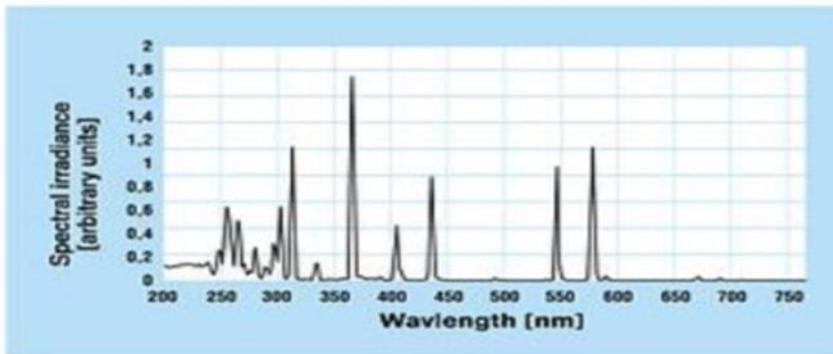


Figura 8.2 – Espectro de emissão da lâmpada de mercúrio de média pressão Heraeus Noblelight TQ 150 (à esquerda); Fotorreator com camisa interna de quartzo utilizado para os testes de irradiação UV aplicados ao efluente do SBR, com a lâmpada UV instalada (à direita).

8.3.3 Ensaio de tratamento biológico após aplicação de AOP

Após a aplicação dos tratamentos AOP, uma parte do efluente foi sujeito a um único ciclo de tratamento biológico, composto por 2 h de reação anaeróbia e 3 h de reação aeróbia, simulando o processo de recirculação deste efluente ao biorreator SBR (Figura 8.3).

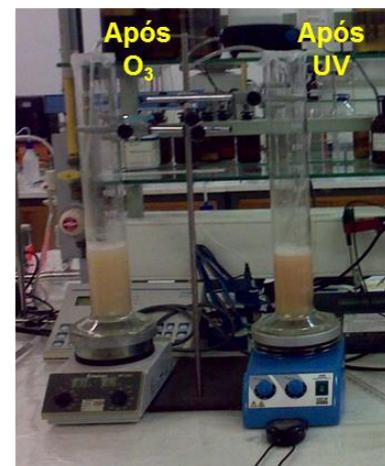
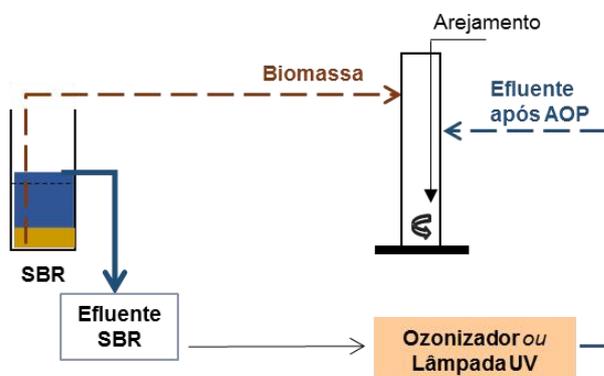


Figura 8.3 – Representação do ensaio realizado para simulação da recirculação do efluente ao SBR, após aplicação dos tratamentos AOP (à esquerda); sistema laboratorial utilizado para a aplicação de um ciclo de tratamento biológico ao efluente dos AOP (à direita).

O sistema laboratorial utilizado para aplicar um ciclo de tratamento biológico a amostras de cada um dos efluentes dos AOP encontra-se representado na Figura 8.3. As amostras foram utilizadas após tratamentos de ozonização e de irradiação UV com as durações de 60 e de 30 min, respetivamente. O reator biológico utilizado foi uma proveta de 1 L, sendo a fase anaeróbia operada sob agitação magnética (placa Heidolf MR 3001) e a fase aeróbia sob agitação idêntica acrescida de arejamento usando um difusor de aquário e um compressor (Aquapor air pump AC9602). A biomassa foi recolhida do SBR e lavada com solução de macro e micronutrientes antes da sua utilização. No reator (proveta 1 L) 100 mL de biomassa em solução de nutrientes foi adicionada a 250 mL do efluente resultante de cada processo AOP (sem adição de fonte de carbono). As concentrações de biomassa granular obtidas foram de 3,2 e de 3,5 gTSS/L nos reatores que receberam as amostras de efluentes da ozonização e da irradiação UV, respetivamente.

8.3.4 Métodos Analíticos

A medição da **concentração de ozono** no meio líquido foi realizada através dum *kit* da Palintest, ref. AP 056 (gama 0 - 2 mgO₃/L), medida espectrofotométrica a 520 nm) seguindo as indicações do fornecedor. O fotómetro utilizado foi da marca Palintest, Photometer 5000.

Os teores de **sólidos suspensos totais** (TSS) foram medidos através métodos normalizados (APHA 1998) em amostras do licor misto dos reatores (provetas 1 L).

Para as análises de HPLC, a obtenção de espectros UV-vis e a determinação da carência química de oxigénio (COD) as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 4000 r.p.m. e as medições foram efetuadas no sobrenadante.

As análises de **HPLC** foram realizadas num sistema Merck-Hitachi (Alemanha), que compreende uma bomba inteligente L-6200A, um detetor UV-Vis L-4250 e um amostrador automático L-7200, com uma interface D7000 controlada por computador. O sistema estava equipado com uma coluna de fase reversa RP-18, LiChroCART 250-4 (Merck, Alemanha) e a deteção espectrofotométrica foi realizada a 220 nm. A fase móvel era composta por tampão de fosfato de sódio (25 mM, pH = 5,5) e acetonitrilo, com um caudal de 0,7 mL/min. O programa utilizado consistiu em (os valores dados são da razão volumétrica tampão:acetonitrilo): um gradiente linear de 30 min de 100:0 a 50:50, seguido de um gradiente linear de 5 minutos até 15:85 e terminando com um degrau para 100:0, tendo sido mantido este valor final por um período adicional de 10 min. A identificação e quantificação dos picos nos cromatogramas foi realizada através de soluções padrão de corante *Acid Red 14* (Sigma, EUA) e de amina 4A1NS (4-amino-1-naftaleno sulfonato) (Sigma, EUA), ambos

em água destilada. O desvio padrão (STD) do método foi determinado com os valores obtidos em 10 análises repetidas para a mesma amostra. Para a amostra padrão de 1 mg/L obteve-se um valor de STD de 5,7% para o corante e de 2,7% para a amina. Para a amostra padrão de 10 mg/L obteve-se um valor de STD de 1,0% para o corante e de 0,5% para a amina.

Os **espectros UV-vis** entre 190 e 800 nm dos sobrenadantes das amostras centrifugadas foram medidos contra água destilada num espectrofotómetro Specord 200 (Analytik Jena, Alemanha) com células de quartzo com 1 cm de percurso óptico.

Os valores da **carência química de oxigénio** (COD) foram determinados através do método normalizado de digestão com dicromato de potássio e titulação com sulfato ferroso amoniacal (APHA 1998) utilizando um digestor AccuBlock™ Digital Dry Bath (Model: D1200) da Labnet International, Inc. (EUA).

(intencionalmente em branco)

8.4 Resultados e Discussão

8.4.1 Ozonização

A amostra do efluente sintético têxtil tratado no SBR foi sujeita a ozonização em contínuo e recolheram-se amostras ao longo do tempo. Na Figura 8.4 apresenta-se o resultado obtido por HPLC para a concentração da amina 4A1NS entre os 0 e os 60 min de ozonização, bem como os espectros de UV-vis (190-800 nm) correspondentes às amostras mais representativas.

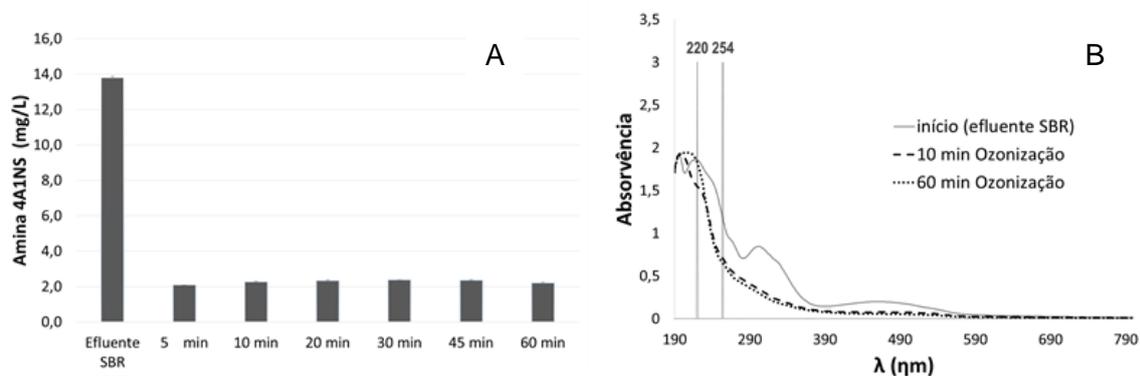


Figura 8.4 – A - Evolução da concentração da amina 4A1NS determinada por HPLC ao longo do processo de ozonização do efluente têxtil simulado tratado em SBR; B -Espectros UV-vis de amostras colhidas ao tempo 0 (efluente SBR) e aos tempos 10 e 60 min da experiência.

Verifica-se que logo após 5 min de ozonização a concentração de amina 4A1NS é marcadamente reduzida ficando apenas um residual de 2 mg/L, o que corresponde a 85% remoção (Figura 8.4 A). Aparentemente, este residual de amina não é convertido mesmo com o prolongamento da ozonização até um total de 60 min. Nos espectros UV-vis (Figura 8.4 B) identifica-se claramente o desaparecimento do pico característico da amina a 320 nm (ver Figura 7.6 A), confirmando os resultados cromatográficos. Também se verifica que o prolongamento da ozonização de 10 para 60 min fez aumentar a absorvência na gama 200-230 nm, sugerindo uma transformação oxidativa adicional.

Observando os cromatogramas obtidos em HPLC (Figura 8.5), verifica-se que a partir de 20 min de ozonização há o surgimento de um pico a um tempo de retenção reduzido (3,3 minutos). Na Figura 8.5 pode observar-se também que não se registou o aparecimento de outros picos significativos nos cromatogramas obtidos durante o ensaio de ozonização. Contudo, o valor de COD não se alterou após 60 min de ozonização, indicando que não ocorreu mineralização dos solutos orgânicos.

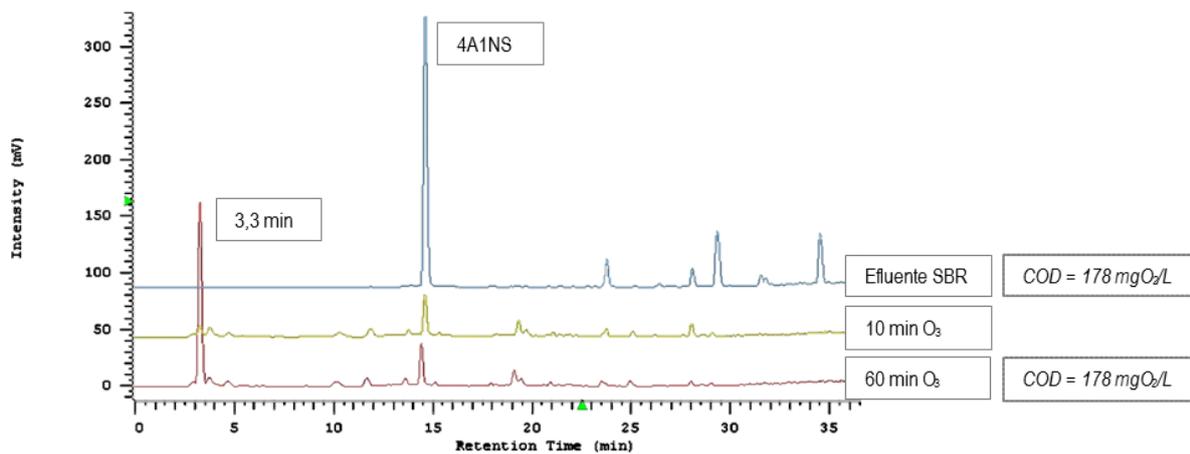


Figura 8.5 – Cromatogramas obtidos em HPLC de amostras colhidas durante a experiência de ozonização do efluente têxtil simulado tratado em SBR. São também indicados os valores de COD medidos nas amostras inicial e final do processo.

Colocou-se a hipótese do pico que surgiu nos cromatogramas a 3,3 minutos corresponder a um derivado mais oxidado da amina 4A1NS, especificamente 4-hidroxi-1-naftaleno sulfonato (4H1NS), por analogia com a previsão de mecanismos de degradação microbiana em aerobiose para as aminas resultantes da redução do *Acid Red 14* (metabolito 5 da Figura 2.9, Gao et al. 2010). É de referir que a previsão indica que esta transformação microbiana aeróbia é improvável (substituição do grupo amina pelo grupo hidroxilo na posição 4), mas no presente caso foi utilizado um agente oxidante forte, pelo que seria uma hipótese a considerar. Assim, para testar esta hipótese, foi analisada em HPLC, nas mesmas condições, uma solução de 4H1NS em água, cujo resultado se encontra na Figura 8.6. Em algumas das amostras de efluentes do SBR durante a operação com inóculo da ETAR de Frielas (Capítulo 7), também foi identificado um pico ao tempo de retenção de 3,3 min. Num primeiro passo da tentativa de perceber se se trata do mesmo composto, foi analisada em HPLC, nas mesmas condições, uma amostra composta constituída por 50% (em volume) de efluente ozonizado durante 60 min e 50% de efluente retirado do SBR no dia 29 do período operacional descrito no Capítulo 7. O cromatograma correspondente a esta mistura encontra-se também na Figura 8.6.

Verifica-se que se obtém um único pico aos 3,3 min para a amostra da mistura, o que indica que as duas amostras continham provavelmente o mesmo composto. Contudo, este não é o 4H1NS visto que cromatograma da respetiva solução em água apresenta um único pico ao tempo de retenção de 19,0 min.

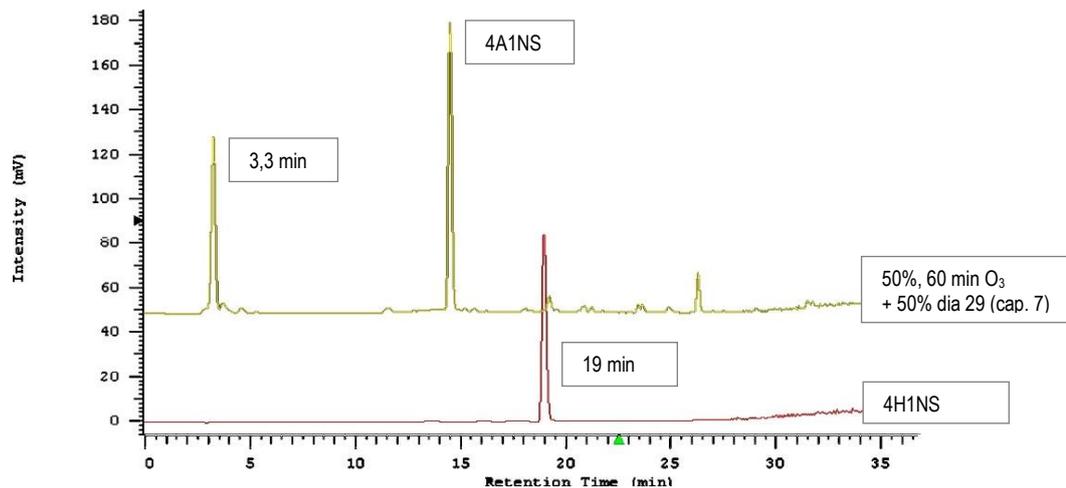


Figura 8.6 – Cromatogramas obtidos em HPLC numa mistura 1:1 de efluente após 60 min de ozonização com efluente do SBR colhido no dia 29 da experiência descrita no Capítulo 7 e de uma solução aquosa de 4H1NS (4-hidroxi-1-naftaleno-sulfonato).

O pico a 3,3 min não foi assim, identificado, podendo ser um produto oxidado proveniente das impurezas do corante comercial AR14 (50% de pureza), ou ser um dos metabolitos de oxidação da amina instável 2A4H1NS resultante da quebra da ligação azo de AR14, ou ainda ser um produto oxidado proveniente de impurezas do derivado de amido utilizado como fonte de carbono na composição do efluente têxtil simulado.

Em estudos anteriores o destino das aminas após ozonização do efluente de um biorreator em que ocorrera a descoloração de corantes azo não foi seguido (Baban et al. 2003, Garcia Montano et al. 2008, Kim et al. 2011 e Lotito et al. 2012a), mas Baban et al. (2003) reportam que 10 min de ozonização produzem um efluente sem toxicidade, o que provavelmente corresponde à conversão das aminas recalcitrantes. Da mesma forma, Garcia-Montano et al. (2008) indicam que os produtos resultantes do tratamento anaeróbio dum efluente contendo um corante azo são mais tóxicos que o corante inicial, mas após ozonização a mistura deixa de apresentar toxicidade. Estes autores reportam valores de 48% e 83% para a eficiência de mineralização destes produtos numa gama de pH ácido-neutro e com o valor de pH a 10,5 respetivamente. Indicam ainda que esta diferença se deve à circunstância do agente oxidante ser, no primeiro caso, a molécula de ozono e, no segundo, o radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) que tem um potencial de oxidação mais elevado (2,8 V) do que o de ozono (2,1 V) (Solis et al. 2012 e Robinson et al. 2001).

No caso do presente estudo, sendo a ozonização aplicada a pH neutro é natural que o agente oxidante seja maioritariamente o ozono. Por outro lado, e apesar de não se terem realizado testes de toxicidade, é razoável admitir que a aplicação de 5 min de ozonização, ao converter 85% da amina aromática recalcitrante (4A1NS) presente na solução inicial,

origem um efluente não tóxico, sendo um processo de pós-tratamento aparentemente eficaz como complemento do tratamento biológico.

8.4.2 Irradiação UV

Na Figura 8.7 são apresentados os resultados analíticos da experiência de irradiação UV numa amostra do efluente têxtil simulado tratado em SBR, medidos em amostras retiradas do reator ao longo do tempo, por um período de 30 min. Nomeadamente, apresenta-se os resultados de quantificação da amina 4A1NS por HPLC, bem como os espectros adquiridos na gama UV-vis (190-800 nm) correspondentes às amostras mais significativas.

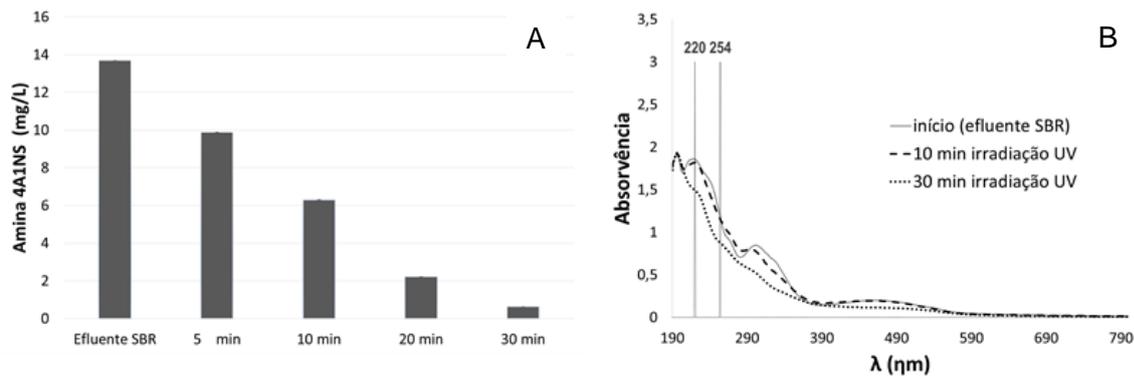


Figura 8.7 – A: Evolução da concentração da amina 4A1NS determinada por HPLC ao longo do processo de irradiação UV do efluente têxtil simulado tratado em SBR; B: Espectros UV-vis de amostras colhidas ao tempo 0 (efluente SBR) e aos tempos 10 e 30 min da experiência.

Verifica-se que para se atingir uma concentração residual de 2 mg/l de amina 4A1NS por irradiação UV (85% de remoção) é necessário um período de 20 min. Os espectros UV-vis de amostras ao longo do tratamento confirmam o resultado anterior, pois aos 10 min ainda é identificável o pico característico da amina 4A1NS a 320 nm.

Um período total de irradiação UV de 30 min parece eliminar, para além da amina examinada, a quase totalidade dos metabolitos detetados no cromatograma inicial, como se observa na Figura 8.8. Neste caso, ao contrário do que se passou com a ozonização, não há aparecimento de novos produtos de oxidação. O espectro UV-vis (Figura 8.7.B) mostra que há uma diminuição na absorvência na zona perto de 220 nm e também na zona perto de 254 nm, zonas características dos anéis aromáticos antraceno e benzeno, respetivamente (Gonçalves 1996).

Em termos de COD verifica-se (Figura 8.8) que a aplicação deste tratamento de AOP praticamente não mineralizou o conteúdo orgânico das amostras ($\leq 5\%$ de eliminação, após irradiação UV) tal como se verificou com a aplicação da ozonização.

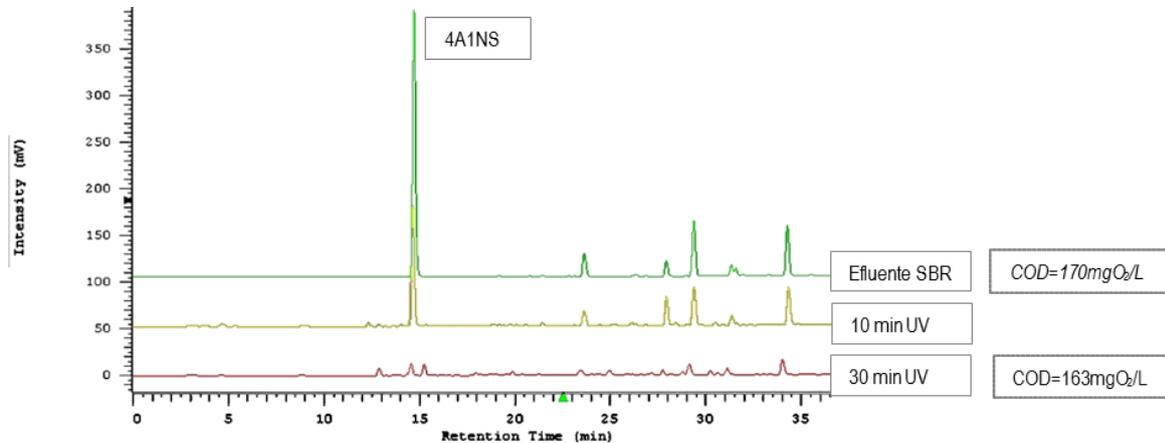


Figura 8.8 – Cromatogramas obtidos em HPLC de amostras colhidas durante a experiência de irradiação UV do efluente têxtil simulado tratado em SBR. São também indicados os valores de COD medidos nas amostras inicial e final do processo.

Não se encontraram estudos similares na bibliografia consultada, ou seja, irradiação UV como pós-tratamento a efluentes do biotratamento de efluentes têxteis contendo corantes azo. Por outro lado, num estudo em que a irradiação UV foi utilizada como pré-tratamento, a mesma não foi aplicada sozinha mas sim em conjunto com H₂O₂ (Dokuzoglu e Alkan 2010) por forma a gerar radicais hidroxilo. A adição de H₂O₂ neste pós-tratamento por irradiação UV poderia facilitar substancialmente o processo de remoção da amina recalcitrante, tornando-se um processo mais atrativo em termos económicos.

Em resumo, a irradiação UV é eficiente na eliminação da amina recalcitrante 4A1NS mas é necessária a sua aplicação por 20 min para se obter 85% de remoção, o que pode tornar este pós-tratamento demasiado oneroso devido ao elevado consumo de energia, em especial se comparado com os 5 min de ozonização necessários para o mesmo efeito.

8.4.3 Efeito do tratamento biológico após aplicação de AOP

O desempenho do reator de tratamento biológico alimentado com o efluente após aplicação dos dois tipos de AOP atrás descritos foi seguido por HPLC, espectrofotometria UV-vis e quantificação de COD, encontrando-se na Figura 8.9 os resultados destes últimos.

Verifica-se que o tratamento biológico incrementou ligeiramente a remoção de COD de forma equivalente no efluente ozonizado e no efluente sujeito a irradiação UV (entre 15 a 20%). No entanto, o espectro UV-vis indica que não há alteração de perfil no efluente ozonizado após o tratamento biológico. Pelo contrário, no efluente sujeito a irradiação UV, após o tratamento o biológico deteta-se um decréscimo de absorvência tanto aos 220 nm como aos 254 nm, mas a banda a 194 nm mantém-se inalterada (zona de absorvência atribuível à fonte de carbono), o que pressupõe alguma degradação biológica de estruturas contendo anéis aromáticos.

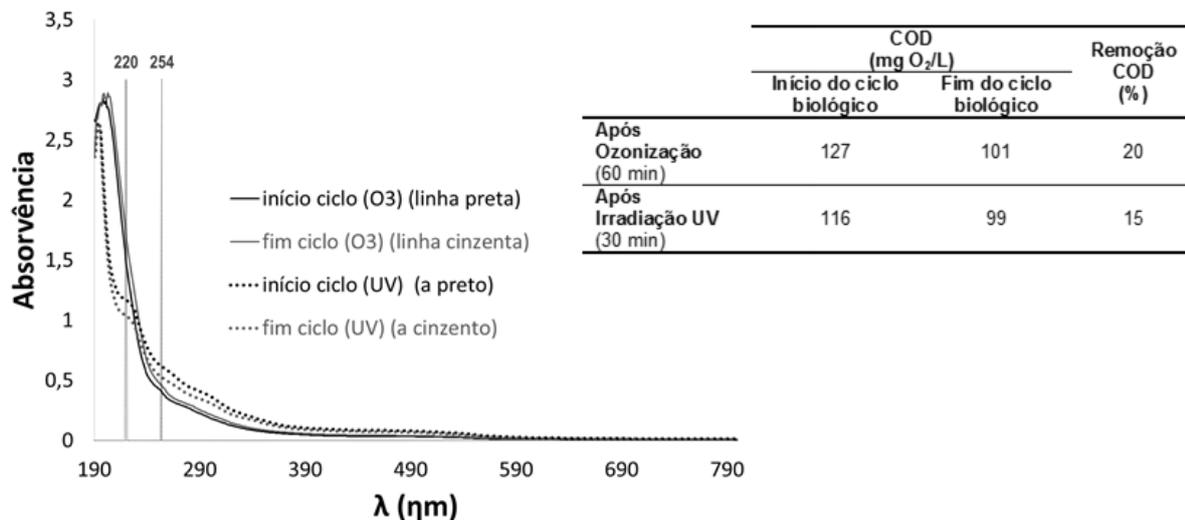


Figura 8.9 – Espectros UV-vis das amostras tratadas por processos AOP no início e fim do ciclo biológico (ozonização - O₃; irradiação UV - UV); valores de COD medidos nas amostras provenientes dos processos AOP no início e fim do ciclo biológico.

Em termos das informações das análises por HPLC o efluente ozonizado mantém, após tratamento biológico, o residual de amina 4A1NS de cerca de 2 mg/L e o pico a 3,3 min tem um decréscimo de área insignificante ($1,5$ e $1,2 \times 10^6$ de área, no início e no fim do ciclo biológico, respetivamente), isto é, não se observam alterações no perfil de produtos. O cromatograma HPLC do efluente irradiado com UV mantém-se igual antes e depois do tratamento biológico, não se identificando picos com área significativa em nenhum dos casos.

A vantagem da recirculação do efluente ao SBR, após aplicação da ozonização, não parece ser muito significativa.

No caso da recirculação do efluente ao SBR após irradiação UV, parece haver vantagens um pouco mais significativas. Para além do incremento da remoção de COD há uma diminuição na abundância de estruturas aromáticas. No entanto só aplicando testes de

toxicidade (antes e depois do biológico) se poderia decidir se as vantagens compensariam a introdução de mais este passo no processo de tratamento do efluente têxtil.

8.4.4 Comparação entre os AOP aplicados e a degradação biológica aeróbia obtida em SBR com inóculo AGS da ETAR de Frielas

Os ensaios de aplicação de AOP ao efluente tratado em SBR decorreram cronologicamente antes da experiência do SBR inoculado com AGS de Frielas (Capítulo 7), na qual se obteve a remoção aparente da amina 4A1NS por via biológica na fase aeróbia.

Na Figura 8.10 comparam-se os perfis espectrais UV-vis de amostras finais dos três casos em que se obteve a remoção da amina 4A1NS, nomeadamente, ozonização, irradiação UV e via biológica aeróbia. Verifica-se que os dois AOP aplicados não geram o mesmo perfil espectral, indicando que, embora a amina seja reduzida a uma concentração muito baixa em ambos, os compostos presentes no efluente final não são os mesmos.

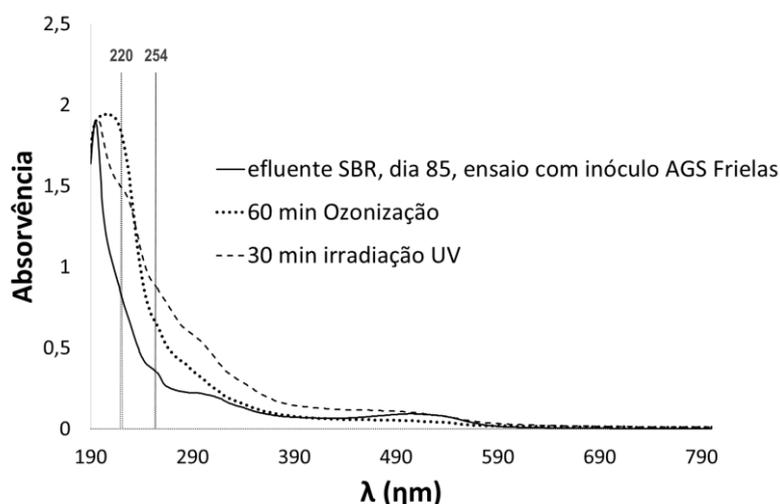


Figura 8.10 – Espectro UV-vis do efluente tratado em SBR e recolhido no dia 85 do ensaio com inóculo de Frielas (oxidação biológica, Capítulo 7) e amostras de efluente tratado em SBR após aplicação de processos de oxidação avançada, ozonização e irradiação UV.

Como já referido, o efluente irradiado com UV apresenta, em comparação com o efluente ozonizado, menor valor de absorvência a 220 nm e maior a 254 nm, sendo estas zonas características de compostos com anéis aromáticos, derivados de antraceno e benzeno, respetivamente (Gonçalves 1996). Este resultado pode indicar que com a irradiação UV ocorre uma abertura do anel de antraceno (mas numa escala reduzida) gerando um anel benzénico substituído.

Observando o espectro do efluente em que a amina foi oxidada biologicamente (Figura 8.10) é notável que este seja o que apresenta menor absorvência entre os comprimentos de onda de 190 e 390 nm, sugerindo uma degradação mais extensa de metabolitos do corante ou de outros compostos presentes no efluente. Tal sugere que o sistema biológico desenvolveu um poderoso e eficiente complexo enzimático oxidativo.

8.5 Conclusões

A eliminação da amina 4A1NS, resultante da redução do corante azo *Acid Red 14*, foi obtida com sucesso pela aplicação de dois processos de oxidação avançada a um efluente previamente tratado em SBR, nomeadamente, a ozonização e a irradiação UV. Uma eficiência de remoção de 85% para a amina 4A1NS pode ser obtida com 5 minutos de ozonização ou 20 minutos de irradiação UV. Verificou-se ainda que a ozonização mais prolongada (até 60 min) provocou o aparecimento de um composto com um tempo de retenção cromatográfico curto, que não corresponde à hidroxilação da amina.

A recirculação ao tratamento biológico após aplicação dos dois processos avançados de oxidação promove um incremento na remoção da carência química de oxigénio superior ou igual a 15%. Contudo, apenas no caso do efluente sujeito a irradiação UV foi possível detetar-se remoção adicional dos solutos aromáticos presentes.

Conclui-se que qualquer destes processo avançados de oxidação (AOP) pode ser aplicado como tratamento de afinação a jusante do tratamento biológico de efluentes têxteis por lamas ativadas, com vista à eliminação das aminas aromáticas recalcitrantes resultantes da redução de corantes azo.

(intencionalmente em branco)

9 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

(intencionalmente em branco)

9.1 Conclusões

Na primeira etapa do trabalho, os testes de biodescoloração anaeróbia de corantes azo por lamas ativadas, realizados em regime descontínuo, conduziram a resultados que permitiram conceber um teste expedito para a seleção de corantes mais amigos do ambiente. Neste conceito, incluem-se uma maior suscetibilidade à biodescoloração em reatores de tratamento biológico de águas residuais têxteis e uma menor tendência para adsorção à respetiva biomassa, o que limitaria a valorização desta como fertilizante de solos agrícolas. Nesta base, foi elaborado um pedido de patente nacional, já concedido.

Durante o desenvolvimento do teste de biodescoloração, foram testadas diferentes hipóteses para o controlo abiótico. Os resultados fornecem pistas relevantes no esforço continuado da investigação nesta área, nomeadamente no que diz respeito à elucidação dos mecanismos biológicos que conduzem à biodescoloração. Verificou-se que, na presença dos inibidores azida ou dicumarol, a inibição da biodescoloração sofria reversão quando a biomassa era sujeita a um período de arejamento na ausência de nutrientes (regime de fome), sendo o efeito tanto mais notório quanto mais prolongado era este período. Contudo, esta perda do efeito de inibição requeria a presença de glucose durante o teste de biodescoloração. O conjunto de resultados sugere que o *stress* induzido pelas condições oligotróficas impostas à biomassa despoleta um mecanismo de respiração do corante, alternativo à via que sofre inibição por azida ou dicumarol e dependente da disponibilidade de glucose. Tal reforça a tese de que os mecanismos de biodescoloração fazem parte de um conjunto inespecífico de vias metabólicas envolvidas na respiração celular, não requerendo necessariamente enzimas específicas, conhecidas como azorredutases.

A primeira etapa das experiências realizadas com biorreatores de grânulos aeróbios alimentados com águas residuais têxteis simuladas (ainda sem corante) demonstrou a possibilidade de produção de lamas granulares aeróbias, a partir de lamas com morfologia de flocos, num reator SBR não tubular, agitado mecanicamente e operado com a fase reacional do ciclo totalmente aeróbia. Desenvolveu-se biomassa em que os grânulos com dimensão de cerca de 0,7 mm eram dominantes, exibindo um valor de SVI_{30} típico de 25 mL/g e uma eficiência média de remoção de COD de 88%, para uma carga orgânica alimentada de 2,0 kg COD/(m³.d). A biomassa obtida foi armazenada durante 7 meses a 25°C e 4°C e subsequentemente utilizada para reiniciar a operação dos biorreatores nas mesmas condições operacionais. Verificou-se que os grânulos armazenados mantiveram bons níveis de integridade e viabilidade, permitindo ao sistema reacional a recuperação do seu desempenho óptimo em poucos dias (< 10 dias). Este resultado permite estabelecer o potencial do sistema de lamas granulares no contexto do tratamento de águas residuais

têxteis, em que a operação intermitente ou sazonal tem fortes possibilidades de ser necessária.

No primeiro ensaio de desenvolvimento de biomassa granular a partir de biomassa em flocos, em biorreator alimentado com efluente têxtil simulado com um ciclo operatório que incluía uma etapa reacional anaeróbia prolongada (3 h), o processo de granulação não foi completado. Utilizou-se a mesma configuração de reator SBR não tubular com agitação mecânica, e foram operados dois reatores em paralelo, um alimentado com uma água residual simulada contendo o corante azo *Acid Red 14* e o outro com a mesma alimentação, sem o corante (controlo). A granulação foi induzida, como anteriormente, pela redução gradual do tempo de sedimentação, mas a biomassa não chegou a exibir valores de SVI_5 e SVI_{30} similares, uma característica chave associada a grânulos completamente desenvolvidos. Um dos fatores observados, de entre os apontados como responsáveis pela granulação incompleta, foi a formação de exopolímeros na forma dispersa, não associada aos grânulos de biomassa. A presença do corante azo na alimentação conduziu a níveis de remoção de COD mais elevados durante a fase anaeróbia, bem como a grânulos mais definidos e com valores de SVI mais baixos, em comparação com o observado no biorreator de controlo. Foi adicionalmente testado um regime operatório com arejamento intermitente durante a etapa reacional do ciclo, que resultou na redução da quantidade de EPS disperso visível em observações de microscopia e levou à formação de agregados de biomassa mais densos. No geral foram obtidas eficiências de descoloração acima de 80% e de remoção de COD até 80%. Verificou-se que a passagem para o regime de arejamento intermitente alterava o perfil de descoloração, levando a valores inferiores de taxa inicial de redução do corante. Este efeito não pôde ser relacionado nem com os valores de potencial de oxidação-redução nem com os de oxigénio dissolvido, medidos no biorreator. Tal aponta para a hipótese de terem ocorrido alterações metabólicas ou de constituição da população microbiana, que também levaram às alterações morfológicas e de sedimentabilidade observadas.

Os resultados obtidos no segundo ensaio em biorreatores SBR, em que a inoculação foi feita com grânulos aeróbios provenientes da ETAR de Frielas, comprovam o excelente desempenho potencial dos sistemas aeróbios com lamas granulares no tratamento de efluentes têxteis contendo corantes azo. Observou-se que a agitação mecânica, ainda que usada somente durante a fase reacional anaeróbia do ciclo operatório (1,5 h), conduziu à desintegração dos grânulos do inóculo. Desenvolveram-se, contudo, novos grânulos que, apesar das suas menores dimensões, exibiam valores excelentes de SVI_5 e SVI_{30} , respetivamente, 22 e 17 mL/g. Estes valores tão baixos indicam uma óptima sedimentabilidade e o facto de serem muito próximos indica que a fração de biomassa não agregada é residual. Após estabilização dos indicadores morfológicos e de desempenho

operacional, a eficiência de remoção de corante atingiu valores acima de 80%, apesar da fase anaeróbia ter a duração de apenas 1,5 h. Verificou-se que a introdução de uma purga controlada de biomassa dos biorreatores, com o objetivo de redução da idade de lamas de 35 para 15 dias, resultou numa imediata diminuição do rendimento de remoção de cor, de 85 para 57%. Esta resposta tão rápida do sistema não encontrou uma explicação satisfatória no conjunto das análises realizadas, mas é um fator importante que urge estudar, pelo seu efeito numa das variáveis críticas de desempenho (descoloração). Ainda neste ensaio, observou-se pela primeira vez a aparente bioconversão de um dos metabolitos primários da biorredução do corante, durante a fase aeróbia do ciclo operacional. A maior extensão da fase aeróbia da etapa reacional, em conjunto com a gama alta de valores de idade de lamas atingida pela biomassa, poderá ter permitido o desenvolvimento nos grânulos de uma população microbiana com capacidade de biodegradação de amins aromáticas recalcitrantes.

Foram ainda realizados ensaios de ozonização e irradiação UV, aplicados ao mesmo efluente têxtil simulado após o seu biotratamento em SBR laboratorial com ocorrência de biodescoloração. Pôde concluir-se que a irradiação conduz a uma conversão mais eficiente de um dos metabolitos primários da biorredução do corante AR14, a amina 4A1NS. No final deste tratamento, observou-se o desaparecimento do pico cromatográfico (HPLC) correspondente a esta amina, não se observando o aparecimento de novos picos indicadores da formação de produtos reacionais subsequentes. Verificou-se igualmente que após um tratamento de ozonização com a duração de 5 min, o pico cromatográfico da amina 4A1NS foi reduzido a uma dimensão correspondente a perto de 85% remoção. Contudo, o prolongamento do tratamento para além de 20 min levou ao aparecimento de um pico adicional com tempo de retenção mais curto. Em termos de eficiência, há a notar que, para se atingir o mesmo grau de remoção da amina 4A1NS (85%) por irradiação UV, foi necessário uma duração mínima de tratamento de 20 min. Os processos de oxidação avançada testados revelaram-se, assim, hipóteses prometedoras para o pós-tratamento de efluentes têxteis pré-tratados em biorreatores de lamas ativadas.

9.2 Perspetivas de trabalho futuro

Face às dificuldades analíticas na identificação e quantificação precisa dos produtos de biodegradação e oxidação avançada de corantes, sentidas no decorrer do trabalho, seria importante complementá-los com a realização de testes de avaliação de toxicidade. Deste modo, a incerteza quanto à identidade e, em consequência, à perigosidade dos produtos emitidos para o meio hídrico seria minimizada. Sugere-se que a toxicidade seja avaliada

com ensaios padronizados, em amostras do efluente simulado alimentado e em amostras colhidas após as etapas reacionais anaeróbia e aeróbia nos biorreatores SBR, bem como a diferentes tempos de tratamento nas etapas de ozonização e irradiação UV. Tal informação seria de grande importância para a quantificação do risco associado aos produtos persistentes resultantes das diferentes fases de tratamento, permitindo ajustar as condições operacionais de forma a minimizá-lo. Em particular, pretende-se aqui obter uma medida das consequências da aparente maior capacidade de conversão de metabolitos da biodescoloração exibida pelo sistema de grânulos aeróbios desenvolvido em biorreator SBR com idade de lamas mais elevada e etapa de arejamento mais prolongada. Se se comprovar que os níveis de destoxificação eventualmente resultantes da etapa biológica são comparáveis aos gerados com os pós-tratamentos por oxidação avançada, tal reforçará o potencial dos grânulos aeróbios para o tratamento de efluentes têxteis.

Tendo em conta as dificuldades encontradas no presente trabalho com a estabilidade dos grânulos desenvolvidos em SBR com agitação mecânica, outro aspeto a estudar no futuro é a otimização da hidrodinâmica do biorreator. Em especial deverão ser testadas alternativas para a agitação na fase anaeróbia, de forma a permitir a manutenção da integridade dos grânulos e o seu crescimento, sem comprometer a biodescoloração.

Após resolução técnica da questão anterior, poder-se-ia avançar para testes de tratamento de efluentes colhidos em instalações industriais têxteis, neste sistema de grânulos aeróbios em SBR não tubular. Em caso de sucesso nestes testes, poder-se-ia partir para um projeto em parceria empresarial para conceção de um protótipo à escala piloto.

BIBLIOGRAFIA

(intencionalmente em branco)

- Adav, S., Lee, D.-J. and Lai, J.Y. (2007) Effects of aeration intensity on formation of phenol-fed aerobic granules and extracellular polymeric substances. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(1), 175-182.
- Adav, S., Lee, D.-J. (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Materials* 154, 1120-1126.
- Adav, S.S., Lee, D.-J. and Lai, J.-Y. (2009) Treating chemical industries influent using aerobic granular sludge: Recent development. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40(3), 333-336.
- Al-Amrani, W.A., Lim, P.-E., Seng, C.-E. and Wan Ngah, W.S. (2014) Factors affecting bio-decolorization of azo dyes and COD removal in anoxic-aerobic REACT operated sequencing batch reactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 45(2), 609-616.
- Alaton, I.A., Balcioglu, I.A. and Bahnemann, D.W. (2002) Advanced oxidation of a reactive dyebath effluent: comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A processes. *Water Research* 36(5), 1143-1154.
- Albuquerque, M.G.E., Lopes, A.T., Serralheiro, M.L., Novais, J.M. and Pinheiro, H.M. (2005) Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Enzyme and Microbial Technology* 36(5-6), 790-799.
- Alphenaar, P.A., Visser, A. and Lettinga, G. (1993) The effect of liquid upward velocity and hydraulic retention time on granulation in UASB reactors treating wastewater with a high sulphate content. *Bioresource Technology* 43(3), 249-258.
- Alves, M., Cavaleiro, A., Ferreira, E.C., Amaral, A.L., Mota, M., da Motta, M., Vivier, H. and Pons, M.N. (2000) Characterization by image analysis of anaerobic sludge under shock conditions. *Water Science and Technology* 41(41), 207-214.
- APHA (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, Washington, D.C.
- Baban, A., Yediler, A., Lienert, D., Kemerdere, N. and Kettrup, A. (2003) Ozonation of high strength segregated effluents from a woollen textile dyeing and finishing plant. *Dyes and Pigments* 58(2), 93-98.
- Babu, B.R., Parande, A.K., Raghu, S. and Kumar, T.P. (2007) Cotton Textile Processing: Waste Generation and Effluent Treatment. *Journal of Cotton Science* 11(3), 141-153.
- Bae, J.-S. and Freeman, H.S. (2007) Aquatic toxicity evaluation of copper-complexed direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments* 73(1), 126-132.
- Bafana, A., Chakrabarti, T. and Devi, S.S. (2008) Azoreductase and dye detoxification activities of *Bacillus velezensis* strain AB. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(5), 1139-1144.
- Barnard, J.L. (1975) Biological nutrient removal without the addition of chemicals. *Water Research* 9(5-6), 485-490.
- Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Dezotti, M. and van Loosdrecht, M.C. (2012a) Simultaneous nitrogen and phosphate removal in aerobic granular sludge reactors operated at different temperatures. *Water Research* 46(12), 3805-3816.
- Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Dezotti, M. and van Loosdrecht, M.C. (2012b) Measuring biomass specific ammonium, nitrite and phosphate uptake rates in aerobic granular sludge. *Chemosphere* 89(10), 1161-1168.
- Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A. and Heijnen, J.J. (1999) Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research* 33(10), 2283-2290.
- Beun, J.J., Paletta, F., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (2000a) Stoichiometry and kinetics of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 67(4), 379-389.
- Beun, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (2000b) Aerobic Granulation. *Water Science and Technology* 41(4-5), 41-48.
- Beun, J.J., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2001) N-Removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 75(1), 82-92.
- Beun, J.J., Dircks, K., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (2002) Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. *Water Research* 36(5), 1167-1180.
- Bisschops, I. and Spanjers, H. (2003) Literature review on textile wastewater characterisation. *Environ Technol* 24(11), 1399-1411.
- Brigé, A., Motte, B., Borloo, J., Buyschaert, G., Devreese, B. and Van Beeumen, J.J. (2008) Bacterial decolorization of textile dyes is an extracellular process requiring a multicomponent electron transfer pathway. *Microbial Biotechnology* 1(1), 40-52.
- Bromley-Challenor, K.C.A., Knapp, J.S., Zhang, Z., Gray, N.C.C., Hetheridge, M.J. and Evans, M.R. (2000) Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic conditions. *Water Research* 34(18), 4410-4418.
- Brown, D. and Laboureur, P. (1983) The aerobic biodegradability of primary aromatic amines. *Chemosphere* 12(3), 405-414.
- Buitrón, G., Quezada, M. and Moreno, G. (2004) Aerobic degradation of the azo dye acid red 151 in a sequencing batch biofilter. *Bioresource Technology* 92(2), 143-149.
- Carta, F., Beun, J.J., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (2001) Simultaneous storage and degradation of phb and glycogen in activated sludge cultures. *Water Research* 35(11), 2693-2701.
- Carvalho, C., Fernandes, A., Lopes, A., Pinheiro, H. and Goncalves, I. (2007) Electrochemical degradation applied to the metabolites of Acid Orange 7 anaerobic biotreatment. *Chemosphere* 67(7), 1316-1324.

- Carvalho, G., Meyer, R.L., Yuan, Z. and Keller, J. (2006) Differential distribution of ammonia- and nitrite-oxidising bacteria in flocs and granules from a nitrifying/denitrifying sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 39(7), 1392-1398.
- Chaudhari, A.U., Tapase, S.R., Markad, V.L. and Kodam, K.M. (2013) Simultaneous decolorization of reactive Orange M2R dye and reduction of chromate by *Lysinibacillus* sp. KMK-A. *Journal of Hazardous Materials* 262(0), 580-588.
- Çınar, Ö., Yaşar, S., Kertmen, M., Demiröz, K., Yigit, N.Ö. and Kitis, M. (2008) Effect of cycle time on biodegradation of azo dye in sequencing batch reactor. *Process Safety and Environmental Protection* 86(6), 455-460.
- Citeve (2012) Estudo das dificuldades das empresas do setor têxtil e vestuário no cumprimento da legislação ambiental, Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal.
- Clarke, E.A. and Anliker, R. (1980) Organic dyes and pigments. In: *The handbook of environmental chemistry*, Springer-Verlag, Berlin.
- Clarke, E.A. and Anliker, R. (1984) Safety in Use of Organic Colorants: Health and Safety Aspects. *Review of Progress in Coloration and Related Topics* 14(1), 84-89.
- Correia, V.M., Stephenson, T. and Judd, S.J. (1994) Characterisation of textile wastewaters - a review. *Environ Technol* 15(10), 917-929.
- Coz, C.J.L. (2005) *Encyclopedia of Toxicology*. Wexler, P. (ed), pp. 104-114, Elsevier Inc.
- Cruz, A. and Buitron, G. (2001) Biodegradation of disperse blue 79 using sequenced anaerobic/aerobic biofilters. *Water Science and Technology* 44(4), 159-166.
- Das, A., Silaghi-Dumitrescu, R., Ljungdahl, L.G. and Kurtz, D.M., Jr. (2005) Cytochrome bd oxidase, oxidative stress, and dioxygen tolerance of the strictly anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. *J Bacteriol* 187(6), 2020-2029.
- de Bruin, L.M., de Kreuk, M.K., van der Roest, H.F., Uijterlinde, C. and van Loosdrecht, M.C. (2004) Aerobic granular sludge technology: an alternative to activated sludge? *Water Science and Technology* 49(11-12), 1-7.
- de Bruin, L.M., Wilhelmus, K.M. and de Kreuk, M.K. (2007) Process and apparatus for the purification of waste water.
- de Kreuk, M.K. and van Loosdrecht, M.C. (2004) Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Science and Technology* 49(11-12), 9-17.
- de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C. (2005a) Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 90(6), 761-769.
- de Kreuk, M.K., McSwain, B.S., Bathe, S., Tay, S.T.L., Schwarzenbeck, N. and Wilderer, P.A. (2005b) Discussion outcomes. In *Aerobic Granular Sludge*, Bathe, S., De Kreuk, M.K., Mc Swain, B.S. and Schwarzenbeck, N. (eds), IWA, London, UK, pp. 153-169.
- de Kreuk, M.K., Pronk, M. and van Loosdrecht, M.C.M. (2005c) Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. *Water Research* 39(18), 4476-4484.
- de Kreuk, M.K. and van Loosdrecht, M.C. (2006) Formation of Aerobic Granules with Domestic Sewage. *Journal of Environmental Engineering* 132(6), 694-697.
- de Kreuk, M.K., Kishida, N. and van Loosdrecht, M.C.M. (2007) Aerobic Granular sludge - state of the art. *Water Science and Technology* 55(8-9), 75-81.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. and Palenzona, D. (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters of Applied Microbiology* 31(6), 438-442.
- Dokuzoğlu, Z. and Alkan, U. (2010) Biotreatability enhancement of aqueous Reactive Black 5 by hydrogen peroxide/ultraviolet advanced oxidation process. *Coloration Technology* 126(5), 308-314.
- dos Santos, A.B., Cervantes, F.J. and van Lier, J.B. (2007) Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology* 98(12), 2369-2385.
- Duque, A.F., Bessa, V.S., Carvalho, M.F., de Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M. and Castro, P.M.L. (2011) 2-Fluorophenol degradation by aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Research* 45(20), 6745-6752.
- Durán, N. and Esposito, E. (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28(2), 83-99.
- EPA (1997) Profile of the Textile Industry, U.S. Environmental Protection Agency.
- Eschenhagen, M., Schuppler, M. and Röske, I. (2003) Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Research* 37(13), 3224-3232.
- ETAD (2003) (Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers). ETAD information on the 19th amendment of restrictions on the marketing and use of certain azocolourants.
- Etterer, T. and Wilderer, P.A. (2001) Generation and properties of aerobic granular sludge. *Water Science and Technology* 43(3), 19-26.
- Evangelista-Barreto, N.S., Albuquerque, C.D., Vieira, R.H.S.F. and Campos-Takaki, G.M. (2009) Cometabolic Decolorization of the Reactive Azo Dye Orange II by *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. *Textile Research Journal* 79(14), 1266-1273.
- EWA (2005) Efficient use of water in the textile finishing industry, E-Water, Official Publication of the European Water Association.

- Fang, Z.-M., Li, T.-L., Chang, F., Zhou, P., Fang, W., Hong, Y.-Z., Zhang, X.-C., Peng, H. and Xiao, Y.-Z. (2012) A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability. *Bioresource Technology* 111(0), 36-41.
- Farabegoli, G., Chiavola, A., Rolle, E. and Naso, M. (2010) Decolorization of Reactive Red 195 by a mixed culture in an alternating anaerobic-aerobic Sequencing Batch Reactor. *Biochemical Engineering Journal* 52(2-3), 220-226.
- Feliu, J.X., Cubarsi, R. and Villaverde, A. (1998) Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells. *Biotechnology and Bioengineering* 58(5), 536-540.
- Field, J.A., Stams, A.J., Kato, M. and Schraa, G. (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67(1), 47-77.
- Figuerola, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L. and Mendez, R. (2008) Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors. *Water Science and Technology* 58(2), 479-485.
- Fournier, M., Zhang, Y., Wildschut, J.D., Dolla, A., Voordouw, J.K., Schriemer, D.C. and Voordouw, G. (2003) Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris hildenborough*. *J Bacteriol* 185(1), 71-79.
- Gao, D., Liu, L., Liang, H. and Wu, W.M. (2011) Comparison of four enhancement strategies for aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Journal of Hazardous Materials* 186(1), 320-327.
- Gao, D., Yuan, X. and Liang, H. (2012) Reactivation performance of aerobic granules under different storage strategies. *Water Research* 46(10), 3315-3322.
- Gao, J., Ellis, L.B.M. and Wackett, L.P. (2010) The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access. *Nucleic Acids Research* 38(suppl 1), D488-D491.
- García-Montano, J., Torrades, F., Perez-Estrada, L.A., Oller, I., Malato, S., Maldonado, M.I. and Peral, J. (2008) Degradation pathways of the commercial reactive azo dye Procion Red H-E7B under solar-assisted photo-Fenton reaction. *Environmental Science & Technology* 42(17), 6663-6670.
- García-Montaño, J., Domènech, X., García-Hortal, J.A., Torrades, F. and Peral, J. (2008) The testing of several biological and chemical coupled treatments for Cibacron Red FN-R azo dye removal. *Journal of Hazardous Materials* 154(1-3), 484-490.
- Gerardi, M.H. (2002) *Settleability Problems and Loss of Solids in the Activated Sludge Process*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Gessesse, B. (2009) *Dye Biodegradation Using Alkalophilic Consortia in Anaerobic- Aerobic Bioprocess* (PhD tesis), Addis Ababa University.
- Ghangrekar, M.M., Asolekar, S.R. and Joshi, S.G. (2005) Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. *Water Research* 39(6), 1123-1133.
- Giesen, A., De Bruin, L.M.M., Niermans, R.P. and Van der Roest, H.F. (2013) Advancements in the application of aerobic granular biomass technology for sustainable treatment of wastewater. *Water Practice & Technology* 8(1), 47-54.
- Gobi, K., Mashitah, M.D. and Vadivelu, V.M. (2011) Development and utilization of aerobic granules for the palm oil mill (POM) wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* 174(1), 213-220.
- Goi, A. and Trapido, M. (2002) Hydrogen peroxide photolysis, fenton reagent and photo-fenton for the degradation of nitrophenols: a comparative study. *Chemosphere* 46(6), 913-922.
- Goncalves, I.C., Penha, S., Matos, M., Santos, A.R., Franco, F. and Pinheiro, H.M. (2005) Evaluation of an integrated anaerobic/aerobic SBR system for the treatment of wool dyeing effluents. Purification of wool dyeing effluent in a SBR. *Biodegradation* 16(1), 81-89.
- Goncalves, I.C., Lopes, L., Pinheiro, H.M. and Ferra, M.I. (2009) Behaviour of different anaerobic populations on the biodegradation of textile chemicals. *Journal of Hazardous Materials* 172(2-3), 1236-1243.
- Gonçalves, M.L.S.S. (1996) *Encyclopedia of Toxicology*. Wexler, P. (ed), Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Gonzalez-Martinez, S., Pina-Mondragon, S. and Gonzalez-Barceló, O. (2010) Treatment of the azo dye direct blue 2 in a biological aerated filter under anaerobic/aerobic conditions. *Water Science & Technology* 61(3), 789-796.
- Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A. and Forsythe, S. (2003) The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology* 101(1), 49-56.
- Greaves, A.J., Churchley, J.H., Hutchings, M.G., Phillips, D.A. and Taylor, J.A. (2001) A chemometric approach to understanding the bioelimination of anionic, water-soluble dyes by a biomass using empirical and semi-empirical molecular descriptors. *Water Research* 35(5), 1225-1239.
- Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (1998) Method for acquiring grain-shaped growth of a microorganism in a reactor.
- Hong, Y., Chen, X., Guo, J., Xu, Z., Xu, M. and Sun, G. (2007a) Effects of electron donors and acceptors on anaerobic reduction of azo dyes by *Shewanella decolorationis* S12. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(1), 230-238.
- Hong, Y., Guo, J., Xu, Z., Mo, C., Xu, M. and Sun, G. (2007b) Reduction and partial degradation mechanisms of naphthylaminesulfonic azo dye amaranth by *Shewanella decolorationis* S12. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(3), 647-654.
- Hong, Y., Xu, M., Guo, J., Xu, Z., Chen, X. and Sun, G. (2007c) Respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12 with an Azo compound as the sole electron acceptor. *Applied Environmental Microbiology* 73(1), 64-72.
- Hong, Y., Guo, J. and Sun, G. (2008) Characteristics and phylogenetic analysis of the facultative anaerobic dissimilatory azoreducing bacteria from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61(4), 313-318.

- Hong, Y.G., Guo, J. and Sun, G.P. (2009) Energy generation coupled to azoreduction by membranous vesicles from *Shewanella decolorationis* S12. *J Microbiol Biotechnol* 19(1), 37-41.
- Hosseini Koupaie, E., Alavi Moghaddam, M.R. and Hashemi, S.H. (2013) Evaluation of integrated anaerobic/aerobic fixed-bed sequencing batch biofilm reactor for decolorization and biodegradation of azo dye Acid Red 18: Comparison of using two types of packing media. *Bioresource Technology* 127(0), 415-421.
- Inocêncio, P., Coelho, F., van loosdrecht, M. and Giensen, A. (2013) The future of sewage treatment: Nereda technology exceeds high expectations. *Water* 21 April 2013, 28-29.
- Işık, M. and Sponza, D.T. (2004) Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. *Journal of Hazardous Materials* 114(1-3), 29-39.
- Işık, M. and Sponza, D.T. (2008) Anaerobic/aerobic treatment of a simulated textile wastewater. *Separation and Purification Technology* 60(1), 64-72.
- Jiang, B. and Liu, Y. (2012) Roles of ATP-dependent N-acylhomoserine lactones (AHLs) and extracellular polymeric substances (EPSs) in aerobic granulation. *Chemosphere* 88(9), 1058-1064.
- Jin, X.C., Liu, G.Q., Xu, Z.H. and Tao, W.Y. (2007) Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(1), 239-243.
- Jonstrup, M., Kumar, N., Murto, M. and Mattiasson, B. (2011) Sequential anaerobic-aerobic treatment of azo dyes: Decolourisation and amine degradability. *Desalination* 280(1-3), 339-346.
- Junemann, S. (1997) Cytochrome bd terminal oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1321(2), 107-127.
- Kapdan, I.K. and Oztekin, R. (2006) The effect of hydraulic residence time and initial COD concentration on color and COD removal performance of the anaerobic-aerobic SBR system. *Journal of Hazardous Materials* 136(3), 896-901.
- Karahan, O., Orhon, D. and van Loosdrecht, M.C. (2008) Simultaneous storage and utilization of polyhydroxyalkanoates and glycogen under aerobic conditions. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 58(4), 945-951.
- Karcher, S., Kornmüller, A. and Jekel, M. (2001) Screening of commercial sorbents for the removal of reactive dyes. *Dyes and Pigments* 51(2-3), 111-125.
- Keck, A., Klein, J., Kudlich, M., Stolz, A., Knackmuss, H.J. and Mattes, R. (1997) Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied Environmental Microbiology* 63(9), 3684-3690.
- Keller, J. and Giensen, A. (2010) Advancements in Aerobic Granular Biomass Processes, Neptune and Innowatech End User Conference, Gent, Belgium,
http://www.eu-neptune.org/End%20User%20Conference/1_Keller_Giesen_Innowatech_Granulation.pdf.
- Keyhani, E. and Minai-Tehrani, D. (2001) The binding of cyanide to cytochrome d in intact cells, spheroplasts, membrane fragments and solubilized enzyme from *Salmonella typhimurium*. *Biochim Biophys Acta* 1506(1), 1-11.
- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S. and Chimni, S.S. (2005) Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes. *Water Research* 39(20), 5135-5141.
- Kim, J.H., Kim, H.S. and Lee, B.H. (2011) Combination of Sequential Batch Reactor (SBR) and Dissolved Ozone Flotation-Pressurized Ozone Oxidation (DOF-PO2) Processes for Treatment of Pigment Processing Wastewater. *Environmental engineering research* 16(2), 97-102.
- Kolekar, Y.M. and Kodam, K.M. (2012) Decolorization of textile dyes by *Alishewanella* sp. KMK6. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(2), 521-529.
- Kolekar, Y.M., Nemade, H.N., Markad, V.L., Adav, S.S., Patole, M.S. and Kodam, K.M. (2012) Decolorization and biodegradation of azo dye, reactive blue 59 by aerobic granules. *Bioresource Technology* 104(0), 818-822.
- Kong, Y., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H. (2005) Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied Environmental Microbiology* 71(7), 4076-4085.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. and Matosic, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 94(6), 981-987.
- Koupaie, E.H., Moghaddam, M.R.A. and Hashemi, S.H. (2012) Investigation of decolorization kinetics and biodegradation of azo dye Acid Red 18 using sequential process of anaerobic sequencing batch reactor/moving bed sequencing batch biofilm reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation* 71(0), 43-49.
- Kristiansen, R., Nguyen, H.T.T., Saunders, A.M., Nielsen, J.L., Wimmer, R., Le, V.Q., McIlroy, S.J., Petrovski, S., Seviour, R.J., Calteau, A., Nielsen, K.L. and Nielsen, P.H. (2013) A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal. *ISME J* 7(3), 543-554.
- Kudlich, M., Keck, A., Klein, J. and Stolz, A. (1997) Localization of the Enzyme System Involved in Anaerobic Reduction of Azo Dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and Effect of Artificial Redox Mediators on the Rate of Azo Dye Reduction. *Applied Environmental Microbiology* 63(9), 3691-3694.
- Kudlich, M., Hetheridge, M.J., Knackmuss, H.-J. and Stolz, A. (1999) Autoxidation Reactions of Different Aromatic o-Aminohydroxynaphthalenes That Are Formed during the Anaerobic Reduction of Sulfonated Azo Dyes. *Environmental Science & Technology* 33(6), 896-901.
- Kulla, H., Klausener, F., Meyer, U., Lüdeke, B. and Leisinger, T. (1983) Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes Orange I and Orange II. *Archives of Microbiology* 135(1), 1-7.

- Kwok, W.K., Picioreanu, C., Ong, S.L., van Loosdrecht, M.C., Ng, W.J. and Heijnen, J.J. (1998) Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 58(4), 400-407.
- Lemaire, R., Yuan, Z., Blackall, L.L. and Crocetti, G.R. (2008) Microbial distribution of *Accumulibacter* spp. and *Competibacter* spp. in aerobic granules from a lab-scale biological nutrient removal system. *Environ Microbiol* 10(2), 354-363.
- Libra, J., Yoo, E.S., Borchert, M. and Wiesmann, U. (1997) Mechanisms of biological decolorization: their engineering application. *Biologische Abwasserreinigung* 9, 245-266.
- Lin, S.H. and Peng, C.F. (1994) Treatment of textile wastewater by electrochemical method. *Water Research* 28(2), 277-282.
- Lin, Y., de Kreuk, M., van Loosdrecht, M.C.M. and Adin, A. (2010) Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant. *Water Research* 44(11), 3355-3364.
- Lin, Y.M., Sharma, P.K. and van Loosdrecht, M.C.M. (2013) The chemical and mechanical differences between alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic flocculent sludge and aerobic granular sludge. *Water Research* 47(1), 57-65.
- Liu, L., Sheng, G.-P., Li, W.-W., Tong, Z.-H., Zeng, R.J., Liu, J.-X., Xie, J., Peng, S.-C. and Yu, H.-Q. (2011) Cultivation of aerobic granular sludge with a mixed wastewater rich in toxic organics. *Biochemical Engineering Journal* 57(0), 7-12.
- Liu, Y.-Q., Wu, W.-W., Tay, J.-H. and Wang, J.-L. (2007) Starvation is not a prerequisite for the formation of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(1), 211-216.
- Liu, Y. and Fang, H.H.P. (2003) Influences of Extracellular Polymeric Substances (EPS) on Flocculation, Settling, and Dewatering of Activated Sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33(3), 237-273.
- Liu, Y., Yang, S.-F., Liu, Q.-S. and Tay, J.-H. (2003) The Role of Cell Hydrophobicity in the Formation of Aerobic Granules. *Current Microbiology* 46(4), 0270-0274.
- Liu, Y. and Tay, J.H. (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22(7), 533-563.
- Liu, Y., Yang, S.-F., Tay, J.-H., Liu, Q.-S., Qin, L. and Li, Y. (2004) Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. *Enzyme and Microbial Technology* 34(5), 371-379.
- Liu, Y. (2008) *Wastewater purification: aerobic granulation in sequencing batch reactors*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York.
- Liu, Y.Q. and Tay, J.H. (2008) Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 99(5), 980-985.
- López-Palau, S., Pinto, A., Basset, N., Dosta, J. and Mata-Álvarez, J. (2012) ORP slope and feast-famine strategy as the basis of the control of a granular sequencing batch reactor treating winery wastewater. *Biochemical Engineering Journal* 68(0), 190-198.
- Lopez, A., Iaconi, C., Mascolo, G. and Pollice, A. (2012) *Innovative and integrated technologies for the treatment of industrial wastewater (INNOWATECH)*, IWA Publishing, London, New York.
- López Palau, S., Dosta, J. and Mata-Álvarez, J. (2009) Start-up of an aerobic granular sequencing batch reactor for the treatment of winery wastewater. *Water Science & Technology* 60(4), 1049-1054.
- Lotito, A.M., Fratino, U., Bergna, G. and Di Iaconi, C. (2012a) Integrated biological and ozone treatment of printing textile wastewater. *Chemical Engineering Journal* 195-196(0), 261-269.
- Lotito, A.M., Fratino, U., Mancini, A., Bergna, G. and Di Iaconi, C. (2012b) Effective aerobic granular sludge treatment of a real dyeing textile wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 69(0), 62-68.
- Lourenço, N.D., Novais, J.M. and Pinheiro, H.M. (2000) Reactive textile dye colour removal in a sequencing batch reactor. *Water Science & Technology* 42(4-5), 321-328.
- Lourenço, N.D., Novais, J.M. and Pinheiro, H.M. (2001) Effect of some operational parameters on textile dye biodegradation in a sequential batch reactor. *Journal of Biotechnology* 89(2-3), 163-174.
- Lourenço, N.D. (2003) *Azo dye biodegradation in Sequencing Batch Reactors* (PhD tesis), Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Lourenço, N.D., Novais, J.M. and Pinheiro, H.M. (2006) Kinetic Studies of Reactive Azo Dye Decolorization in Anaerobic/aerobic Sequencing Batch Reactors. *Biotechnology Letters* 28(10), 733-739.
- M. Figueroa, Val del Río, A., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A. and Mendez, R. (2011) Treatment of high loaded swine slurry in an aerobic granular reactor. *Water Science and Technology* 63(9), 1808-1814.
- Maas, R. and Chaudhari, S. (2005) Adsorption and biological decolourization of azo dye Reactive Red 2 in semicontinuous anaerobic reactors. *Process Biochemistry* 40(2), 699-705.
- Majone, M., Massanisso, P., Carucci, A., Lindrea, K. and Tandoi, V. (1996) Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking. *Water Science and Technology* 34(5-6), 223-232.
- Mata, A.M.T., Lourenço, N.D., and Pinheiro, H.M. (2010) Effect of a respiratory inhibitor on the bioconversion of a xenobiotic by activated sludge. In: *Microorganisms in Industry and Environment, From scientific and industrial research to consumer products*, A Mendez-Villas (ed), 158-162, World Scientific Publishing.
- Mata, A.T.M., Lourenço, N.D. and Pinheiro, H.M. (2012) Mata, A.T.M., Lourenço, N.D. and Pinheiro, H.M. Start-Up of an Aerobic Granular Sludge Non Tubular Reator, in: *Environmental Science and Technology, Vol.1*, George Sorial e Jihua Hong (Eds.), pp. 260-264, American Science Press.

- Mata, A.M.T., Pinheiro, H.M. and Lourenço, N.D. (2015) Effect of Sequencing Batch Cycle Strategy on the Treatment of a Simulated Textile Wastewater with Aerobic Granular Sludge. *Biochemical Engineering Journal* (Available online 14 April 2015) (0).
- Matim, A. (2009) *Encyclopedia of Microbiology*. Schaechter, M. (ed), pp. 485-500, Academic Press.
- McSwain, B.S., Irvine, R.L. and Wilderer, P.A. (2004) The effect of intermittent feeding on aerobic granule structure. *Water Science and Technology* 49(11-12), 19-25.
- McSwain, B.S., Irvine, R.L., Hausner, M. and Wilderer, P.A. (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied Environmental Microbiology* 71(2), 1051-1057.
- Melgoza, R.M., Cruz, A. and Buitron, G. (2004) Anaerobic/aerobic treatment of colorants present in textile effluents. *Water Science and Technology* 50(2), 149-155.
- Metcalf & Eddy., T., G., Burton, F. L. , Stensel, H. D. (2003) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* (Metcalf & Eddy), M Graw Hill, Boston.
- Moreira, M.A., Lourenço, N.D. and Pinheiro, H.M. (2011) Characterization of the microbial population dynamics in sequencing batch reactors (PhD tesis), Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Morgenroth, E., Sherden, T., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. and Wilderer, P.A. (1997) Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Research* 31(12), 3191-3194.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V. and Yaropolov, A.I. (2007) "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)* 72(10), 1136-1150.
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C. (2005) Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Research* 39(12), 2676-2686.
- Moussavi, G., Barikbin, B. and Mahmoudi, M. (2010) The removal of high concentrations of phenol from saline wastewater using aerobic granular SBR. *Chemical Engineering Journal* 158(3), 498-504.
- Muda, K., Aris, A., Salim, M.R., Ibrahim, Z., Yahya, A., van Loosdrecht, M.C., Ahmad, A. and Nawahwi, M.Z. (2010) Development of granular sludge for textile wastewater treatment. *Water Research* 44(15), 4341-4350.
- Muda, K., Aris, A., Salim, M.R., Ibrahim, Z., van Loosdrecht, M.C.M., Ahmad, A. and Nawahwi, M.Z. (2011) The effect of hydraulic retention time on granular sludge biomass in treating textile wastewater. *Water Research* 45(16), 4711-4721.
- O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, S., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L. and Wilcox, S. (2000) Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(2), 249-254.
- O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenço, N.D., Pinheiro, H.M. and Delée, W. (1999) Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 74(11), 1009-1018.
- O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Esteves, S. and Wilcox, S.J. (2000) Anaerobic-aerobic biotreatment of simulated textile effluent containing varied ratios of starch and azo dye. *Water Research* 34(8), 2355-2361.
- Oehmen, A., Saunders, A.M., Vives, M.T., Yuan, Z. and Keller, J. (2006) Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources. *Journal of Biotechnology* 123(1), 22-32.
- Oller, I., Malato, S. and Sánchez-Pérez, J.A. (2011) Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review. *Science of The Total Environment* 409(20), 4141-4166.
- Ong, S.-A., Toorisaka, E., Hirata, M. and Hano, T. (2005) Decolorization of azo dye (Orange II) in a sequential UASB-SBR system. *Separation and Purification Technology* 42(3), 297-302.
- Pan, S., Tay, J.H., He, Y.X. and Tay, S.T. (2004) The effect of hydraulic retention time on the stability of aerobically grown microbial granules. *Letters of Applied Microbiology* 38(2), 158-163.
- Pandey, A., Singh, P. and Iyengar, L. (2007) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59(2), 73-84.
- Panswad, T. and Luangdilok, W. (2000) Decolorization of reactive dyes with different molecular structures under different environmental conditions. *Water Research* 34(17), 4177-4184.
- Panswad, T., Iamsamer, K. and Anotai, J. (2001) Decolorization of azo-reactive dye by polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* 76(2), 151-159.
- Pearce, C.I., Lloyd, J.R. and Guthrie, J.T. (2003) The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments* 58(3), 179-196.
- Pedro Silva, J., Sousa, S., Rodrigues, J., Antunes, H., Porter, J.J., Gonçalves, I. and Ferreira-Dias, S. (2004) Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. *Separation and Purification Technology* 40(3), 309-315.
- Pereira, L., Coelho, A.V., Viegas, C.A., Santos, M.M.C.d., Robalo, M.P. and Martins, L.O. (2009) Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *Journal of Biotechnology* 139(1), 68-77.
- Pinheiro, H.M., Touraud, E. and Thomas, O. (2004) Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments* 61(2), 121-139.
- Poindexter, J.S. (2009) *Encyclopedia of Microbiology*. Schaechter, M. (ed), pp. 240-257, Academic Press.
- Poole, R.K. and Cook, G.M. (2000) *Advances in Microbial Physiology*, pp. 165-224, Academic Press.
- Quarmby, J. and Forster, C.F. (1995) An examination of the structure of UASB granules. *Water Research* 29(11), 2449-2454.

- Razo-Flores, E., Donlon, B., Lettinga, G. and Field, J.A. (1997) Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge. *FEMS Microbiol Rev* 20(3-4), 525-538.
- Ren, T.-t., Yu, H.-q. and Li, X.-y. (2010) The quorum-sensing effect of aerobic granules on bacterial adhesion, biofilm formation, and sludge granulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(3), 789-797.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P. (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77(3), 247-255.
- Rosman, N.H., Nor Anuar, A., Othman, I., Harun, H., Sulong, M.Z., Elias, S.H., Mat Hassan, M.A.H., Chelliapan, S. and Ujang, Z. (2013) Cultivation of aerobic granular sludge for rubber wastewater treatment. *Bioresource Technology* 129(0), 620-623.
- Schwarzenbeck, N., Erley, R. and Wilderer, P.A. (2004) Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. *Water Science and Technology* 49(11-12), 41-46.
- Schwarzenbeck, N., Borges, J.M. and Wilderer, P.A. (2005) Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66(6), 711-718.
- Seshadri, S., Bishop, P.L. and Agha, A.M. (1994) Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. *Waste Management* 14(2), 127-137.
- Seviour, T., Pijuan, M., Nicholson, T., Keller, J. and Yuan, Z. (2009a) Understanding the properties of aerobic sludge granules as hydrogels. *Biotechnology and Bioengineering* 102(5), 1483-1493.
- Seviour, T., Pijuan, M., Nicholson, T., Keller, J. and Yuan, Z. (2009b) Gel-forming exopolysaccharides explain basic differences between structures of aerobic sludge granules and floccular sludges. *Water Research* 43(18), 4469-4478.
- Seviour, T., Yuan, Z., van Loosdrecht, M.C. and Lin, Y. (2012) Aerobic sludge granulation: a tale of two polysaccharides? *Water Research* 46(15), 4803-4813.
- Seviour, T.W., Lambert, L.K., Pijuan, M. and Yuan, Z. (2011) Selectively inducing the synthesis of a key structural exopolysaccharide in aerobic granules by enriching for *Candidatus "Competibacter phosphatis"*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92(6), 1297-1305.
- Sharma, P., Goel, R. and Capalash, N. (2007) Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(6), 823-832.
- Shaw, C.B., Carliell, C.M. and Wheatley, A.D. (2002) Anaerobic/aerobic treatment of coloured textile effluents using sequencing batch reactors. *Water Research* 36(8), 1993-2001.
- Sheng-Hua, Z., Xin, Y., Feng, G. and Zhuo-ying, W. (2011) Effect of interspecies quorum sensing on the formation of aerobic granular sludge. *Water Science & Technology* 64(6), 1284-1290.
- Shore (2002) *Colorants and auxiliaries, Volume 1 - Colorants*, Society of Dyers and Colourists.
- Silva, M. (1999) *A Indústria Têxtil e o Ambiente – Desafios actuais do Sector*. Revista AEP 28.
- Solís, M., Solís, A., Pérez, H.I., Manjarrez, N. and Flores, M. (2012) Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry* 47(12), 1723-1748.
- Sponza, D.T. and Işık, M. (2002) Decolorization and azo dye degradation by anaerobic/aerobic sequential process. *Enzyme and Microbial Technology* 31(1-2), 102-110.
- Sponza, D.T. and Işık, M. (2005) Toxicity and intermediates of C.I. Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. *Process Biochemistry* 40(8), 2735-2744.
- Stolz, A. (2001) Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(1-2), 69-80.
- Tan, N.C., van Leeuwen, A., van Voorthuizen, E.M., Slenders, P., Prenafeta-Boldu, F.X., Temmink, H., Lettinga, G. and Field, J.A. (2005a) Fate and biodegradability of sulfonated aromatic amines. *Biodegradation* 16(6), 527-537.
- Tan, N.G., Leeuwen, A., Voorthuizen, E.v., Slenders, P., Prenafeta-Boldu, F., Temmink, H., Lettinga, G. and Field, J. (2005b) Fate and biodegradability of sulfonated aromatic amines. *Biodegradation* 16(6), 527-537.
- Tay, J.H., Liu, Q.S. and Liu, Y. (2001a) Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *J Appl Microbiol* 91(1), 168-175.
- Tay, J.H., Liu, Q.S. and Liu, Y. (2001b) The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(1-2), 227-233.
- Tay, J.H., Liu, Q.S. and Liu, Y. (2001c) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters of Applied Microbiology* 33(3), 222-226.
- Tay, J.H., Liu, Q.S. and Liu, Y. (2002a) Characteristics of aerobic granules grown on glucose and acetate in sequential aerobic sludge blanket reactors. *Environ Technol* 23(8), 931-936.
- Tay, J.H., Yang, S.F. and Liu, Y. (2002b) Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(2-3), 332-337.
- Tay, S.T., Moy, B.Y., Jiang, H.L. and Tay, J.H. (2005) Rapid cultivation of stable aerobic phenol-degrading granules using acetate-fed granules as microbial seed. *J Biotechnol* 115(4), 387-395.
- van der Zee, F.P., Bisschops, I.A., Blanchard, V.G., Bouwman, R.H., Lettinga, G. and Field, J.A. (2003) The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge. *Water Research* 37(13), 3098-3109.
- van der Zee, F.P. and Villaverde, S. (2005) Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes—A short review of bioreactor studies. *Water Research* 39(8), 1425-1440.

- Van Loosdrecht, M.C. and de Kreuk, M.K. (2006) Method for the treatment of waste water with sludge granules
- van Loosdrecht, M.C.M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L. and Heijnen, J.J. (1995) Biofilm structures. *Water Science and Technology* 32(8), 35-43.
- van Loosdrecht, M.C.M., Pot, M.A. and Heijnen, J.J. (1997) Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Water Science and Technology* 35(1), 41-47.
- Vandevivere, P.C., Bianchi, R. and Verstraete, W. (1998) Review: Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 72(4), 289-302.
- Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z. and Bond, P.L. (2013) Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Research* 47(14), 5338-5349.
- Verdult, E. (2011) Purely Based on Character, <http://tudelft.nl/fileadmin/UD/MenC/Support/Internet/TU%20Website/TU%20Delft/Images/Actueel/Universiteitsbladen/Background5.pdf>.
- Vollertsen, J., Jahn, A., Lund Nielsen, J., Hvitved-Jacobsen, T. and Halkjær Nielsen, P. (2001) Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater. *Water Research* 35(7), 1649-1658.
- Wan, C., Lee, D.-J., Yang, X., Wang, Y. and Lin, L. (2014a) Saline storage of aerobic granules and subsequent reactivation. *Bioresource Technology* 172(0), 418-422.
- Wan, C., Zhang, Q., Lee, D.-J., Wang, Y. and Li, J. (2014b) Long-term storage of aerobic granules in liquid media: Viable but non-culturable status. *Bioresource Technology* 166(0), 464-470.
- Wang, S.G., Liu, X.W., Zhang, H.Y., Gong, W.X., Sun, X.F. and Gao, B.Y. (2007a) Aerobic granulation for 2,4-dichlorophenol biodegradation in a sequencing batch reactor. *Chemosphere* 69(5), 769-775.
- Wang, X., Zhang, H., Yang, F., Wang, Y. and Gao, M. (2008) Long-term storage and subsequent reactivation of aerobic granules. *Bioresource Technology* 99(17), 8304-8309.
- Wang, Z.W., Liu, Y. and Tay, J.H. (2005) Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(4), 469-473.
- Wang, Z.W., Liu, Y. and Tay, J.H. (2007b) Biodegradability of extracellular polymeric substances produced by aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(2), 462-466.
- Web-page (2013) Color Index.
- Wingender, J., Neu, T.R. and Flemming, H. (1999) *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure, and Function*, Springer, Berlin.
- Winkler, M.K., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., de Bruin, L.M., van den Brand, T.P. and van Loosdrecht, M.C. (2011) Selective sludge removal in a segregated aerobic granular biomass system as a strategy to control PAO-GAO competition at high temperatures. *Water Research* 45(11), 3291-3299.
- Winkler, M.K., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Sorokin, D.Y. and van Loosdrecht, M.C. (2012) Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94(6), 1657-1666.
- Woznica, A., Dzirba, J., Manka, D. and Labuzek, S. (2003) Effects of electron transport inhibitors on iron reduction in *Aeromonas hydrophila* strain KB1. *Anaerobe* 9(3), 125-130.
- Wu, J., Kim, K.-S., Lee, J.-H. and Lee, Y.-C. (2010) Cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzymatic properties of laccase from *Aeromonas hydrophila* WL-11. *Journal of Environmental Sciences* 22(4), 635-640.
- Xiong, Y. and Liu, Y. (2010) Involvement of ATP and autoinducer-2 in aerobic granulation. *Biotechnology and Bioengineering* 105(1), 51-58.
- Yang, Y., Wei, B., Zhao, Y. and Wang, J. (2013) Construction of an integrated enzyme system consisting azoreductase and glucose 1-dehydrogenase for dye removal. *Bioresource Technology* 130(0), 517-521.
- Yilmaz, G., Lemaire, R., Keller, J. and Yuan, Z. (2008) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 100(3), 529-541.
- You, S.-J., Damodar, R.A. and Hou, S.-C. (2010) Degradation of Reactive Black 5 dye using anaerobic/aerobic membrane bioreactor (MBR) and photochemical membrane reactor. *Journal of Hazardous Materials* 177(1-3), 1112-1118.
- Zaharia, C. and Suteu, D. (2012) *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update*. Puzyn, T. and Mostrag-Szlichtyng, A. (eds), InTech.
- Zeng, P., Zhuang, W.Q., Tay, S.T. and Tay, J.H. (2007) The influence of storage on the morphology and physiology of phthalic acid-degrading aerobic granules. *Chemosphere* 69(11), 1751-1757.
- Zhang, L.-L., Zhu, R.Y., Chen, J.M. and Cai, W.M. (2008) Biodegradation of methyl tert-butyl ether as a sole carbon source by aerobic granules cultivated in a sequencing batch reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(6), 527-534.
- Zheng, Y.M., Yu, H.Q., Liu, S.J. and Liu, X.Z. (2006) Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere* 63(10), 1791-1800.
- Zhu, J. and Wilderer, P.A. (2003) Effect of extended idle conditions on structure and activity of granular activated sludge. *Water Research* 37(9), 2013-2018.
- Zhu, L., Lv, M., Dai, X., Xu, X., Qi, H. and Yu, Y. (2012) Reaction kinetics of the degradation of chloroanilines and aniline by aerobic granule. *Biochemical Engineering Journal* 68(0), 215-220.

Zissi, U. and Lyberatos, G. (1996) Azo-dye biodegradation under anoxic conditions. *Water Science & Technology* 34(5-6), 495-500.

(intencionalmente em branco)

ANEXO Produção científica no âmbito do doutoramento

(intencionalmente em branco)

Tipo de contribuição científica	Tese
<p>Prémios e distinções</p> <p>2011 BEST POSTER AWARD of 8th IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies, Amsterdam (LET), The Netherlands, 6-10 June, with the paper "Does activated sludge starvation enhance dye bioconversion in the presence of inhibitory compounds?", A.M.T. Mata, N. D. Lourenco, H. M. Pinheiro.</p>	Cap.4
<p>Patentes</p> <p>2012 Patente de Invenção Nacional nº106673 , "PROCESSO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA DE BIOMASSA E SUA UTILIZAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DOS POTENCIAIS DE BIODESCOLORAÇÃO E DE ADSORÇÃO DE CORANTES AZO", Co-titularidade: Instituto Superior Técnico e Instituto Politécnico de Setúbal, Data de Prioridade: 20 de Novembro de 2012. Pag. 1-25, CONCEDIDA em 16-01-2015.</p> <p>http://213.63.128.81/files/collections/pt_PT/49/55/493/513/2014-05-29.pdf (pag.37, <u>Ver Fascículo Completo</u>)</p>	Cap.4
<p>Artigos em revistas internacionais com arbitragem científica</p> <p>2015 Mata, A.M.T., Pinheiro, H.M. and Lourenço, N.D., Effect of sequencing batch cycle strategy on the treatment of a simulated textile wastewater with aerobic granular sludge, Biochemical Engineering Journal, Available online 14 April 2015. Quartil Q1. doi:10.1016/j.bej.2015.04.005</p> <p>http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X15001308</p>	Cap. 6
<p>Capítulos de livros em obra colectiva</p> <p>2010 Mata, A.M.T., Lourenço, N.D., and Pinheiro, H.M., Effect of a respiratory inhibitor on the bioconversion of a xenobiotic by activated sludge. In: Microorganisms in Industry and Environment, From scientific and industrial research to consumer products, A Mendez-Villas ed., World Scientific Publishing, 158-162. (ISBN-13: 978-981-4322-10-2).</p> <p>http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789814322119_0035</p> <p>2012 Mata, A.T.M., Lourenço, N.D. and Pinheiro, H.M. Start-Up of an Aerobic Granular Sludge Non Tubular Reactor, in: Environmental Science and Technology, Vol.1, George Sorial e Jihua Hong (Eds.), , American Science Press, Houston, pp. 260-264. (ISBN: 9780976885351)</p> <p>http://www.aasci.org/conference/env/2012/EST2012-Proceedings-I.pdf</p>	Cap.4 Cap.5
<p>Publicações em livros de encontros científicos</p> <p>2009 Mata, A. M. T., Lourenço N. D., Pinheiro H. M.. Effect of a respiratory inhibitor on the bioconversion of a xenobiotic by activated sludge. Biomicroworld 2009, III Internacional Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Lisboa, 2 a 4 Dezembro, p.41.</p> <p>2011 Mata, A. M. T.; Lourenço, N.D.; Pinheiro, H.M. Does activated sludge starvation enhance dye bioconversion in the presence of inhibitory compounds?. In: 8TH IWA LEADING-EDGE CONFERENCE ON WATER AND WASTEWATER TECHNOLOGIES, 2011. Amsterdão. 8th IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies, Programme Book. London, United Kingdom: International Water Association, 2011, p. 56-57.</p> <p>2012 Lourenço, N.D.; Mata, A. M. T.; Pinheiro, H.M. Aerobic granular sludge toward effective textile wastewater treatment. In: 3rd scientific meeting of institute for biotechnology and bioengineering, 2012. Lisbon. Book of Abstracts of the 3rd Meeting. Instituto Superior Técnico, Centro de Engenharia Biológica e Química, 2012, p. 17-17.</p> <p>2012 Mata, A.T.M., Lourenço, N.D. and Pinheiro, H.M. Start-Up of an Aerobic Granular Sludge Non Tubular Reactor, in: The 6th Internacional Conference on Environmental Science and Technology, 2012, Houston, Texas. Paper Abstracts, The American Academy of Sciences, p.32.</p> <p>2014 Mata, A.T.M., Lourenço, N.D. and Pinheiro, H.M. (2014) Effect of Sequencing Batch Cycle Strategy on the Treatment of a Simulated Textile Wastewater with Aerobic Granular Sludge. Proceedings of the 12th International Chemical and Biological Engineering Conference (Chempor 2014), pp. 9.17-19.19, Edições FEUP, Porto.</p>	Cap.4 Cap.4 Cap. 5 Cap.5 Cap. 6

Tipo de contribuição científica (cont.)	Tese
Comunicações orais e poster	
2009 “Effect of a respiratory inhibitor on the bioconversion of a xenobiotic by activated sludge”, A. M. T. Mata, N. D. Lourenço, H. M. Pinheiro Biomicroworld 2009, III Internacional Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Lisboa, 2 a 4 Dezembro de 2009 (acknowledgement Ref. nº PDCT/AMB/59388/2004) (poster)	Cap. 4
2011 , Mata, A.M.T., Lourenço, N.D., and Pinheiro, H.M., "Does activated sludge starvation enhance dye bioconversion in the presence of inhibitory compounds?", 8th IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies, Amsterdam, The Netherlands, June 6-10. (poster)	Cap. 4
2011 , Mata, A.M.T., Lourenço, N.D., and Pinheiro, H.M., "Granulation of Activated Sludge", MICROBIOTECH'11, Braga, Portugal, December 1-3. (poster)	Cap. 5
2012 , Lourenço, N.D., Mata, A.M.T., and Pinheiro, H.M., " Aerobic granular sludge toward effective textile wastewater treatment", 3rd Scientific Meeting of Institute for Biotechnology and Bioengineering, Instituto Superior Técnico, Lisboa – March 16-17. (oral)	Cap. 5
2012 , Mata, A.M.T., Lourenço, N.D., and Pinheiro, H.M., " Can starvation stress alter the inhibitory effect of respiratory poisons on dye bioreduction?", 3rd Scientific Meeting of Institute for Biotechnology and Bioengineering, Instituto Superior Técnico, Lisboa - March 16-17. (poster)	Cap. 4
2012 Mata, A.M.T., Lourenço, N.D., and Pinheiro, H.M., "Star-up of an aerobic granular sludge non tubular reactor", 6th International Conference on Environmental Science and Technology 2012, Houston, Texas, E.U.A. June 25-29. (poster)	Cap. 5
2014 Mata, A.M.T., Pinheiro, H.M., and Lourenço, N.D., Aerobic granulation in a non-tubular SBR treating an azo dye containing simulated textile wastewater, IWA World Water Congress and Exhibition, 21-16 Set., Lisboa, Portugal. (poster)	Cap. 6
2014 Franca, R.D.G., Mata, A.M.T., Pinheiro, H.M., and Lourenço, N.D., Effect of sludge retention time on azo dye biodegradation in an aerobic granular sludge SBR system, IWA World Water Congress and Exhibition, 21-16 Set., Lisboa, Portugal. (oral)	Cap. 7
2014 Mata, A.T.M., Lourenço, N.D. and Pinheiro, H.M. Effect of Sequencing Batch Cycle Strategy on the Treatment of a Simulated Textile Wastewater with Aerobic Granular Sludge. 12th International Chemical and Biological Engineering Conference (Chempor 2014), , Porto. (oral)	Cap. 6