

BRUNA THOMAZINHO FRANÇA

**TRATAMENTO DE ESGOTO URBANO EM REATORES UASB COM USO  
DE MICRORGANISMOS EFICIENTES**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F814t  
2018

França, Bruna Thomazinho, 1991-  
Tratamento de esgoto urbano em reatores UASB com uso  
de microrganismos eficientes / Bruna Thomazinho França. –  
Viçosa, MG, 2018.  
xi, 73 p. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Ann Honor Munteer.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente.  
2. Digestão anaeróbia. 3. Esgotos. 4. Águas residuais -  
Purificação - Tratamento biológico. 5. Biogás. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Civil. Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia Civil. II. Título.

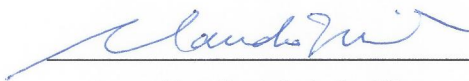
CDD 22. ed. 628.162

BRUNA THOMAZINHO FRANÇA

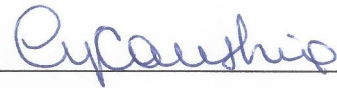
**TRATAMENTO DE ESGOTO URBANO EM REATORES UASB COM USO  
DE MICRORGANISMOS EFICIENTES**

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


APROVADA: 11 de dezembro de 2018.



Claudio Mudadu Silva



Cynthia Canêdo da Silva



Ann Honor Mounteer

(Orientadora)

*“Tudo tem sua hora na vida: a hora de chegar, a hora de permanecer e de partir. Uma metade da vida é para subir a montanha e gritar aos quatro ventos “Eu existo!” e a outra metade é para o declínio até o vazio, onde tudo é desprender-se, alegrar-se e celebrar. A vida tem seus assuntos e seus ritmos sem deixar de ser o sonho que sonhamos.”*

*– Onde estão as moedas? – Joan Garriga Bacardí*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFV por conceder a estrutura adequada à realização dessa pesquisa.

À professora Ann pela orientação, apoio, carinho e por acreditar neste trabalho desde o início.

À minha família por estar ao meu lado em todos os momentos, em especial à minha mãe, Cristina, por entender a importância do mestrado para mim e me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao Tales, por toda alegria e amor que compartilhamos diariamente. Por trazer leveza nos momentos difíceis e por inspirar meus melhores sentimentos. Agradeço também à sua família por todo o apoio e pelas palavras de carinho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Programa de Pós-Graduação em Meteorologia Aplicada e da UFJF, pelos ensinamentos que contribuíram na minha formação.

A todos os funcionários do LESA, em especial ao Capelão, Agostinho, Marcelo e Julio pela amizade e por todo apoio oferecido. À Priscila, pelo auxílio nas análises de laboratório e pelo carinho em atender às nossas dúvidas e questionamentos. Às funcionárias Cilene e Graça pelo suporte concedido.

Ao Victor pelo apoio na operação dos reatores. Aos demais colegas de mestrado que tornaram essa caminhada mais prazerosa e alegre.

À querida estagiária e grande amiga Gabi pela dedicação desempenhada, contribuindo de forma generosa com a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Imunovirologia Molecular/UFV pelo suporte, em especial à Lívia pela receptividade, apoio e aprendizado. Obrigada pela dedicação e paciência em me ajudar com a microbiologia. Agradeço também à Deborah pela colaboração e apoio.

À Professora Cynthia pelas contribuições concedidas ao longo deste trabalho.

Ao professor Paulo Roberto Cecon por auxiliar nas questões estatísticas.

Ao Sr. Sabino da Unidade Experimental Pomar Campus, por me acompanhar na obtenção dos Microrganismos Eficientes na mata e por se mostrar sempre tão empenhado em ajudar.

Ao Paulinho da marcenaria pela dedicação e pelo belo trabalho com os apoios dos reatores.

Ao Luis pelas boas ideias e capricho na confecção dos reatores.

À Capes pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. MICRORGANISMOS EFICIENTES .....	2
2.2. REATORES UASB .....	6
2.2.1. DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	6
2.2.2. DESCRIÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO REATOR UASB .....	8
2.3. GRANULAÇÃO ANAERÓBIA .....	10
2.3.1. DESCRIÇÃO DO PROCESSO .....	10
2.3.2. EPS – SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES .....	11
3. OBJETIVOS .....	14
3.1. OBJETIVO GERAL .....	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
4. DESEMPENHO DE REATORES UASB NO TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO COM USO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES .....	19
RESUMO .....	19
4.1. INTRODUÇÃO .....	20
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.2.1. ESGOTO E APARATO EXPERIMENTAL .....	21
4.2.2. PRODUÇÃO DO INÓCULO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES .....	23
4.2.3. INOCULAÇÃO DOS REATORES E FASES OPERACIONAIS .....	24
4.2.4. AMOSTRAGEM, MONITORAMENTO E REPRESENTAÇÃO .....	25
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.4. CONCLUSÃO .....	30
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
5. PROCESSO DE GRANULAÇÃO EM REATORES UASB COM O USO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES .....	34
RESUMO .....	34
5.1. INTRODUÇÃO .....	35
5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	36

5.2.1.	FASES OPERACIONAIS E AMOSTRAGEM.....	36
5.2.2.	TESTE DE RESISTÊNCIA AO CISALHAMENTO DOS GRÂNULOS .....	37
5.2.3.	EXTRAÇÃO DAS EPS .....	37
5.2.4.	QUANTIFICAÇÃO DAS EPS .....	38
5.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5.4.	CONCLUSÃO .....	42
5.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
6.	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS COMUNIDADES PRESENTES EM INÓCULO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES E REATORES UASB.....	46
	RESUMO.....	46
6.1.	INTRODUÇÃO.....	47
6.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	48
6.2.1.	FASES OPERACIONAIS E AMOSTRAGEM.....	48
6.2.2.	EXTRAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO DO rDNA 16S.....	48
6.2.3.	ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUÊNCIA E ÍNDICES DE DIVERSIDADE MICROBIANA	48
6.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
6.4.	CONCLUSÃO .....	55
6.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
	ANEXO A – FICHA INFORMATIVA PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES .....	58
	APÊNDICE A – VALORES OBTIDOS DE CONCENTRAÇÃO E EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE DBO, DQO E NITROGÊNIO AMONÍACAL DOS EFLUENTES BRUTO E TRATADOS. ....	60
	APÊNDICE B – CLASSIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS COM O PRIMER 27F/338R PARA O DOMÍNIO <i>BACTERIA</i> .....	63
	APÊNDICE C – CLASSIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS COM O PRIMER 349F/534R PARA O DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i> . ....	73

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Coleta do efluente por meio de bomba submersa na rede municipal de esgotamento sanitário de Viçosa-MG. ....	21
<b>Figura 2.</b> Esquema dos reatores anaeróbios de bancada do tipo UASB utilizados no experimento. ....	22
<b>Figura 3.</b> Disposição do arroz em caixas de madeira. ....	23
<b>Figura 4.</b> Caixa contendo arroz disposta na mata para crescimento de microrganismos. ....	23
<b>Figura 5.</b> Arroz selecionado por cor após 15 dias para preparo do inóculo de Microrganismos Eficientes. ....	24
<b>Figura 6.</b> Eficiência de remoção de DQO nos reatores UASB de bancada, sem e com Microrganismos Eficientes (ME), em função do TDH (12, 9 e 6 horas) de operação (médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância). ....	27
<b>Figura 7.</b> Eficiência de remoção de DBO nos reatores UASB de bancada, sem e com Microrganismos Eficientes (ME), em função do TDH (12, 9 e 6 horas) de operação (médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância). ....	27
<b>Figura 8.</b> Esgoto bruto (B) e tratados dos reatores sem (1) e com (2) Microrganismos Eficientes. ....	29
<b>Figura 9.</b> Nitrogênio amoniacal no esgoto bruto e tratado nos reatores sem e com Microrganismos Eficientes (ME). ....	30
<b>Figura 10.</b> Quantidades de EPS produzidas nos reatores sem (s/ ME) e com (c/ ME) Microrganismos Eficientes ao final de cada fase operacional. ....	40
<b>Figura 11.</b> Coeficiente de Integridade para os reatores sem e com ME durante o período de operação. ....	42
<b>Figura 12.</b> Heat-map dos filos de bactéria e Archaea observados no sequenciamento para as amostras de lodo e inóculo. ....	50
<b>Figura 13.</b> Análise de agrupamento das amostras para espécies de (a) bactéria e (b) Archaea. ....	51
<b>Figura 14.</b> Abundância relativa de gêneros de bactérias no inóculo de Microrganismos Eficientes (ME) e nos reatores UASB, com e sem adição do inóculo, após 30 e 90 de operação. ....	52

**Figura 15.** Abundância relativa de gêneros de Archaea no inóculo de Microrganismos Eficientes (ME) e nos reatores UASB, com e sem adição do inóculo, após 30 e 90 de operação. .... 54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros analisados para caracterização do esgoto bruto utilizado na alimentação dos reatores e as respectivas metodologias <sup>1</sup> utilizadas. ....	22
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros físico-químicos e valores médios, máximos e mínimos de caracterização do esgoto bruto alimentado ao reator (6 lotes). ....	26
<b>Tabela 3.</b> Índices de diversidade microbiana e número de sequências identificadas de espécies nas amostras analisadas. ....	53
<b>Tabela 4.</b> Concentração e eficiência de remoção de DBO dos efluentes bruto e tratados dos reatores sem e com ME. ....	60
<b>Tabela 5.</b> Concentração e eficiência de remoção de DQO dos efluentes bruto e tratados dos reatores sem e com ME. ....	61
<b>Tabela 6.</b> Concentração e eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal dos efluentes bruto e tratados dos reatores sem e com ME. ....	62
<b>Tabela 7.</b> Classificação e quantidade de sequências obtidas a nível de filo do domínio bactéria. ....	63
<b>Tabela 8.</b> Classificação e quantidade de sequências obtidas a nível de gênero do domínio bactéria. ....	63
<b>Tabela 9.</b> Classificação e quantidade de sequências obtidas a nível de filo do domínio Archaea. ....	73
<b>Tabela 10.</b> Classificação e quantidade de sequências obtidas a nível de gênero do domínio Archaea. ....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOVs	Ácidos orgânicos voláteis
COV	Carga orgânica volumétrica
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
I <sub>ME</sub>	Amostra de inóculo de Microrganismos Eficientes
ME	Microrganismos eficientes
N	Nitrogênio
OD	Oxigênio dissolvido
P	Fósforo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PN	Proteína
PS	Carboidrato
R <sub>6h</sub>	Amostra de lodo do reator UASB sem ME, ao final do TDH de 6 h
R <sub>6h/ME</sub>	Amostra de lodo do reator UASB com ME, ao final do TDH de 6 h
R <sub>12h</sub>	Amostra de lodo do reator UASB sem ME, ao final do TDH de 12 h
R <sub>12h/ME</sub>	Amostra de lodo do reator UASB com ME, ao final do TDH de 12 h
RPM	Rotações por minuto
SSV	Sólidos suspensos voláteis
SST	Sólidos suspensos totais
ST	Sólidos totais
SVT	Sólidos voláteis totais
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TRS	Tempo de retenção de sólidos
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>

## RESUMO

FRANÇA, Bruna Thomazinho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2018. **Tratamento de esgoto urbano em reatores UASB com uso de Microrganismos Eficientes**. Orientadora: Ann Honor Munteer.

Microrganismos Eficientes constituem uma comunidade de indivíduos aeróbios e anaeróbios que desempenham funções benéficas ao meio ambiente e são capazes de se desenvolver em diversos ecossistemas. Neste trabalho, a técnica de Microrganismos Eficientes (EM Technology®) foi aplicada com o objetivo de verificar se esses organismos são capazes de conferir melhorias no tratamento de esgoto urbano. O aparato experimental foi constituído de dois reatores UASB de bancada e somente um foi inoculado com Microrganismos Eficientes. Os reatores operaram durante 90 dias com tempos de detenção hidráulica de 12, 9 e 6 horas e foram avaliadas as eficiências de remoção de matéria orgânica e nutriente, bem como o processo de granulação anaeróbia. A eficiência dos processos foi analisada em termos de remoção de DQO, DBO<sub>5</sub> e nitrogênio amoniacal enquanto que o processo de granulação foi examinado por meio de testes de resistência ao cisalhamento do grânulo e quantificação de EPS (substâncias poliméricas extracelulares). Análises de diversidade microbiana dos domínios *Bacteria* e *Archaea* foram realizadas com o intuito de avaliar se o inóculo provocou alterações nas comunidades dos reatores em termos de diversidade de espécies dentro do período operacional proposto. Os resultados apontam que o inóculo de Microrganismos Eficientes não foi capaz de provocar diferença (a 5% de significância) na eficiência de remoção de compostos orgânicos e nutrientes do sistema. Os testes de resistência ao cisalhamento dos grânulos e de quantificação de EPS apontam que a presença dos Microrganismos Eficientes gerou grânulos mais resistentes e com melhores propriedades de agregação. O inóculo de Microrganismos Eficientes apresentou elevada abundância e baixa diversidade de espécies se comparado às amostras de lodo analisadas. As espécies com maior abundância no inóculo não foram capazes de sobreviver dentro do reator no período proposto. A elevada abundância de *Archaeas* metanogênicas acetoclásticas nos dois reatores, indicou que esses organismos contribuíram para processo de granulação dos reatores e conseguiram completar o seu ciclo de reações, gerando um efluente tratado com baixa carga orgânica.

## ABSTRACT

FRANÇA, Bruna Thomazinho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2018. **Urban sewage treatment in UASB reactors with the use of Effective Microorganisms**. Adviser: Ann Honor Munteer.

Effective Microorganisms are a community of aerobic and anaerobic individuals which performed beneficial functions for the environment and are capable of developing in various ecosystems. In this work, the Effective Microorganisms technique (EM Technology®) was applied in order to verify whether these organisms, widely used in agriculture, are capable of enhancing domestic wastewater treatment. Two UASB bench reactors were built and one was inoculated with Effective Microorganisms to evaluate the performance of the inoculum. The UASB reactors were operated at hydraulic retention times of 12, 9 and 6 hours for thirty days each (90 days total) during which treatment efficiency and anaerobic granulation were compared. Treatment efficiency was analyzed in terms of COD, BOD<sub>5</sub> and ammonium removals while granulation was examined by measuring granule shear strength and extracellular polymeric substances (EPS) contents. In order to evaluate the difference in microbial communities caused by the inoculum during the operational period, analyses of microbial richness and abundance of the domains *Bacteria* and *Archaea* were performed. Results showed that the inoculum of Effective Microorganisms did not affect (5% significance level) organic matter and nutrient removals. Granules shear strength tests and EPS contents indicated that inoculation with Effective Microorganisms resulted in more resistant granules, with better aggregation properties. The Effective Microorganisms inoculum presented a higher species abundance, but lower diversity when compared to sludge samples analysed. Moreover, the more abundant species in the inoculum were not capable of developing in the reactor during the operational period. The high abundance of acetotrophic metanogen *Archaeas* in both reactors, considering the total number of reads, indicated that these organisms contributed to the granulation process in the reactors and were able to complete their reaction cycle, generating treated wastewater with low organic load.

## 1. INTRODUÇÃO

A poluição hídrica é uma questão ambiental recorrente e que impacta não somente os organismos aquáticos, como também a saúde da população. A poluição hídrica pode estar vinculada a diferentes fontes de contaminação, sendo que no Brasil, o lançamento de águas residuárias sem tratamento ou com tratamento insuficiente ainda é a principal fonte de poluição dos cursos d'água. Essa questão pode refletir de forma negativa na população, que se torna vulnerável à diversas doenças de veiculação hídrica.

Visando controlar a poluição hídrica, legislações brasileiras específicas classificam os corpos d'água e estabelecem limites e padrões de lançamento de efluentes no país no âmbito federal e estadual. Desta forma, com o objetivo de se obter um efluente dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelas normas brasileiras, diversos processos, sistemas e operações de tratamento podem ser aplicados.

O tratamento biológico, foco do presente trabalho, utiliza as funções e metabolismo de cada microrganismo com o objetivo de se atingir um efluente de qualidade. Esses microrganismos podem atuar de forma coletiva ou individual nos mais diferentes ambientes biogeoquímicos. Uma maneira eficiente e que tem se mostrado promissora na recuperação da qualidade da água de rios e lagos é a utilização da tecnologia de Microrganismos Eficientes (EM Technology®) que possui caráter ecológico, demanda baixo investimento e vem sendo utilizada com frequência na agricultura, compostagem, biorremediação, recuperação de áreas degradadas e na operação de sistemas anaeróbios, com destaque para os tanques sépticos.

Os reatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) são conhecidos por tratar esgotos com alta carga orgânica. No entanto, esses reatores também têm apresentado alta eficiência no tratamento de esgotos domésticos. Estima-se que no Brasil, existam atualmente mais de 400 reatores UASB em operação tratando esgoto doméstico. A crescente utilização dessas unidades no tratamento de esgoto doméstico está principalmente relacionada aos baixos custos de operação e manutenção, condições climáticas operacionais adequadas e principalmente por gerar um efluente tratado que normalmente atende aos padrões estabelecidos pelas legislações.

A biomassa presente nos reatores UASB se organiza na forma de grânulos, que são estruturas com elevada resistência e são capazes de minimizar a retirada da biomassa para fora do sistema, resultando em um elevado tempo de residência celular.

Diante do exposto, este estudo traz o foco para a utilização de Microrganismos Eficientes como agente favorecedor da granulação em reatores UASB a partir da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), tendo como objetivo, a investigação da atuação desses microrganismos na eficiência global do sistema e no processo de granulação. Esperou-se ainda, com a avaliação da composição das EPS, avaliar o impacto da adição dos microrganismos eficientes no tratamento de esgoto doméstico.

Visando compreender a dinâmica das comunidades nos reatores, foram identificados os indivíduos dos domínios *Archaea* e *Bacteria* e foi avaliado também se, durante o período de operação dos reatores UASB, ocorreu algum fenômeno de dominância ou modificação específica das comunidades que pudesse explicar os padrões observados de eficiência do tratamento e granulação do lodo. Essas análises de diversidade tornam-se necessárias uma vez que a literatura ainda não possui dados de identificação das espécies presentes no inóculo de Microrganismos Eficientes, bem como o comportamento dessas comunidades em um sistema de tratamento de esgoto.

Essa dissertação foi estruturada em seis capítulos para que a discussão de cada um dos tópicos pudesse ser melhor direcionada e explorada. Os três primeiros capítulos se referem a uma introdução geral sobre o assunto, revisão de literatura e objetivos geral e específicos respectivamente. O Capítulo 4 trata da discussão acerca da eficiência dos reatores em termos de remoção de matéria orgânica e nutrientes. No Capítulo 5 são abordadas as questões referentes ao processo de granulação dos reatores que envolvem os testes de resistência ao cisalhamento e quantificação de EPS. No último capítulo são apresentados os resultados das análises de caracterização da comunidade microbiana dos reatores e do inóculo de ME.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Microrganismos Eficientes**

Os Microrganismos Eficientes (ME) são considerados como uma combinação de grupos de organismos aeróbios e anaeróbios que exercem funções benéficas aos seres humanos, animais e ao meio ambiente (RASHED; MASSOUD, 2015).

As tecnologias envolvendo a utilização de Microrganismos Eficientes foram desenvolvidas na Universidade de Ryukyus, Okinawa, Japão (ZAKARIA et al., 2010). A sua concepção baseou-se na mistura de diversos microrganismos (unicelulares, em sua maioria) e posterior refinamento por meio da introdução de organismos normalmente encontrados e adaptados a todos os ecossistemas (RASHED; MASSOUD, 2015).

Grande parte dos microrganismos que compõem esse grupo tem sido utilizada de forma combinada há muitos séculos para a produção de alimentos como pães, conservas em geral, iogurtes, vinhos, cervejas, etc. Por atuarem em conjunto, os microrganismos eficientes geralmente são providos de um grande número de ferramentas biológicas especializadas (principalmente enzimas). Essa característica garante seu desenvolvimento e sobrevivência nos mais diversos ambientes como em fundo de reservatórios, estrume de gado, canais de transporte de esgoto sanitário e em lodos de estações de tratamento de esgoto (BORUSZKO, 2017).

Os ME podem ser classificados e divididos em quatro grupos básicos (ANDRADE et al., 2011; SZYMANSKI; PATTERSON, 2003):

**Leveduras:** responsáveis pela síntese de vitaminas e pela ativação de outros Microrganismos Eficientes, são capazes de produzir algumas enzimas e hormônios. Principais espécies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*.

**Bactérias fotossintetizantes:** utilizam a energia solar como fonte de luz e calor. Sintetizam vitaminas, nutrientes, aminoácidos, ácidos nucleicos, substâncias bioativas e açúcares. São capazes de favorecer a proliferação de outros Microrganismos Eficientes como os fixadores de nitrogênio, os actinomicetos e alguns fungos. Principais espécies: *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter spaeroides*.

**Bactérias produtoras de ácido láctico:** produzem o ácido láctico que atua no controle de alguns microrganismos nocivos. São capazes de fermentar a matéria orgânica, permitindo que esta fique disponível em uma forma mais acessível aos outros microrganismos. Principais espécies: *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*.

**Actinomicetos:** controlam fungos e bactérias patogênicas. Principais espécies: *Streptomyces albus*, *S. griseus*.

Okuda e Higa (1995) determinaram os efeitos e o potencial da utilização de Microrganismos Eficientes na qualidade e no tratamento de águas residuárias urbanas e o impacto da aplicação do efluente tratado com ME na agricultura. Foi observado que, com a utilização de Microrganismos Eficientes, o efluente final apresentou pH reduzido a níveis próximos da neutralidade (aproximadamente 7,6). Houve também redução da DBO, DQO, N e P. Os autores observaram que a aplicação de lodo submetido a tratamento com ME em plantas de tomate minimizou os problemas com toxicidade e promoveu melhor crescimento da cultura, maior número e peso das folhas em relação a plantas não submetidas às aplicações de ME.

Jin et al. (2005) operaram um biorreator a membranas com adição de ME (eMBR) e compararam os resultados com um MBR sem adição de ME. Os autores observaram que o eMBR teve uma melhor eficiência de remoção de amônia se comparado ao MBR convencional. Alcançou-se eficiência ótima com 7 h de tempo de detenção hidráulica (TDH) e 4 mg.L<sup>-1</sup> de OD. Os resultados mostraram também que o eMBR promoveu um tempo de partida (*start-up*) mais curto, ou seja, adaptação mais rápida da microbiota. Além disso, o efluente atingiu os padrões regulamentados pela legislação vigente e operou de forma estável por todos os 90 dias de estudo.

Abdel-Shafy, Al-Sulaiman e Mansour (2014) aplicaram um inóculo comercial de ME no tratamento de águas cinzas, visando o uso irrestrito do efluente, no Egito. Os autores avaliaram a eficiência de um sistema de sedimentação seguido de um tanque de aeração em diferentes tempos de sedimentação e aeração. Os resultados apontaram eficiência de remoção de 86,6; 45,3; 53,0; 78,4% de SST, DQO, DBO<sub>5</sub> e óleos/graxas, respectivamente, no sistema sem a aplicação do inóculo de ME, com 3 horas de sedimentação e 90 minutos de aeração. De acordo com a legislação vigente no Egito, os valores de remoção alcançados no sistema testemunha foram insuficientes para enquadrar o efluente para uso irrestrito. Com o objetivo de obter um efluente adequado aos padrões estabelecidos no país pela Associação Egípcia de Assuntos Ambientais (EEAA), os autores optaram por aplicar o inóculo de ME com concentração de 1,2 mg.L<sup>-1</sup> e manter as mesmas condições operacionais (3 horas de sedimentação, 90 minutos de aeração). Para esse cenário, as taxas de remoção foram 92,4; 79,9; 91,1; 97,6% de SST, DQO, DBO<sub>5</sub> e óleos/graxas, respectivamente, o que permitiu que o efluente tratado pudesse ser aplicado como água de reúso na agricultura. Visando aumentar ainda mais as eficiências, os autores testaram o sistema com o

inóculo a uma concentração de 1,5 mL.L<sup>-1</sup> em adição única, 4,5 horas de sedimentação e 90 minutos de aeração. Essas condições geraram um efluente enquadrado na classe de águas com tratamento avançado, podendo ser utilizado de forma irrestrita no país.

Rashed e Massoud (2015) avaliaram o efeito da utilização de Microrganismos Eficientes aplicados a um sistema EBPR (*enhanced biological phosphorous removal*) modificado que incluía um tanque de contato como zona de assimilação de fósforo e um tanque de adensamento como zona de liberação de fósforo no meio. O reator operou durante dois meses de forma contínua, os autores compararam os resultados obtidos com as informações de outro reator de mesma configuração, porém operado sem a adição de ME. As eficiências de remoção de DQO, DBO e P foram maiores no reator que recebeu o inóculo de ME do que no reator sem adição de ME. As eficiências de remoção DBO e DQO no EBPR com Microrganismos Eficientes chegaram a 93% e de remoção de fósforo, 90%.

Boruszko (2017) tinha como objetivo principal a determinação do efeito da estabilização anaeróbia de lodo de esgoto de indústria de laticínios na biodegradação de HAPs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) com o uso de ME. Por ser um produto excretado pela glândula mamária, o leite pode exibir níveis significativos de xenobióticos, além disso, o processo UHT (pasteurização, esterilização e ultra tratamento por calor) e algumas técnicas de defumação também podem elevar as concentrações de HAPs nos produtos lácteos e no efluente (PAZ et al., 2017). O experimento de Boruszko (2017) promoveu a estabilização em lodos provenientes de diversas etapas do tratamento: lodo de descarte (excesso), lodo proveniente do processo de flotação e lodo misto - 70% de excesso e 30% de flotação. O autor observou que com a aplicação de ME no processo, foi possível remover (concentrar no lodo de descarte) 70% dos HAPs observados na amostra inicial, enquanto que para o experimento sem os ME essa porcentagem chegou no máximo a 26,4%. Para o lodo misto, com o uso de ME, alcançou-se uma remoção de 65,7% contra somente 4,7% sem o uso de ME. No entanto, para o lodo de flotação, tanto na presença quanto na ausência de ME, observou-se aumento da concentração de HAPs durante a fermentação.

Pesquisas envolvendo o uso de ME no âmbito do tratamento e estabilização de lixiviado de aterro sanitário também têm sido desenvolvidas. O estudo de Ding et al. (2001) utilizou oito isolados de ME visando controlar a percolação de lixiviado de

aterros sanitários. Um aparato foi confeccionado com o objetivo de simular o comportamento de um aquífero ao receber o lixiviado. O sistema sem ME foi capaz de remover cerca de 60% da DQO afluente, enquanto que o aparato com ME removeu 95% da DQO de entrada. He et al. (2005) utilizaram um sistema de biorreator seguido de reator metanogênico inoculado com ME para tratar lixiviado de aterro sanitário por recirculação. Os resultados apontaram que após 105 dias de operação, o sistema inoculado com ME produziu 620,9 L de biogás, enquanto que o sistema de mesma configuração, sem o processo de inoculação produziu 518,6 L. Além disso, o uso de ME aumentou a biodegradabilidade do material, produzindo um efluente final mais estabilizado e menos concentrado.

A utilização de ME no tratamento de resíduos sólidos via processo de compostagem foi reportada na literatura nos trabalhos de FAN et al., 2018; JUSOH; MANAF; LATIFF, 2013; PARK, 2011. Fan et al. (2018) utilizaram resíduos alimentares, farelo de arroz e folhas secas para compostagem em escala residencial. Jusoh, Manaf e Latif (2013) avaliaram a atuação dos ME na compostagem de palha de arroz, resíduos verdes e estrume de cabra e Park (2011) utilizou estrume de aves e resíduos alimentares.

A aplicação de ME também foi reportada na produção de biogás a partir de substratos como estrume de aves e caprinos, resíduos de piscicultura e cultivo de arroz (AZIZ; HANAFIAH; ALI, 2019). A utilização desses microrganismos também vem sendo descrita nas áreas agrícolas com o objetivo de investigar a sua atuação na correção de solos e melhoramento na produção de insumos agrícolas (ZHONG; BIAN; ZHANG, 2018; SHIN et al., 2017; SIGSTAD; SCHABES; TEJERINA, 2013).

## **2.2. Reatores UASB**

### **2.2.1. Digestão anaeróbia**

O período inicial de operação dos reatores anaeróbios foi marcado pela sua utilização no tratamento de lodo de descarte e no tratamento de efluentes de alta carga orgânica. No entanto, com a melhoria tecnológica e melhor entendimento do sistema, esses reatores também vêm sendo utilizados no tratamento de esgotos com baixas concentrações de matéria orgânica (METCALF; EDDY, 2003).

O processo de digestão anaeróbia pode ser subdividido basicamente em quatro etapas nas quais atuam os mais diferentes gêneros de microrganismos. A descrição

dessas fases, bem como os agentes biológicos envolvidos são apresentados a seguir (CHERNICHARO, 2016; SANT'ANNA JUNIOR, 2010; METCALF; EDDY, 2003).

- a. Hidrólise: nesta primeira fase da digestão anaeróbia, as bactérias fermentativas hidrolíticas excretam exoenzimas com o objetivo de converter polímeros complexos (proteínas, polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos) naturalmente presentes nos esgotos, em material particulado. A matéria orgânica formada nesse processo, é composta por substâncias de menor massa molar (aminoácidos, monossacarídeos e ácidos orgânicos de cadeia longa), capazes de penetrar na parede celular dos microrganismos fermentativos (ou acidogênicos). Os principais microrganismos envolvidos na fase hidrolítica são: *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* (excretam lipase, exoenzima capaz de degradar lipídeos a ácidos orgânicos), *Bacteroides*, *Butyivibrio*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Selonomonas*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Bacillus* (excretam protease, degrada proteínas a aminoácidos), *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Acetivibrio* e *Eubacterium* (excretam amilases, degrada polissacarídeos a monossacarídeos).
- b. Acidogênese (Fermentação): as bactérias fermentativas acidogênicas utilizam os produtos da hidrólise para produzir ácidos orgânicos voláteis (AOVs: ácidos acético, propiônico e butírico), dióxido de carbono e hidrogênio. Os principais gêneros que atuam nessa fase são: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus* e *Bacillus*.
- c. Acetogênese: conversão de produtos intermediários da acidogênese (propionato e butirato) em acetato, dióxido de carbono e hidrogênio. Essa fase da digestão anaeróbia é exercida pelas bactérias sintróficas acetogênicas, cujos principais gêneros atuantes são *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas*.
- d. Metanogênese: é a conversão dos produtos gerados na acetogênese a metano. Os organismos envolvidos no processo de metanogênese pertencem ao domínio *Archaea*. As Archaeas metanogênicas acetoclásticas transformam o acetato em dióxido de carbono e metano.

As Archaeas metanogênicas hidrogenotróficas transformam o hidrogênio em metano, utilizando dióxido de carbono comoceptor de elétrons. Os principais gêneros de metanogênicas acetoclásticas são: *Methanosaeta* (apresentam estrutura filamentosa e utilizam somente o acetato como fonte de carbono na produção de metano) e *Methanosarcina sp.* (apresentam estrutura na forma de cocos e são capazes de utilizar diversos substratos para a produção de metano, entre eles hidrogênio, acetato, metanol, entre outros.). Os principais gêneros de metanogênicas hidrogenotróficas são: *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* e *Methanocorpusculum*.

No processo de fermentação anaeróbia há também uma quinta fase chamada sulfetogênese que é caracterizada pela produção de sulfeto a partir de compostos sulfurados (sulfato, sulfito, etc.). Os microrganismos responsáveis por essa fase são as bactérias sulfatorredutoras e os principais gêneros envolvidos nesse processo são: *Desulfobulbus*, *Desulfomonas*, *Desulfomaculum* (oxidam o substrato até acetato, portanto, de forma incompleta), *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* e *Desulfonema* (oxidam o substrato completamente). A presença de sulfato no meio faz com que haja competição pelos substratos (acetato e hidrogênio) entre as bactérias sulfatorredutoras e as bactérias fermentativas acetogênicas e arqueas metanogênicas. Assim, a DQO removida pela rota sulfetogênica não atua na produção do metano, gás importante do ponto de vista energético, mas na produção de sulfeto de hidrogênio, gás potencialmente corrosivo, tóxico e que apresenta mau odor.

### **2.2.2. Descrição e características do reator UASB**

Os reatores UASB surgiram na Holanda, na década de 1970 e eram aplicados exclusivamente a esgotos com alta concentração de matéria orgânica. A partir da década de 1990, esses reatores começaram a ser amplamente utilizados em todo o mundo com o objetivo de tratar esgotos com baixas concentrações de matéria orgânica, incluindo os esgotos domésticos (JORDÃO; PESSÔA, 2014).

Nos reatores UASB, o esgoto entra pelo fundo e é transportado de forma ascendente até o topo do reator. A biomassa cresce dispersa no meio, apresentando tendência a formar pequenos grânulos. Essa estrutura granular apresenta forte

resistência às tensões cisalhantes exercidas pelo fluxo ascendente, formando uma espécie de proteção para a biomassa contra choques hidráulicos e orgânicos e contra grandes variações de temperatura e pH (SANT'ANNA JUNIOR, 2010).

Ao entrar no reator, o esgoto passa pelo leito de lodo que consiste em uma camada composta por grânulos de grande capacidade de sedimentação e que já estão em processo de digestão ou digeridos. Em seguida, o fluxo ascendente direciona o esgoto para a manta de lodo que é composta por uma camada de lodo mais disperso e leve. O leito e a manta de lodo juntos compõem o compartimento de digestão. A mistura do sistema é praticada pelo próprio fluxo ascendente e também pelas bolhas de gás formadas durante a digestão anaeróbia. Na parte superior do reator, existe um separador trifásico que promove a separação do gás, fornecendo mecanismos para sua coleta; e também permite a separação e retorno da biomassa ao sistema por simples ação gravitacional no compartimento de sedimentação. O sistema também é composto por um defletor de gases que tem a função de desviar as bolhas de gás do compartimento de sedimentação. O efluente tratado é coletado na parte mais elevada do reator por meio de vertedores ou tubulações perfuradas. O elevado tempo de retenção de sólidos, faz com que a concentração de biomassa no sistema seja muito alta, permitindo que os reatores UASB operem com baixos tempos de detenção hidráulica, demandem pequenos volumes e formem grânulos e flocos densos (CHERNICHARO, 2016; VON SPERLING, 2005).

Esses reatores apresentam diversas vantagens, tais como: baixa demanda de área construtiva; baixo custo de implantação, monitoramento e operação; baixo consumo de energia; estabilização do lodo retirado para descarte; e produção de metano, gás com alto potencial energético. Entretanto, o sistema apresenta algumas desvantagens: possibilidade de geração de maus odores; baixa tolerância a cargas tóxicas; elevada sensibilidade a efeitos de mudança de temperatura; necessidade de relativamente longo período de partida para estabelecimento da biomassa (CHERNICHARO, 2016; METCALF; EDDY, 2003).

De acordo com Metcalf e Eddy (2003), um reator UASB apresenta uma variação no teor de sólidos entre 50 e 100 kg.m<sup>-3</sup> no leito de lodo e entre 10 e 30 kg.m<sup>-3</sup> na parte superior do reator, incluindo a manta de lodo e a zona de sedimentação. Além disso, a biomassa presente no reator pode apresentar Índice Volumétrico de Lodo (IVL) de cerca de 20 mL.g<sup>-1</sup>, característica que aponta boa sedimentabilidade.

## 2.3. Granulação anaeróbia

### 2.3.1. Descrição do processo

O fenômeno da granulação ocorre basicamente em reatores do tipo UASB e em raras situações em filtros anaeróbios e está geralmente associado a efluentes ricos em carboidratos e AOVs (CHERNICHARO, 2016). O estabelecimento da biomassa em forma de grânulos permite que reatores UASB suportem melhor a aplicação de altas cargas orgânicas volumétricas se comparado a outros processos anaeróbios de tratamento, além de ser um indicativo de que o sistema teve boa partida (METCALF; EDDY, 2003; GHANGREKAR; ASOLEKAR; JOSHI, 2005).

Os grânulos formados em reatores UASB possuem elevada velocidade de sedimentação, característica que permite que os tempos de detenção hidráulica e de sólidos sejam diferentes. A estruturação da biomassa em grânulos permite a proximidade entre as espécies, o que facilita o transporte de massa dentro do reator e também o aproveitamento máximo do volume do reator devido à ausência de meio suporte. Sendo assim, os elevados níveis de atividade microbiana, bem como o tamanho, forma e densidade dos grânulos são fatores que controlam diretamente a eficiência de um sistema de tratamento de efluentes (CHERNICHARO, 2016; SANT'ANNA JUNIOR, 2010; ABBASI; ABBASI, 2012).

Lim e Kim (2014) e Chong et al. (2012) destacam que o processo de granulação anaeróbia ocorre em quatro etapas tendo início a partir da colonização de uma célula sobre a superfície de um material inerte ou sobre uma outra célula. Em seguida, tem-se a adsorção biológica reversível no substrato por forças físico-químicas. A terceira etapa consiste na adesão irreversível da microbiota sobre o substrato, geralmente com a ajuda de agentes poliméricos. Por fim, as células colonizadas iniciam o processo de reprodução e de desenvolvimento do grânulo.

A estrutura do grânulo se dá em camadas e normalmente apresentam a seguinte estrutura: parte mais interna do grânulo composta pelo gênero *Methanosaeta* (*Archaea* metanogênica acetoclástica), parte intermediária composta por bactérias acidogênicas e *Archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas, parte mais externa formada por bactérias sulfatorredutoras, bactérias acidogênicas e pelo gênero *Methanosarcina* (CHERNICHARO, 2016).

Ghangrekar, Asolekar e Joshi (2005) avaliaram a influência das cargas orgânica volumétrica e biológica na formação do lodo granular durante a partida de reatores UASB. Para isso, os autores operaram seis reatores de bancada, durante 90 dias no tratamento de um efluente sintético (sacarose como fonte de carbono), com o objetivo de estabelecer as melhores faixas para as duas cargas analisadas. Concluiu-se que para o desenvolvimento de um lodo com características satisfatórias durante a partida do sistema, as faixas mais adequadas de cargas orgânica volumétrica e biológica deveriam ser  $2,0-4,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ , e  $0,1-0,25 \text{ kgDQO.kgSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente. Chernicharo (2016) indica que para o tratamento de esgoto doméstico em reatores UASB, cargas biológicas entre  $0,3$  e  $0,5 \text{ kgDQO.kgSVT}^{-1}.\text{d}^{-1}$  são adequadas para manter a estabilidade do sistema.

Yasar et al. (2007) compararam a ocorrência de granulação em reatores UASB e UASF (reator UASB alimentado com lodo anaeróbio contendo partículas de areia) operados em diferentes TDH (3 a 12 horas), no tratamento de um efluente combinado (indústria têxtil e doméstico). Os autores observaram que a partir do 60º dia de operação havia a formação de grânulos no reator e que essa ocorrência auxiliou no aumento da razão entre sólidos suspensos voláteis e sólidos totais (SSV/ST). A pesquisa indicou ainda que o tempo de retenção de sólidos (TRS) necessário para que o lodo utilizado (lodo aeróbio de indústria de laticínios) granulasse foi de até 90 dias.

Torres et al. (2018) avaliaram a aplicação de um polímero catiônico (quitosana) no processo de granulação em três reatores UASB (um reator testemunha e dois reatores com aplicação do polímero). Os três reatores apresentaram bom desempenho de remoção das cargas orgânicas volumétricas aplicadas, sendo que o tempo de adaptação do sistema com a adição do polímero foi menor. Os reatores com a presença do polímero apresentaram melhor desenvolvimento dos grânulos em termos de diâmetro médio e capacidade de sedimentação, e a microbiota presente nesses reatores foi capaz de produzir maior quantidade de EPS.

### **2.3.2. EPS – Substâncias poliméricas extracelulares**

As EPS (substâncias poliméricas extracelulares ou, do inglês, *extracellular polymeric substances*) são substâncias que têm como base substâncias de alto peso molecular excretadas por microrganismos. Esses polímeros também podem ter sua origem na ruptura da membrana plasmática das células e na hidrólise de

macromoléculas e exercem um importante papel no processo de granulação anaeróbia. Os principais componentes das EPS são polissacarídeos e proteínas, entretanto, outros compostos também podem ser encontrados dependendo do tipo de extração, tais como, substâncias húmicas, lipídeos, ácidos nucleicos e alguns componentes inorgânicos (ZENG, et al., 2016; LIM; KIM, 2014; SHENG; YU; LI, 2010; ZHOU et al., 2006).

Absorção, adesão, hidrofobicidade/hidrofilicidade, carga superficial e capacidade de biodegradação são as principais e mais importantes propriedades das substâncias poliméricas extracelulares (SHI et al., 2017).

As EPS são o principal constituinte dos biofilmes e normalmente apresentam distribuição bastante heterogênea, sendo que fatores como o tipo de agregado microbiano, estrutura e origem atuam de forma a definir essa distribuição. No caso do lodo anaeróbio granular, cuja presença é essencial em reatores do tipo UASB, a maior parte das EPS está distribuída na camada mais externa do grânulo. É importante destacar que parte das EPS pode vir a ser reutilizada pelos próprios microrganismos para fins energéticos em caso de escassez de substrato (SHI et al., 2017; SHENG; YU; LI, 2010).

Cada sistema de tratamento e tipologia de efluente irá apresentar diferentes formação, composição e distribuição das EPS. Portanto, para avaliar as características das EPS, é preciso proceder com o método de extração adequado ao sistema de tratamento em operação. Um método de extração ideal deve ser efetivo, causar o mínimo rompimento possível da membrana celular e ser capaz de não desestruturar as EPS (SHENG; YU; LI, 2010).

Zhou et al. (2006) avaliaram o impacto da aplicação de diferentes substratos (glicose, leite desnatado e solução mista de AOVs) nos processos de granulação e produção de EPS em reatores UASB. Os resultados apontaram que com uma maior carga orgânica volumétrica aplicada ao sistema, foram produzidas maiores quantidades de EPS e, por consequência, grânulos maiores e mais resistentes foram formados. Portanto, os autores concluem que uma leve sobrecarga aplicada ao sistema pode auxiliar o processo de granulação e atuar de forma benéfica no próprio desempenho dos reatores em um curto espaço de tempo.

Lu et al. (2015) avaliaram o desempenho da granulação de um reator UASB cuja única fonte de carbono introduzida foi o amido. O reator operou por cerca de 200 dias

com TDH variando de 24 a 3 horas e foram obtidas as quantidades de proteínas e carboidratos em diferentes zonas do reator. Os autores concluíram que as zonas mais ao fundo do reator foram capazes de produzir maiores quantidades de EPS e proporcionar a geração de um lodo granular com melhor sedimentabilidade, estabilidade operacional e resistência a choques de carga. Esse resultado foi atribuído à alta atividade metabólica e abundância de espécies observadas nessa zona do reator.

Wang et al. (2018) trabalharam com um reator de circulação interna em escala real (730 m<sup>3</sup>) para o tratamento de lixiviado de aterro sanitário. Os autores avaliaram o desempenho do reator em termos de remoção de DQO e produção de EPS. Os resultados apontaram que o processo de granulação esteve diretamente relacionado ao acúmulo de EPS e que esse esteve relacionado ao aumento progressivo da carga orgânica volumétrica aplicada, que além de permitir uma melhor estabilização da biomassa, também disponibilizou quantidade suficiente de nutrientes para suprir as vias metabólicas dos organismos envolvidos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o impacto da adição de Microrganismos Eficientes (ME) em reatores UASB de bancada no tratamento de esgoto doméstico.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Comparar a eficiência, em termos de remoção de DBO<sub>5</sub>, DQO e nitrogênio amoniacal, de reatores UASB sem e com inoculação com Microrganismos Eficientes

Comparar a resitência dos grânulos e o conteúdo de EPS de reatores UASB sem e com inoculação com Microrganismos Eficientes.

Identificar e comparar os principais gêneros dos domínios *Bacteria* e *Archaea* presentes nos reatores UASB sem e com inoculação com Microrganismos Eficientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, T.; ABBASI, S. A. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 1696-1708, 2012.

ABDEL-SHAIFY, H. I.; AL-SULAIMAN, A. M.; MANSOUR, M. S. M. Greywater treatment via hybrid integrated systems for unrestricted reuse in Egypt. **Journal of Water Process Engineering**, v. 1, p. 101-107, 2014.

ANDRADE, F. M. C.; BONFIM, F. P. G.; HONÓRIO, I. C. G.; REIS, I. L.; PEREIRA, A. J.; SOUZA, D. B. Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre o uso ecológico e social do EM. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 2011.

AZIZ, N. I. H. A.; HANAFIAH, M. M.; ALI, M. Y. Sustainable biogas production from agrowaste and effluents – A promising step for small-scale industry income. **Renewable Energy**, v. 132, p. 363-369, 2019.

BORUSZKO, D. Research on the influence of anaerobic stabilization of various dairy sewage sludge on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons PAHs with the use of effective microorganisms. **Environmental Research**, v. 155, p. 344-352, 2017.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. 2 ed. ampl. e atual. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016, 375 p.

CHONG, S.; SEM, T. K.; KAYAALP, A.; ANG, H. M. The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment – A State-of-the-art review. **Water Research**, v. 46, p. 3434-3470, 2012.

DING, A.; ZHANG, Z.; FU, J.; CHENG, L. Biological control of leachate from municipal landfills. **Chemosphere**, v. 44, p. 1-8, 2001.

FAN, Y. V.; LEE, C. T.; KLEMEŠ, J. J.; CHUA, L. S.; SARMIDI, M. R.; LEOW, C. W. Evaluation of Effective Microorganisms on home scale organic waste composting. **Journal of Environmental Management**, v. 2016, p. 41-48, 2018.

GHANGREKAR, M. M.; ASOLEKAR, S. R.; JOSHI, S. G. Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. **Water Research**, v. 39, n. 6, p. 1123-1133, 2005.

HE, R.; SHEN, D.; WANG, J.; HE, Y.; ZHU, Y. Biological degradation of MSW in a methanogenic reactor using treated leachate recirculation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3660-3666, 2005.

JIN, M.; WANG, X. W.; GONG, T. S.; GU, C. Q.; ZHANG, B.; SHEN, Z. Q.; LI, J. W. A novel membrane bioreactor enhanced by effective microorganisms for the treatment of domestic wastewater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 229-235, 2005.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 7 ed. Rio de Janeiro: ABES, 2014, 1087 p.

JUSOH, M. L. C.; MANAF, L. A.; LATIFF, P. A. Composting of rice straw with effective microorganisms (EM) and its influence on compost quality. **Iranian Journal of Environmental Health & Engineering**, v. 10, n. 1, p. 10-17, 2013.

LIM, S. J.; KIM, T. H. Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, p. 189-202, 2014.

LU, X.; ZHEN, G.; ESTRADA, A. L.; CHEN, M.; NI, J.; HOJO, T.; KUBOTA, K.; LI, Y. Operation performance and granule characterization of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating wastewater with starch as de sole carbono source. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 264-273, 2015.

METCALF, E.; EDDY, H, P, I. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4 ed. USA, McGraw-Hill Book Company, 2003, 1815p.

OKUDA, A.; HIGA, T. Purification of waste water with Effective Microorganisms and its utilization in agriculture. **University of the Ryukyus, Okinawa, Japan**, 1995.

PARK, K. Composting of Food Waste and Mixed Poultry Manure Inoculated with Effective Microorganisms. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 4, n. 4, p. 106-111, 2011.

PAZ, A. P. S.; NASCIMENTO, E. C. P.; MARCONDES, H. C.; SILVA, M. C. F; HAMOY, M.; MELLO, V. J. Presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em

produtos alimentícios e a sua relação com o método de cocção e a natureza do alimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

RASHED, E. M.; MASSOUD, M. The effect of effective microorganisms (EM) on EBPR in modified contact stabilization system. **HBRC Journal**, v. 11, n. 3, p. 384-392, 2015.

SANT'ANNA JR, G. L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2010, 418p.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 882-894, 2010.

SHI, Y.; HUANG, J.; ZENG, G.; GU, Y.; CHEN, Y.; HU, Y. TANG, B.; ZHOU, J.; YANG, Y.; SHI, L. Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview. **Chemosphere**, v. 180, p. 396-411, 2017.

SHIN, K.; VAN DIEPEN, G.; BLOK, W.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Variability of Effective Micro-organisms (EM) in bokashi and soil and effects on soil-borne plant pathogens. **Crop Protection**, v. 99, p. 168-176, 2017.

SIGSTAD, E. E.; SCHABES, F. I.; TEJERINA, F. A calorimetric analysis of soil treated with effective microorganisms. **Thermochimica Acta**, v. 569, p. 139-143, 2013.

SZYMANSKI, N.; PATTERSON, R. A. Effective microorganisms (EM) and wastewater systems. **Future Directions For On-Site Systems: Best Management Practice Proceedings of On-Site**, v. 3, p. 347-354, 2003.

TORRES, K.; ÁLVAREZ-HORNOS, F. J.; SAN-VALERO, P.; GAVALDÓN, C.; MARZAL. Granulation and microbial Community dynamics in the chitosan-supplemented anaerobic treatment of wastewater polluted with organic solvents. **Water Research**, v. 130, p. 376-387, 2018.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3 ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 2005, 452 p.

WANG, T.; HUANG, Z.; RUAN, W.; ZHAO, M.; SHAO, Y.; MIAO, H. Insights into sludge granulation during anaerobic treatment of high-leachate via a full-scale IC reactor with external circulation system. **Journal of Environmental Sciences**, v. 64, p. 227-234, 2018.

YASAR, A.; AHMAD, N.; CHAUDHRY, M. N.; KHAN, A. A. A. Sludge granulation and efficiency of phase separator in UASB reactor treating combined industrial effluent. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 5, p. 553-558, 2007.

ZAKARIA, Z.; GAIROLA, S.; SHARIFF, N. M. Effective microorganisms (EM) technology for water quality restoration and potential for sustainable water resources and management. **International Congress on Environmental Modelling and Software Modelling for Environment's Sake, Fifth Biennial Meeting, Ottawa, Canada**, 2010.

ZENG, J.; GAO, J. M.; CHEN, Y. P.; YAN, P.; DONG, Y.; SHEN, Y.; GUO, J. S.; ZENG, N.; ZHANG, P. Composition and aggregation of extracellular polymeric substances (EPS) in hyperhaline and municipal wastewater treatment plants. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

ZHONG, Z.; BIAN, F.; ZHANG, X. Testing composted bamboo residues with and without added effective microorganisms as a renewable alternative to peat in horticultural production. **Industrial Crops & Products**, v. 112, p. 602-607, 2018.

ZHOU, W.; IMAI, T.; UKITA, M.; LI, F.; & YUASA, A. Effect of loading rate on the granulation process and granular activity in a bench scale UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1386-1392, 2006.

#### **4. DESEMPENHO DE REATORES UASB NO TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO COM USO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES**

##### **RESUMO**

Este capítulo tem como objetivo investigar a atuação de um grupo de Microrganismos Eficientes no tratamento anaeróbio de esgoto doméstico em escala de bancada. Os Microrganismos Eficientes compõem um grupo de leveduras e bactérias especializadas que atuam nos mais diferentes ambientes biogeoquímicos e que, por isso, têm sido utilizados em diversas aplicações, como produção de alimentos, compostagem de resíduos orgânicos, correção de solo e melhoramento de plantas, tratamento biológico de efluentes, entre outros. Foram construídos dois reatores UASB de bancada, um sem e outro com inóculo de Microrganismos Eficientes. Os reatores foram operados com TDH de 12 horas por 90 dias para adaptação e, posteriormente por mais 90 dias com TDH de 12, 9 e 6 horas, em sequência. Comparou-se a eficiência dos reatores em termos de remoção de DBO<sub>5</sub>, DQO e nitrogênio amoniacal em cada TDH. Ambos os reatores apresentaram melhor desempenho operando com um TDH de 6 horas, levando em consideração o estado de clarificação do efluente e a eficiência de remoção dos compostos orgânicos. A introdução do inóculo de Microrganismos Eficientes não promoveu aumento significativo de eficiência (nível de significância 5 %) nos TDH avaliados.

#### **4.1. Introdução**

A carência de estruturas de saneamento adequadas a atender a população nos países em desenvolvimento, principalmente relacionadas ao tratamento e coleta dos esgotos, tem provocado impactos negativos diretos ao meio ambiente e à saúde humana. Desta forma, os gestores públicos têm voltado a atenção para soluções técnica e economicamente viáveis e que atendam a população de forma satisfatória.

O tratamento anaeróbio de esgoto doméstico tem ganhado destaque nesse cenário, uma vez que tem baixos requisitos de área construtiva e baixos custos de operação e manutenção, é capaz de gerar energia por meio da recuperação do biogás produzido; gera pouco de lodo excedente, se comparado a sistemas aeróbios, que já sai estabilizado do reator, facilitando seu transporte, tratamento e destinação (STAZI; TOMEI, 2018; CHONG et al., 2012; LETTINGA, 1996).

Os reatores UASB operam continuamente em fluxo ascendente com biomassa estabelecida em forma de grânulos. Incluem separadores trifásicos que permitem tanto a separação dos sólidos, quanto o direcionamento e utilização do biogás produzido no processo. Em condições adequadas, esses reatores são capazes de proporcionar a lavagem dos sólidos mais leves e dispersos para fora do sistema, permitindo que a biomassa se desenvolva na forma de grânulos com boa sedimentabilidade. Além disso, os grânulos são formados a partir de um consórcio microbiano excluindo-se a necessidade da utilização de materiais inertes como meio suporte e, conseqüentemente, melhor aproveitamento do volume útil do reator (CHONG et al, 2012; LATIF et al, 2011).

Com o objetivo de proporcionar melhorias de desempenho aos mais diversos sistemas biológicos de tratamento de esgoto, algumas pesquisas têm aplicado a técnica de Microrganismos Eficientes que consiste na utilização de comunidades de leveduras, bactérias fotossintetizantes, bactérias produtoras de ácido láctico e actinomicetos, devidamente selecionados. Essa técnica, além de atuar de forma associada no tratamento de esgotos, também atua na compostagem de resíduos orgânicos, correção de solo, melhoramento da produção agrícola, controle de patógenos, entre outras aplicações (FAN et al., 2018; SHIN et al., 2017; ANDRADE et al., 2011; SZYMANSKI; PATTERSON, 2003).

Neste trabalho, buscou-se avaliar a influência dos Microrganismos Eficientes no desempenho de reatores UASB tratando esgoto doméstico e se a introdução do inóculo produziu diferença significativa no sistema em termos de remoção de DQO, DBO e nitrogênio amoniacal.

## 4.2. Material e métodos

### 4.2.1. Esgoto e aparato experimental

A coleta do esgoto doméstico utilizado para abastecer os reatores foi feita no final da rede de esgotamento sanitário da cidade de Viçosa – MG (Figura 1) com o auxílio de uma bomba submersa Anauger 800, 380 W (Itupeva - SP). O esgoto coletado era armazenado em bombonas plásticas de em câmara fria a 5 °C até o dia do uso. Foram realizadas seis campanhas de coleta e em cada uma delas foram coletados 600 litros de esgoto.



**Figura 1.** Coleta do efluente por meio de bomba submersa na rede municipal de esgotamento sanitário de Viçosa-MG.

O aparato experimental foi concebido a partir de dois reatores de bancada do tipo UASB confeccionados em tubos de PVC de 100 mm de diâmetro e 0,39 metros de altura, perfazendo um volume de 3 litros cada (Figura 2). O artefato utilizado como separador trifásico foi preparado com um par de garrafas de polietileno posicionadas uma sobre a outra com espaçamento de 10 cm, com entrada do efluente na parte inferior e saída na parte superior. Cada reator era dotado de três pontos de amostragem de lodo e efluente localizados a 10 cm, 20 cm e 30 cm da base.



**Figura 2.** Esquema dos reatores anaeróbios de bancada do tipo UASB utilizados no experimento.

A alimentação dos reatores com o esgoto foi realizada de forma contínua por meio de uma bomba peristáltica Provitec Polycanal 4 DM GA 5000 MB R (São Paulo - SP). Os parâmetros físico-químicos utilizados para caracterização do efluente bruto, bem como as metodologias utilizadas para análise estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros analisados para caracterização do esgoto bruto utilizado na alimentação dos reatores e as respectivas metodologias<sup>1</sup> utilizadas.

Parâmetro	Metodologia
pH	4500-H <sup>+</sup> B
Temperatura (°C)	2550 B
DQO <sub>total</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	5220 D
DBO <sub>5</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	5210 B
Fósforo total (mg.L <sup>-1</sup> )	4500-P D
Nitrogênio total Kjeldahl (mg.L <sup>-1</sup> )	4500-N <sub>org</sub> B
Nitrogênio Amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )	4550-NH <sub>3</sub> C
Sólidos Totais (mg.L <sup>-1</sup> )	2540 B
Sólidos Totais Fixos e Voláteis (mg.L <sup>-1</sup> )	2540 E
Sólidos Suspensos Totais (mg.L <sup>-1</sup> )	2540 D
Sólidos Suspensos Fixos e Voláteis (mg.L <sup>-1</sup> )	2540 E

<sup>1</sup> Métodos do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012)

#### 4.2.2. Produção do inóculo de Microrganismos Eficientes

O preparo do inóculo de Microrganismos Eficientes foi feito de acordo com a ficha informativa (ANEXO A) disponibilizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LEITE; MEIRA, 2016). Inicialmente, foram cozidos 700g de arroz sem sal. O arroz foi então disposto em 3 caixas de madeira cobertas com tela fina de Nylon e tela metálica (Figura 3).



**Figura 3.** Disposição do arroz em caixas de madeira.

Logo em seguida, as caixas foram acomodadas em uma área de mata nativa localizada na UFV, denominada Pomar Campus com coordenadas geográficas -20,755 S, -42,868 O. As caixas foram colocadas diretamente em contato com o solo e cobertas com a própria serapilheira, sendo mantidas na mata pelo período de 15 dias (Figura 4).



**Figura 4.** Caixa contendo arroz disposta na mata para crescimento de microrganismos.

Passados os 15 dias, o arroz foi selecionado de acordo com a cor apresentada: grãos de cor rosa, azul, amarelo e laranja foram selecionados para preparo do inóculo de Microrganismos Eficientes e grãos de cor escura foram descartados (Figura 5). O arroz selecionado foi distribuído em 5 garrafas PET de 2L, preenchidas com água sem cloro e 200 g de açúcar mascavo em cada uma.



**Figura 5.** Arroz selecionado por cor após 15 dias para preparo do inóculo de Microrganismos Eficientes.

As garrafas foram fechadas e acomodadas em um local ao abrigo do sol, sendo que o gás produzido nos recipientes foi removido a cada dois dias. Dentro de 10 a 20 dias, quando não se constatou mais a produção de gás, os microrganismos estavam prontos para o uso.

#### **4.2.3. Inoculação dos reatores e fases operacionais**

Com o objetivo de auxiliar a partida (*start-up*) dos reatores UASB, cada um deles foi inoculado com 500 mL de lodo anaeróbio proveniente de um reator UASB da cidade de Araponga – MG. Apenas um dos reatores foi inoculado com os Microrganismos Eficientes, permitindo ao outro reator atuar como testemunha (Figura 2). Foram inseridos 400 mL de inóculo de ME no reator (300 mL no início do tempo de adaptação e 100 mL ao final do tempo de adaptação) por meio de bombeamento ascendente.

A biomassa introduzida nos reatores foi submetida a um período de adaptação de 90 dias, cujos 30 primeiros dias foram operados de forma contínua (TDH = 12 horas) e os outros 60 dias se deram em regime de batelada. Liu, Liu e Tay (2004), Zhou et al. (2006) e Chong et al. (2012) indicam que o tempo necessário para se obter

um lodo granular varia entre 2 a 8 meses dependendo do padrão da operação adotado. Após a adaptação, os reatores operaram de forma contínua por mais 90 dias divididos em três fases operacionais: 30 primeiros dias com TDH de 12 horas; dias 31 a 60 com TDH de 9 horas e, por fim, dias 61 a 90 com TDH de 6 horas, perfazendo um total (adaptação e operação) de 180 dias de funcionamento.

#### **4.2.4. Amostragem, monitoramento e representação**

Para avaliar o desempenho global dos reatores, foram analisados parâmetros de qualidade do efluente tratado. O efluente foi avaliado em termos de DBO<sub>5</sub>, DQO e nitrogênio amoniacal, sendo que as análises de DBO e nitrogênio eram realizadas com frequência semanal e DQO três vezes por semana. Antes de retirar as alíquotas para análise, as mangueiras de saída eram previamente higienizadas com NaOH 6N com o objetivo de remover eventuais acúmulos de gordura. Depois, amostras de 100 mL eram coletadas dos dois reatores simultaneamente, imediatamente antes das análises físico-químicas. A temperatura e o pH dos reatores foram aferidos diariamente com o objetivo de manter um ambiente adequado à comunidade anaeróbia. As análises foram realizadas de acordo com o *Standad Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

Os gráficos de eficiência de DQO e DBO foram expressos na forma de *boxplot*, em que o ponto no centro das caixas representa a média dos valores obtidos de eficiência de remoção, enquanto que a partir da marca inferior que representa o menor valor absoluto de remoção até a base da caixa tem-se o primeiro quartil, ou seja, 25% das observações estão dentro da variação mencionada. O intervalo delimitado pela caixa corresponde a 50% das observações. As barras de erro indicam os valores absolutos máximo e mínimo de eficiência encontrados em cada análise.

### **4.3. Resultados e Discussão**

A caracterização dos lotes de esgoto bruto utilizados para alimentar os dois reatores é apresentada na Tabela 2. Os valores de DQO do esgoto bruto variaram substancialmente durante o período de operação dos reatores e as concentrações de amônia chegaram a até 92,3 mg.L<sup>-1</sup>. Os valores de pH do esgoto bruto variaram entre 6,7 e 7,2, sendo que Chernicharo (2016) indica que a faixa ideal de pH para manter a comunidade de Archaeas metanogênicas em atividade ótima é entre 6,0 e 8,0. A temperatura é um parâmetro que influencia diretamente o processo de digestão

anaeróbia. Organismos metanogênicos são capazes de se reproduzir dentro de apenas 3 dias em um ambiente com temperatura de cerca de 35 °C, enquanto que em temperaturas menores que 10 °C a reprodução pode levar mais de 50 dias (CHONG et al., 2012). Portanto, optou-se por operar os reatores com temperatura mesofílica.

**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos e valores médios, máximos e mínimos de caracterização do esgoto bruto alimentado ao reator (6 lotes).

<b>Parâmetro</b>	<b>Média ± dp (n)*</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
pH	7,0 ± 0,2 (39)	7,2	6,7
Temperatura (°C)	33,9 ± 1,4 (39)	35,8	32,8
DQO <sub>total</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	644 ± 194 (39)	1184	394
DBO <sub>5</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	204 ± 60 (15)	314	133
Fósforo total (mg.L <sup>-1</sup> )	12,0 ± 0,68 (6)	12,8	11,6
Nitrogênio total Kjeldahl (mg.L <sup>-1</sup> )	107 ± 3,6 (6)	110	105
Nitrogênio Amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )	70,8 ± 18,0 (15)	92,3	33,7
Sólidos Totais (mg.L <sup>-1</sup> )	697 ± 45,1 (6)	748	665
Sólidos Totais Fixos (mg.L <sup>-1</sup> )	290 ± 26,8 (6)	320	268
Sólidos Totais Voláteis (mg.L <sup>-1</sup> )	407 ± 22,5 (6)	428	383
Sólidos Suspensos Totais (mg.L <sup>-1</sup> )	242 ± 2,9 (6)	245	240
Sólidos Suspensos Fixos (mg.L <sup>-1</sup> )	2,5 (6)	-	-
Sólidos Suspensos Voláteis (mg.L <sup>-1</sup> )	239 ± 2,9 (6)	242	238

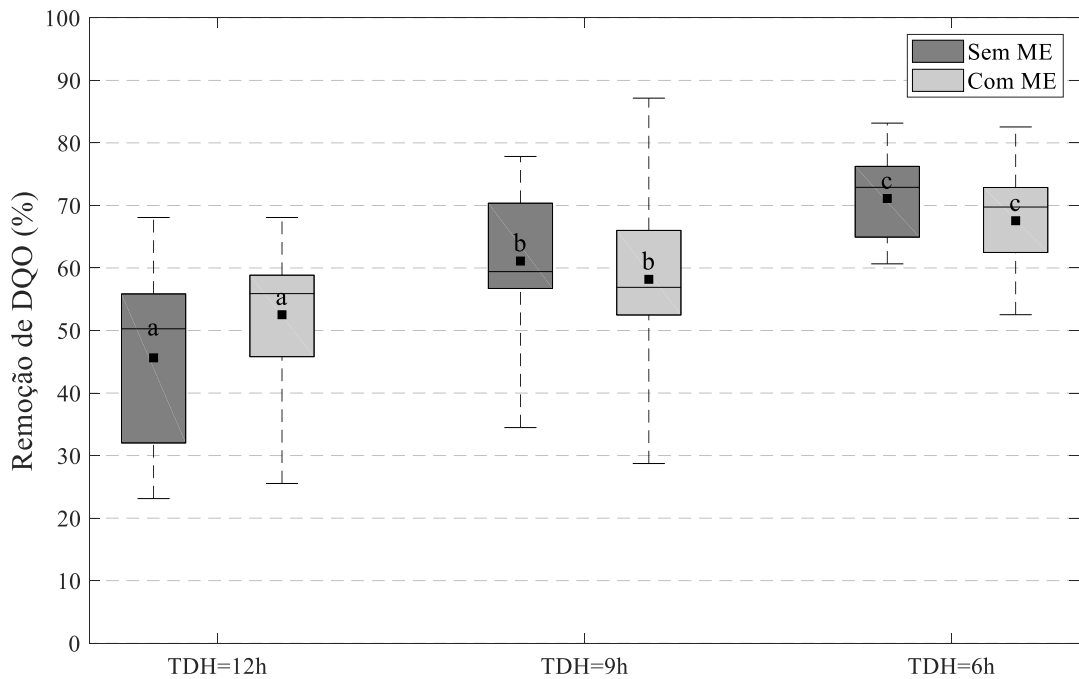
\*dp = desvio padrão; n= número de análises

- os valores não diferiram da média

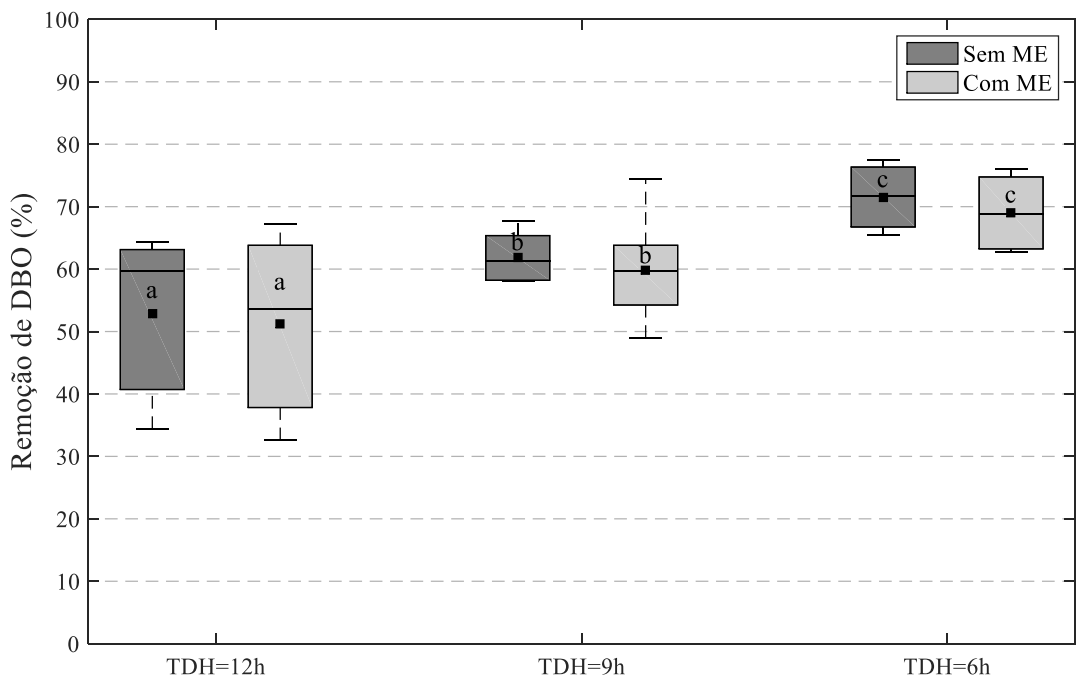
As eficiências de remoção de DQO e DBO obtidas nos reatores são apresentadas em forma de boxplots, nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Os valores das concentrações e eficiências de remoção de DBO e DQO das análises realizadas são apresentados no Apêndice A - Tabelas 4 e 5.

As médias identificadas com mesma letra nas Figuras 6 e 7 não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey e, portanto, as eficiências de

remoção de DQO e DBO aumentaram com a redução TDH mas não foram afetadas pela adição dos Microrganismos Eficientes.



**Figura 6.** Eficiência de remoção de DQO nos reatores UASB de bancada, sem e com Microrganismos Eficientes (ME), em função do TDH (12, 9 e 6 horas) de operação (médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância).



**Figura 7.** Eficiência de remoção de DBO nos reatores UASB de bancada, sem e com Microrganismos Eficientes (ME), em função do TDH (12, 9 e 6 horas) de operação (médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância).

A carga orgânica volumétrica (COV) de alimentação dos reatores para os tempos de 12, 9 e 6 horas foram em média, respectivamente 1,36, 1,53, 2,72 kg DQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Cargas orgânicas volumétricas normalmente aplicadas com sucesso no tratamento de esgotos domésticos com uso de reatores UASB variam entre 2,5 e 3,5 kg DQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> (Chernicharo, 2016). Portanto, o TDH de 6 horas aplicado nesse trabalho gerou uma COV capaz de suprir as demandas por alimento da microbiota sem provocar prejuízos ao desempenho do sistema, permitindo observar maiores eficiências de remoção nesta fase operacional.

Mahmoud et al. (2004) obtiveram uma remoção de 44% de DQO no tratamento de esgoto doméstico utilizando um reator UASB com 6 horas de TDH e COV igual a 2,88 kg DQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Outros estudos também utilizando reatores UASB e esgoto doméstico foram capazes de remover 69% de DQO com COV igual a 1,6 kg DQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH igual a 4,7 h (UEMURA; HARADA, 2000) e; 85% de DQO com COV igual a 1,21 kg DQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH igual a 7,6 h (BEHLING et al., 1997). Com o aumento da COV os processos tendem a apresentar queda de eficiência de remoção de DQO (LATIF et al., 2011), no entanto, para esse trabalho as cargas aplicadas não prejudicaram a unidade operacional.

Pela eficiência observada no TDH de 6 horas nos dois reatores também é possível concluir que, nesta fase operacional, o lodo granular já estava formado e que as 6 horas determinadas foram suficientes para que os organismos metanogênicos completassem suas reações (XU et al., 2018).

Submetendo os reatores a um TDH de 6 horas, as eficiências médias de remoção alcançadas foram de 71% de DQO e 72% de DBO (Figuras 6 e 7).

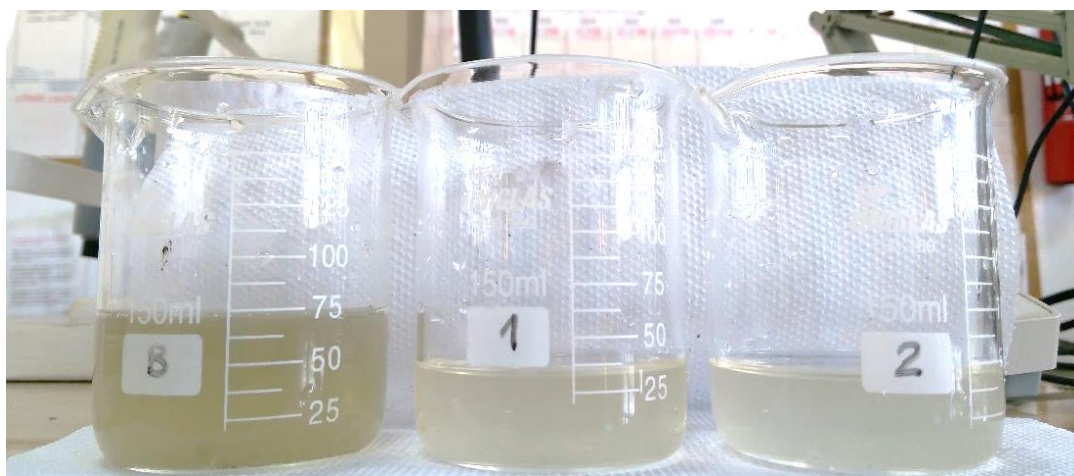
Leitão et al. (2005) realizaram o monitoramento de oito reatores UASB de bancada localizados em Campina Grande, Paraíba, Brasil. O volume dos reatores era de 120 litros e estes foram submetidos a diferentes TDH e concentrações de DQO de entrada. Os reatores alcançaram uma eficiência máxima de 64% de remoção de DQO com TDH de 6 horas.

Pontes e Chernicharo (2011) avaliaram a remoção de componentes orgânicos específicos e de DBO e DQO em uma espécie de sistema compacto, composto por um reator UASB na parte interna e um filtro biológico percolador (FBP) na parte externa

descrito por Chernicharo (2016). Os autores avaliaram as eficiências tanto na saída do reator UASB (entrada do FBP) e na saída do FBP que caracteriza a eficiência total do sistema. Com um TDH de 7,7 horas, o efluente na saída do reator UASB atingiu eficiências de remoção média de 58% de DQO e 72% de DBO. O sistema completo alcançou em média 78% de remoção de DQO e 87% de remoção de DBO.

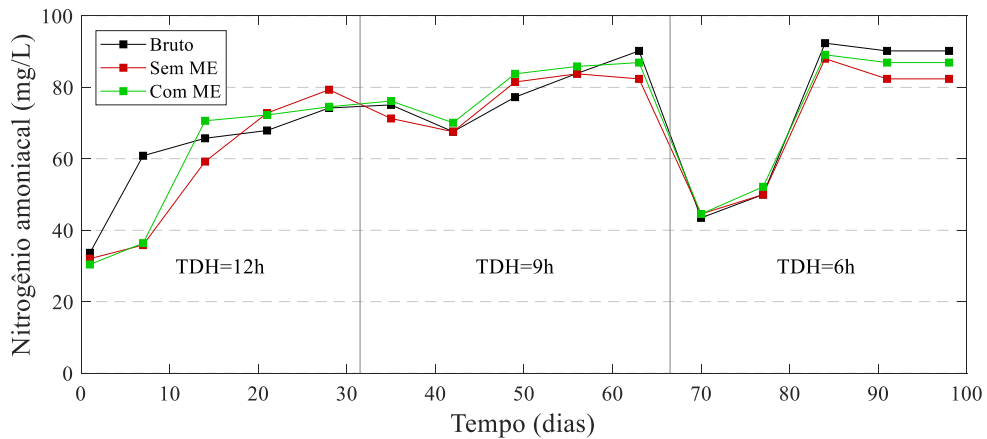
Khan, Mehrotra e Kazmi (2015) utilizaram um reator UASB em escala de bancada com 60 litros para tratar esgoto doméstico a um TDH de 8 horas na Índia. As remoções de DQO e DBO observadas estiveram na faixa de 68%. Foi observado ainda que a atividade metanogênica do sistema decresceu a medida que foram aplicadas cargas orgânicas mais baixas.

As condições de operação aplicadas nos reatores foram capazes de igualar ou superar as eficiências médias observadas na literatura, mesmo sem melhorias com o inóculo de ME. Sendo assim, o tratamento proposto proporcionou elevada clarificação do efluente (Figura 8) atendendo aos padrões de lançamento estabelecidos pelas Legislações Federal (CONAMA 430/2011) e Estadual de Minas Gerais (Resolução conjunta COPAM/CERH-MG 01/2008).



**Figura 8.** Esgoto bruto (B) e tratados dos reatores sem (1) e com (2) Microrganismos Eficientes.

A unidade experimental proposta não foi capaz de remover o nitrogênio amoniacal do sistema nos TDH propostos (Figura 9). Os valores das concentrações e eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal das análises realizadas são apresentados no Apêndice A - Tabela 6.



**Figura 9.** Nitrogênio amoniacal no esgoto bruto e tratado nos reatores sem e com Microrganismos Eficientes (ME).

As altas cargas de nitrogênio lançadas diariamente no meio ambiente podem causar depleção de oxigênio e eutrofização dos corpos hídricos além de morte de organismos aquáticos pela toxicidade da amônia (He et al, 2018). Os reatores UASB são capazes de apresentar elevada eficiência de remoção de matéria orgânica, entretanto apresentam baixa ou nenhuma remoção de nutrientes. Quando o objetivo do tratamento integra a remoção desses compostos, é necessário realizar a instalação de um sistema de tratamento complementar (Chernicharo, 2016).

#### 4.4. Conclusão

Foi possível concluir que os diferentes tempos de detenção hidráulica aplicados ao sistema produziram diferença significativa no desempenho dos reatores, sendo que o TDH de 6 horas foi o mais adequado ao delineamento proposto. Entretanto, o inóculo de ME não foi capaz de promover melhorias de eficiência de remoção de DQO, DBO<sub>5</sub> e nitrogênio amoniacal.

#### 4.5. Referências Bibliográficas

ANDRADE, F. M. C.; BONFIM, F. P. G.; HONÓRIO, I. C. G.; REIS, I. L.; PEREIRA, A. J.; SOUZA, D. B. Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre o uso ecológico e social do EM. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 2011.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20 ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 2012.

BEHLING, E.; DIAZ, A.; COLINA, G.; HERRERA, M.; GUTIERREZ, E.; CHACIN, E.; FERNANDEZ, N.; FORSTER, C. F. Domestic wastewater treatment using a UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 61, n. 3, p. 239-245, 1997.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. *Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.*

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. 2 ed. ampl. e atual. Belo Horizonte: Editora UFMG, 375 p. 2016.

CHONG, S.; SEM, T. K.; KAYAALP, A.; ANG, H. M. The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment – A State-of-the-art review. **Water Research**, v. 46, p. 3434-3470, 2012.

FAN, Y. V.; LEE, C. T.; KLEMEŠ, J. J.; CHUA, L. S.; SARMIDI, M. R.; LEOW, C. W. Evaluation of Effective Microorganisms on home scale organic waste composting. **Journal of Environmental Management**, v. 2016, p. 41-48, 2018.

HE, S.; CHEN, Y.; QIN, M.; MAO, Z.; YUAN, L.; NIU, Q.; TAN, X. Effects of temperature on anammox performance and community structure. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 186-195, 2018.

KHAN, A. A.; MEHROTRA, I.; KAZMI, A. A. Sludge profiling at varied organic loadings and performance evaluation of UASB reactor treating sewage. **Biosystems Engineering**, v. 131, p. 32-40, 2015.

LATIF, M. A.; GHUFRAN, R.; WAHID, Z. A.; AHMAD, A. Integrated application of upflow anaerobic sludge blanket reactor for the treatment of wastewaters. **Water Research**, v. 45, p. 4683-4699, 2011.

LEITE, C. D.; MEIRA, A. L. **Preparo de Microrganismos Eficientes (E.M), Fichas Agroecológicas Tecnologias Apropriadas para Agricultura Orgânica**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/fichas-agroecologicas/arquivos-fertilidade-do-solo>>. Acesso em: 01 ago 2017.

LEITÃO, R. C.; SILVA-FILHO, J. A.; SANDERS, W.; VAN HAADEL, A. C.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. The effect of operational conditions on the

performance of UASB reactors for domestic wastewater treatment. **Water and Science Technology**, v. 52, n. 1-2, p. 299-305, 2005

LETTINGA, G. Sustainable integrated biological wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 85-98, 1996.

LIU, Y.; LIU, Y.; TAY, J. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 2, p. 143-148, 2004.

MAHMOUD, N.; ZEEMAN, G.; GIJZEN, H.; LETTINGA, G. Anaerobic sewage treatment on a one-stage UASB reactor and a combined UASB-Digester System. **Water Research**, v. 38, p. 2448- 2358. 2004.

MINAS GERAIS. Conselho Estadual de Política Ambiental – COPAM. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 1, de 05 de maio de 2008. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.*

PONTES, P. P.; CHERNICHARO, C. A. L. Characterization and removal of specific organic constituents in a UASB-trickling-filter system treating domestic wastewater. **Environmental Technology**, v. 32, n. 3, p. 281-287, 2011.

SHIN, K.; VAN DIEPEN, G.; BLOK, W.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Variability of Effective Micro-organisms (EM) in bokashi and soil and effects on soil-borne plant pathogens. **Crop Protection**, v. 99, p. 168-176, 2017.

STAZI, V.; TOMEI, M. C. Enhancing anaerobic treatment of domestic wastewater: State of the art, innovative Technologies and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 78-91, 2018.

SZYMANSKI, N.; PATTERSON, R. A. Effective microorganisms (EM) and wastewater systems. **Future Directions For On-Site Systems: Best Management Practice Proceedings of On-Site**, v. 3, p. 347-354, 2003.

UEMURA, S.; HARADA, H. Treatment of sewage by a UASB reactor under moderate to low temperature conditions. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 275-282, 2000.

XU, H.; LIU, Y.; GAO, Y.; LI, F.; YANG, B.; WANG, M.; MA, C.; TIAN, Q.; SONG, W. Granulation process in an expanded granular sludge blanket (EGSB) reactor for

domestic sewage treatment: Impact of extracellular polymeric substances compositions and Evolution of microbial population. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 133-161, 2018.

ZHOU, W.; IMAI, T.; UKITA, M.; LI, F.; & YUASA, A. Effect of loading rate on the granulation process and granular activity in a bench scale UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1386-1392, 2006.

## **5. PROCESSO DE GRANULAÇÃO EM REATORES UASB COM O USO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES**

### **RESUMO**

Neste trabalho, investigou-se a influência de Microrganismos Eficientes (ME), sobre a granulação em reatores UASB. O aparato experimental era composto por dois reatores UASB de bancada, ambos inoculados com biomassa adaptada de um reator UASB em escala real e somente um deles inoculado com Microrganismos Eficientes. Os reatores operaram durante três meses para adaptação e estabilização de grânulos e em seguida operaram por mais três meses com diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH), sendo o primeiro mês com 12 horas, o segundo com 9 horas e o terceiro com 6 horas, com um total de 6 meses de operação. Foram feitos testes de resistência ao cisalhamento dos grânulos, extração e quantificação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) do lodo em termos de proteínas e carboidratos. Os grânulos formados no reator que recebeu o inóculo de ME apresentaram maior resistência ao cisalhamento durante todo o período operacional. A adição do inóculo de Microrganismos Eficientes atuou diretamente na formação de grânulos mais resistentes e com melhor capacidade de agregação, uma vez que se observou o aumento da relação proteína/carboidrato nas EPS extraídas do lodo desse reator.

## 5.1. Introdução

A granulação em reatores UASB é um processo que ocorre de forma natural e traz benefícios para o tratamento de efluentes. Sendo assim, os grânulos são unidades funcionais formadas a partir do consórcio de diversos microrganismos presentes no meio (ABBASI; ABBASI, 2012; CHONG et al, 2012).

Zhou et al. (2006) destacam que o processo de granulação em reatores UASB pode ser aprimorado com o uso de polímeros sintéticos. Entretanto, o uso dessas substâncias inertes pode promover alguns problemas operacionais no tratamento, tais como diminuição do volume útil dos reatores, entupimento das tubulações e precipitação do material adicionado, além de problemas de ordem econômica como a elevação dos custos do tratamento em escala real.

A atividade microbiana e a formação de grânulos são fatores que desempenham importante papel na eficiência do processo de tratamento de efluentes (SUDMALIS et al., 2018). O estabelecimento da biomassa em forma de grânulos confere algumas vantagens ao reator UASB, como maior resistência a choques hidráulicos e de carga, elevada remoção de DQO e maior aproveitamento do volume útil do reator já que não é necessária a utilização de meio suporte (CHONG et al., 2012). Em condições adequadas, os grânulos formados em reatores UASB apresentam elevada capacidade de sedimentação, permitindo que o reator opere com altos tempos de residência celular, mesmo quando submetido a baixos tempos de detenção hidráulica (TDH) (HULSHOFF POL; LOPES; LENS, 2004). Essa característica permite uma maior interação e maior tempo de contato entre a biomassa e o efluente, garantindo elevados níveis de eficiência ao sistema (ABBASI; ABBASI, 2012).

O principal constituinte da biomassa granular são as EPS que desempenham um papel central no processo de granulação (LIU; LIU; TAY, 2004). Essas substâncias são formadas por um conjunto de polímeros de alto peso molecular produzidos pelos microrganismos presentes no sistema por meio de mecanismos de excreção, secreção e lise celular (SHI et al., 2017; SHENG; YU; LI, 2010). As EPS estão presentes em bioflocos, biofilmes e em grânulos tanto aeróbios quanto anaeróbios e são capazes de agilizar a formação desses agregados microbianos uma vez que permite a proximidade entre as células envolvidas no processo. (NI et al., 2015; SHENG; YU; LI, 2010).

As EPS são usualmente definidas e quantificadas em termos de carboidratos e proteínas por serem os principais componentes envolvidos no processo. No entanto ácidos nucleicos, lipídeos e outros compostos poliméricos podem estar presentes na matriz do agregado (LIU et al., 2018; SHENG; YU; LI, 2010). A formação da matriz estrutural, fisiologia microbiana e melhoramento a longo prazo da estabilidade granular estão diretamente envolvidos com a presença de substâncias poliméricas extracelulares no sistema (GUO et al., 2016; NI et al., 2015; LIU; LIU; TAY, 2004).

Microrganismos Eficientes (ME) são um conjunto específico de microrganismos compostos por leveduras, bactérias fotossintetizantes, bactérias produtoras de ácido lático e actinomicetos, capazes de atuar nos mais diferentes ambientes biogeoquímicos (ANDRADE et al., 2011; SZYMANSKI; PATTERSON, 2003).

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo analisar o impacto da adição de um inóculo de Microrganismos Eficientes no processo de granulação em reatores UASB de bancada e verificar se tal alteração modifica a resistência dos grânulos e composição de EPS.

## **5.2. Material e métodos**

### **5.2.1. Fases operacionais e amostragem**

Foram usados dois reatores UASB de bancada com 3 litros de capacidade, inoculados com 500 mL de lodo de um reator UASB em escala real e operados com alimentação por esgoto doméstico bruto, em tempos de detenção hidráulica de 12, 9 e 6 horas, após período de adaptação de 90 dias. Para avaliar o impacto dos Microrganismos Eficientes no reator UASB, um dos reatores recebeu 400 mL do inóculo preparado e descrito na seção 4.2.2 desta dissertação. O aparato experimental, bem como as características operacionais do sistema são descritos de forma mais abrangente na seção 4.2 desta dissertação.

Alíquotas de 6 mL lodo foram coletadas do fundo dos reatores, quinzenalmente, para proceder com os testes de resistência ao cisalhamento dos grânulos. Além disso, ao final de cada fase operacional, e conseqüentemente, no início da fase seguinte, eram coletados 10 mL de lodo de cada reator com o objetivo de avaliar a produção de EPS em termos de proteínas e carboidratos.

### **5.2.2. Teste de resistência ao cisalhamento dos grânulos**

Os testes de resistência ao cisalhamento dos grânulos foram baseados nas metodologias descritas por Ghandrekar, Asolekar e Joshi (2005) e Ghandrekar et al. (1996) com modificações, sendo que, todas as análises foram realizadas em duplicata, sempre no início, na metade e no fim de cada fase operacional.

Foram retiradas alíquotas de 6 mL de lodo de cada reator e as alíquotas foram diluídas 10 vezes, ou seja, até completar 60 mL. Para separar os grânulos do lodo flocculento, 25mL da amostra diluída foram transferidos para uma coluna de vidro de 7,5 cm de diâmetro e somente o material granular sedimentado no período de 1 minuto foi utilizado no teste. Os grânulos sedimentados foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL que foi preenchido com água até atingir o volume de 150 mL. O Erlenmeyer foi submetido a agitação a 200 rpm por 5 minutos e depois, o conteúdo foi transferido para uma proveta graduada. Após 1 minuto em repouso, foram separados 120 mL do sobrenadante e os 30 mL restantes foram considerados lodo granular. Os sólidos suspensos das duas alíquotas foram determinados com o objetivo de se estabelecer o Coeficiente de Integridade (CI), definido como a relação entre o peso dos sólidos suspensos do lodo e o peso total dos sólidos suspensos da amostra. O Coeficiente de Integridade está diretamente relacionado à resistência ao cisalhamento dos grânulos, sendo que, quanto maior o Coeficiente de Integridade, menor a dissociação do grânulo por cisalhamento, indicando processo de granulação mais eficiente.

### **5.2.3. Extração das EPS**

O processo de extração das EPS foi realizado de acordo com as metodologias descritas por D'Abzac et al. (2010) e Liu e Fang (2002). Como pré-tratamento, as alíquotas retiradas de cada reator (10 mL) foram diluídas em água deionizada na proporção de 1:2 (v/v). Após a diluição, a suspensão foi centrifugada (5 minutos, 500 rpm) com subsequente remoção do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais uma vez.

Para a extração, foram adicionados 60 µL de formaldeído (36,5%, 4°C, 1 hora) a 10 mL de lodo pré-tratado, e em seguida, 4 mL de NaOH 1N (4°C, 3 horas). A amostra foi centrifugada a 14000 g, a 4°C por 20 minutos e filtrada em membrana de

0,22  $\mu\text{m}$  a  $25^\circ\text{C}$ . O material filtrado foi estocado a  $-80^\circ\text{C}$  e utilizado para determinação da composição das EPS.

#### 5.2.4. Quantificação das EPS

A quantificação de proteínas e carboidratos das amostras de lodo foi realizada em placas de 96 poços, em triplicata.

Para quantificação das proteínas utilizou-se o método de Lowry (1951) com adaptações de Frølund, Griebe e Nielsen (1995). Foram preparadas três soluções: solução A, contendo sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) a 1% (m/v) e tartarato de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) a 2% (m/v), na proporção 1:1; solução B, contendo carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 2% (m/v) e hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 0,1N também na proporção 1:1; e solução C contendo tartarato de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) a 2% (m/v) e água deionizada na proporção 1:1. Dessas soluções foram preparados os reagentes 1 (2 mL da solução A + 100 mL da solução B) e reagente 2 (2 mL da solução C + 100 mL da solução B).

Foram pipetados 2  $\mu\text{L}$  da amostra extraída e 18  $\mu\text{L}$  de água (diluição 10x), em seguida, adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  do reagente 1. A placa foi agitada e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da solução de Folin 1N, preparada a partir do Reagente de Folin Ciocalteau 2N diluído em água deionizada na proporção 1:1, e a placa foi novamente incubada por 30 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 660 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando o reagente 2.

As curvas de calibração foram preparadas a partir de solução de albumina de soro bovina à concentração de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Para quantificar as proteínas presentes ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), aplicou-se a equação (1) descrita por Frølund, Griebe e Nielsen (1995):

$$ABS_{proteinas} = 1,25 (ABS_{R1} - ABS_{R2}) \quad (1)$$

onde:  $ABS_{proteinas}$  = Absorbância total da amostra para proteínas

$$ABS_{R1} = \text{Absorbância da amostra com Reagente 1}$$

$$ABS_{R2} = \text{Absorbância da amostra com Reagente 2}$$

Os carboidratos foram quantificados, em termos de polissacarídeos, pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), adaptado por Albalasmeh, Berhe e

Ghezzehei (2013). A 5  $\mu\text{L}$  da amostra extraída foram adicionados 45  $\mu\text{L}$  de água (diluição 10x), 25  $\mu\text{L}$  de solução de fenol 5% e 125  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico concentrado. A placa foi incubada por 10 minutos, agitada por 30 segundos e colocada em banho-maria à temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm. A curva de calibração para o procedimento foi feita com solução estoque de sacarose à concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

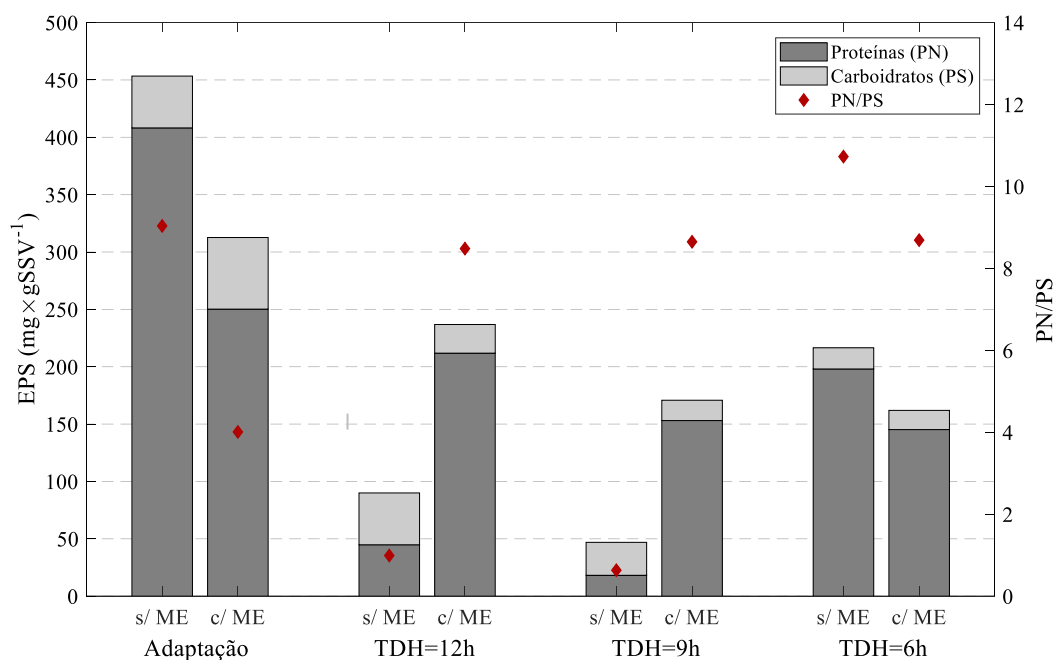
As concentrações de proteínas e carboidratos são expressas em mg EPS por g SSV do lodo do reator, levando em consideração, portanto, a produção de EPS pela biomassa e não a consistência do lodo.

### **5.3. Resultados e Discussão**

As quantidades de proteína superaram as de carboidrato nas EPS de todas as amostras analisadas (Figura 10), padrão observado em outros estudos (HE et al., 2018; XU et al., 2018; ISMAIL et al., 2010). A variação da composição das EPS em um sistema está relacionada à diversidade microbiana presente no meio. As quantidades verificadas indicam se as espécies sofreram ou não algum tipo de condição extrema, ou seja, maiores quantidades de EPS liberadas estão relacionadas a maiores situações de perturbação no sistema (LIU; LIU; TAY, 2004). Uma maior concentração de proteínas pode favorecer a granulação, uma vez que aumenta a hidrofobicidade da superfície celular, reduzindo a repulsão eletrostática entre as células e permitindo uma maior interação e agregação celular (TORRES et al., 2018; LIU; TAY, 2002).

A produção de proteínas no reator com Microrganismos Eficientes apresentou queda em todo o período de operação, partindo de 250  $\text{mg}\cdot\text{gSSV}^{-1}$  no final do período de adaptação até 145  $\text{mg}\cdot\text{gSSV}^{-1}$  ao final do TDH de 6h. Para este reator, os carboidratos apresentaram o mesmo comportamento, com 62  $\text{mg}\cdot\text{gSSV}^{-1}$  no início da operação e chegando a 18  $\text{mg}\cdot\text{gSSV}^{-1}$  ao final do experimento. Em condições ambientais desfavoráveis, a microbiota apresenta tendência a produzir maiores quantidades de EPS com o objetivo de reforçar a estrutura do grânulo, gerando um espaço de aderência adequado para suportar o ambiente adverso (SHENG; YU; LI, 2010). Neste caso, portanto, com a queda da produção de EPS no reator com ME, acredita-se que o ambiente se tornou adaptado e favorável o suficiente para o desenvolvimento dos microrganismos. Essa afirmativa se confirma através dos dados

de eficiência de remoção de matéria orgânica, tratadas no capítulo 4 desta dissertação, que tendem a aumentar a medida que o TDH decresce (de 12 para 9 e 6 horas).



**Figura 10.** Quantidades de EPS produzidas nos reatores sem (s/ ME) e com (c/ ME) Microrganismos Eficientes ao final de cada fase operacional.

A queda na concentração de proteínas e carboidratos durante o período operacional para o reator com ME pode ter sido ocasionada pelo consumo dessas substâncias pela biomassa do sistema. Quando o lodo granular está devidamente desenvolvido, é possível que ocorra um bloqueio dos poros desse grânulo gerado pelas próprias EPS. Assim, o contato e o transporte de massa entre a microbiota e o substrato são dificultados, fazendo com que os microrganismos passem a utilizar proteínas e carboidratos presentes na matriz polimérica do grânulo como fonte de energia (XU et al, 2018).

Para o reator sem ME, observou-se uma elevada concentração de proteínas logo ao final do período de adaptação, ou seja, início da operação dos reatores com TDH = 12h (408 mg.gSSV<sup>-1</sup>). Esse valor teve uma queda acentuada de cerca de 89% ao final da fase operacional de 12 horas, apresentando somente 45 mg.gSSV<sup>-1</sup> de proteínas. Com o TDH de 9 horas, essa concentração apresentou mais uma queda, atingindo 18 mg.gSSV<sup>-1</sup>, voltando a apresentar recuperação (198 mg.gSSV<sup>-1</sup>) ao final da operação dos reatores. As concentrações de carboidratos para o reator sem ME apresentaram comportamento semelhante ao reator com ME, ou seja, decaimento durante todo o período de operação, partindo de 45 mg.gSSV<sup>-1</sup>, mantendo esse valor até o final da

operação com o TDH de 12 horas e passando a 29 mg.gSSV<sup>-1</sup> e depois, ao final do experimento, a 18 mg.gSSV<sup>-1</sup>.

A razão entre proteínas e carboidratos (PN/PS) no reator sem a adição de ME foi elevada logo no início da operação com o TDH de 12 horas (PN/PS = 9), caiu na fase seguinte (PN/PS = 0,63) e ao final da operação com TDH de 9 horas, as quantidades de proteínas e carboidratos foram praticamente iguais (PN/PS=0,99). Grânulos com relação PN/PS menores que 1 normalmente tendem a se desagregar pois, para que haja uma boa interação da matriz polimérica com a célula, o ideal é que se tenha maiores quantidades de proteína (LIU; LIU; TAY, 2004).

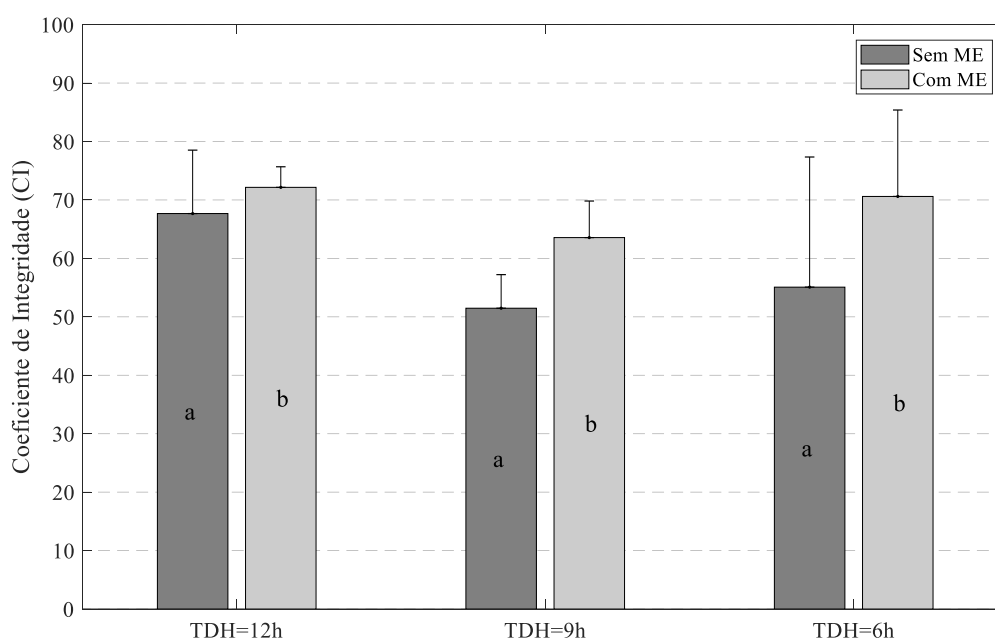
O teste de resistência dos grânulos (GHANDREKAR; ASOLEKAR; JOSHI, 2005 modificado; GHANDREKAR et al., 1996 modificado) se baseou no pressuposto de que se os grânulos forem submetidos a uma tensão de cisalhamento em um fluido, a quantidade de lodo desprendido e liberado nesse fluido será uma função da resistência ao cisalhamento dos grânulos.

Os resultados dos testes de resistência ao cisalhamento dos grânulos (Figura 11) sugerem que, para todos os TDH analisados, a adição de ME influenciou positivamente na resistência dos grânulos ao processo de cisalhamento. As médias identificadas com mesma letra na Figura 11 não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Desta forma, houve diferença significativa entre reatores mas não entre os TDH operados, sendo que o reator que apresentou o melhor desempenho foi o reator com ME. Foram encontrados Coeficientes de Integridade máximos de 84,6 para o reator com ME e de 75,3 para o reator sem ME, ambos valores superiores aos reportados por Ghangrekar et al. (1996) e Ghangrekar, Asolekar e Joshi (2005), que encontraram Coeficientes de Integridade de aproximadamente 30, em reatores UASB. Portanto, quando os reatores são submetidos às mesmas forças de cisalhamento, o reator com ME apresenta menor quantidade de biomassa desprendida e menor desagregação do grânulo.

Para o TDH de 12 horas, o reator sem ME teve uma média de SSV de 6,4 g.L<sup>-1</sup>, enquanto que para o reator com ME a concentração foi de 5,5 g SSV.L<sup>-1</sup>. Com 9 horas, os valores foram 8,7 g SSV.L<sup>-1</sup> para o reator sem ME e 9,2 g SSV.L<sup>-1</sup> para o reator com ME. Para 6 horas de TDH, o reator sem ME apresentou 12,8 g SSV.L<sup>-1</sup> e o reator com ME 11,0 g SSV.L<sup>-1</sup>. As concentrações de SSV aumentam com a diminuição do TDH,

mas em todas as análises o reator sem ME apresentou as maiores concentrações de SSV. Logo, a biomassa presente no reator com ME, foi capaz de utilizar o substrato de forma mais eficiente, obtendo grânulos mais resistentes e com melhores propriedades de agregação obtidas pela relação PN/PS, mesmo com menores concentrações de SSV.

O processo de granulação em reatores UASB é beneficiado quando se prioriza a combinação de forças hidrodinâmicas de cisalhamento no reator, geradas pela velocidade ascensional e baixo TDH, gerando grânulos mais resistentes e estáveis (LIU; TAY, 2002).



**Figura 11.** Coeficiente de Integridade para os reatores sem e com ME durante o período de operação.

#### 5.4. Conclusão

O inóculo do reator UASB com Microrganismos Eficientes favoreceu a formação de grânulos mais resistentes às forças hidrodinâmicas durante todo o período operacional, independente do TDH do reator, que variou de 12 a 6 h. Além disso, o inóculo resultou em maior relação proteína/carboidrato nas EPS, responsável por proporcionar ao lodo maior capacidade de agregação e resistência.

#### 5.5. Referências Bibliográficas

ABBASI, T.; ABBASI, S. A. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket

(UASB) reactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 1696-1708, 2012.

ALBALASMEH, A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 253-261, 2013.

ANDRADE, F. M. C.; BONFIM, F. P. G.; HONÓRIO, I. C. G.; REIS, I. L.; PEREIRA, A. J.; SOUZA, D. B. Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre o uso ecológico e social do EM. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 2011.

CHONG, S.; SEM, T. K.; KAYAALP, A.; ANG, H. M. The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment – A State-of-the-art review. **Water Research**, v. 46, p. 3434-3470, 2012.

D'ABZAC, P.; BORDAS, F.; HULLEBUSCH, E. V.; LENS, P. N. L.; GUIBAUD, G. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. **Environmental Biotechnology**, v. 85, p. 1589-1599, 2010.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FRØLUND, B.; GRIEBE, T.; NIELSEN, P. H. Enzymatic activity on the activated-sludge floc matrix. **Applied Microbiology Biology and Biotechnology**, v. 43, p. 755-761, 1995.

GHANGREKAR, M. M.; ASOLEKAR, S. R.; JOSHI, S. G. Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. **Water Research**, v. 39, n. 6, p. 1123-1133, 2005.

GHANGREKAR, M. M.; ASOLEKAR, S. R.; RANGANATHAN, K. R.; JOSHI, S. G. Experience with UASB reactor start-up under different operating conditions. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 421-428, 1996.

GUO, J.; WANG, S.; LIAN, J.; NGO, H. H.; GUO, W.; LIU, Y.; SONG, Y.; Rapid start-up of the anammox process: Effects of five different sludge extracellular

polymeric substances on the activity of anammox bacteria. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 641-646, 2016.

HE, S.; CHEN, Y.; QIN, M.; MAO, Z.; YUAN, L.; NIU, Q.; TAN, X. Effects of temperature on anammox performance and community structure. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 186-195, 2018.

HULSHOFF POL, L. W.; LOPES, S. I. C.; LENS, L. P. N. L. Anaerobic sludge granulation. **Water Research**, v. 38, p. 1376-1389, 2004.

ISMAIL, S. B.; LA PARRA, C. J.; TEMMINK, H.; VAN LIER, J. B. Extracellular polymeric substances (EPS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors operated under high salinity conditions. **Water Research**, v. 44, p. 1909-1917, 2010.

LIU, H.; FANG, H. P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. **Journal of Biotechnology**, v. 95, p. 249-256, 2002.

LIU, Y.; GUO, J.; LIAN, J.; CHEN, Z.; LI, Y.; XING, Y.; WANG, T. Effects of extracellular polymeric substances (EPS) and N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) on the activity of anammox biomass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 129, p. 141-147, 2018.

LIU, Y.; LIU, Y.; TAY, J. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 143-148, 2004.

LIU, Y.; TAY, J. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. **Water Research**, v. 36, p. 1653-1665, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

NI, S.; SUN, N.; YANG, H.; ZHANG, J.; NGO, H. H. Distribution of extracellular polymeric substances in anammox granules and their important roles during anammox granulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 126-133, 2015.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 882-894, 2010.

SHI, Y.; HUANG, J.; ZENG, G.; GU, Y.; CHEN, Y.; HU, Y. TANG, B.; ZHOU, J.; YANG, Y.; SHI, L. Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview. **Chemosphere**, v. 180, p. 396-411, 2017.

SUDMALIS, D.; GAGLIANO, M. C.; PEI, R.; GROLE, K.; PLUGGE, C. M.; RIJINAARTS, H. H. M.; ZEEMAN, G.; TEMMINK, H. Fast anaerobic sludge granulation at elevated salinity. **Water Research**, v. 128, p. 293-303, 2018.

SZYMANSKI, N.; PATTERSON, R. A. Effective microorganisms (EM) and wastewater systems. **Future Directions For On-Site Systems: Best Management Practice Proceedings of On-Site**, v. 3, p. 347-354, 2003.

TORRES, K.; ÁLVAREZ-HORNOS, F. J.; SAN-VALERO, P.; GAVALDÓN, C.; MARZAL. Granulation and microbial Community dynamics in the chitosan-supplemented anaerobic treatment of wastewater polluted with organic solvents. **Water Research**, v. 130, p. 376-387, 2018.

XU, H.; LIU, Y.; GAO, Y.; LI, F.; YANG, B.; WANG, M.; MA, C.; TIAN, Q.; SONG, W. Granulation process in an expanded granular sludge blanket (EGSB) reactor for domestic sewage treatment: Impact of extracellular polymeric substances compositions and evolution of microbial population. **Bioresour. Technol.**, v. 269, p. 133-161, 2018.

ZHOU, W.; IMAI, T.; UKITA, M.; LI, F.; & YUASA, A. Effect of loading rate on the granulation process and granular activity in a bench scale UASB reactor. **Bioresour. Technol.**, v. 98, n. 7, p. 1386-1392, 2006.

## **6. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS COMUNIDADES PRESENTES EM INÓCULO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES E REATORES UASB**

### **RESUMO**

Este trabalho avaliou os gêneros de *Bacteria* e *Archaea* presentes em dois reatores UASB de bancada, ambos inoculados com lodo de um reator UASB em escala real e somente um deles inoculado com Microrganismos Eficientes (ME). O objetivo foi avaliar, por meio de técnicas de biologia molecular (PCR e sequenciamento do rDNA 16S), o impacto da adição do inóculo de Microrganismos Eficientes sobre as comunidades já presentes no reator na forma de lodo granular. Buscou-se também analisar de que forma diversidade microbiana influenciou a eficiência dos reatores e o processo de granulação. Os resultados apontam que a introdução do inóculo de ME não gerou grandes diferenças em termos de riqueza e abundância nas amostras analisadas. Acredita-se que o efeito do inóculo tenha sido diluído no tempo de adaptação e, portanto, não foram verificadas diferenças entre os reatores. Um grupo específico de *Archaeas* pode ter influenciado positivamente o processo de granulação, enquanto que as características registradas para o domínio *Bacteria* podem ter definido os padrões de eficiência de remoção de matéria orgânica dos reatores.

## 6.1. Introdução

O lançamento de esgotos domésticos sem tratamento nos corpos hídricos tem sido um problema ambiental de grande impacto e o tratamento biológico dos esgotos é a considerada a melhor forma de reduzir esses impactos, devido a sua elevada eficiência e baixo custo operacional (ZHOU et al., 2018). Muitas estações de tratamento de esgoto têm optado por adotar a via anaeróbia de digestão, por esta apresentar algumas vantagens adicionais como produção de energia, recuperação do biogás e baixa produção de lodo (que já sai estabilizado) (STAZI; TOMEI, 2018; CHONG et al., 2012). Chernicharo (2016) estima que só no Brasil atualmente existam mais de 400 reatores anaeróbios do tipo UASB em operação aplicados ao tratamento de esgotos domésticos.

Os principais grupos funcionais que atuam na digestão anaeróbia são compostos por organismos procariotos, destacando-se as bactérias fermentativas hidrolíticas, bactérias fermentativas acidogênicas, bactérias sintróficas acetogênicas e *Archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas (CHERNICHARO, 2016; SANT'ANNA JUNIOR, 2010; METCALF; EDDY, 2003). Para que se possa entender os principais fatores que afetam a eficiência e estabilidade do sistema, bem como atuar no desenvolvimento de estratégias que visam a melhoria contínua dos processos, torna-se importante conhecer a ecologia microbiana das comunidades que se desenvolvem nos reatores sob diferentes condições operacionais (WAGNER; LOY, 2002).

O avanço das técnicas moleculares aplicadas ao tratamento de esgoto doméstico, principalmente vinculado à função dos genes e associação microbiana, tem permitido uma grande possibilidade de aplicações e solução de problemas. Técnicas como PCR (reação em cadeia da polimerase) e sequenciamento de alto rendimento vem sendo utilizadas no estudo da diversidade e abundância microbiana, por permitirem a identificação de microrganismos de grande relevância envolvidos no processo (FERRERA; SÁNCHEZ, 2016).

Este trabalho avaliou, por meio de sequenciamento massivo de amplicom, a diferença das comunidades microbiológicas estabelecidas em dois reatores UASB de bancada e em inóculo de Microrganismos Eficientes, sendo que um dos reatores recebeu o inóculo e o outro foi mantido como testemunha. O principal objetivo do trabalho, portanto, foi avaliar a diversidade das comunidades de bactéria e *Archaea*

dos dois reatores a fim de verificar se a adição do inóculo de Microrganismos Eficientes e o tempo definido para adaptação e operação provocaram alterações nas comunidades microbianas, na eficiência dos reatores e no processo de granulação.

## **6.2. Material e métodos**

### **6.2.1. Fases operacionais e amostragem**

O aparato experimental foi composto por dois reatores UASB de bancada com 3 litros de capacidade, inoculados com 500 mL de lodo de um reator UASB em escala real e operados com alimentação contínua de esgoto doméstico bruto, em tempos de detenção hidráulica de 12, 9 e 6 horas, após período de adaptação de 90 dias. Para avaliar o impacto dos Microrganismos Eficientes (ME) no reator UASB, um dos reatores recebeu 400 mL do inóculo preparado e descrito na seção 4.2.2 desta dissertação. Os itens de projeto dos reatores, bem como as características operacionais do sistema são descritos de forma mais abrangente na seção 4.2 desta dissertação.

Foram retiradas alíquotas de 10 mL de lodo de cada um dos reatores no final da fase operacional com TDH de 12 horas (após 30 dias de operação nesse TDH) e ao final do TDH de 6 horas (final da operação dos reatores) para extração do DNA e sequenciamento do rDNA 16S. O DNA do inóculo puro de Microrganismos Eficientes também foi sequenciado, com o objetivo de avaliar quais grupos conseguiram se estabelecer e avaliar se isso levou a diferenças na diversidade das comunidades microbianas nos reatores com e sem inóculo de ME.

### **6.2.2. Extração do DNA e sequenciamento do rDNA 16s**

O DNA total das amostras de lodo e da amostra do inóculo foi extraído com o uso do kit Genomic DNA from soil da MACHEREY-NAGEL® seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Após a extração, as amostras foram quantificadas e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x, para verificar a pureza e qualidade do material extraído. As amostras foram liofilizadas e enviadas para sequenciamento pela plataforma MiSeq (Illumina) na empresa Mr. DNA ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com), Shallowater, TX, USA).

### **6.2.3. Análise dos dados de sequência e índices de diversidade microbiana**

Os dados de sequências foram processados utilizando o “*Mr DNA analysis pipeline*” que funciona basicamente da seguinte forma: as sequências menores que 150

bp foram retiradas e duplicidades removidas. As OTUs (unidades taxonômicas operacionais) foram definidas pelo agrupamento em 3% de divergência (97% de similaridade) e classificadas por taxonomia utilizando BLASTn contra um banco de dados derivado de RDP II e NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), <http://rdp.cme.msu.edu>). Os primers utilizados foram 27f/338r para amplificação da região V1-V2 do gene 16S rDNA do domínio *Bacteria* e 349f/534r para amplificação da região V3 do gene 16S rDNA do domínio *Archaea*.

As amostras analisadas foram identificadas conforme segue:

I<sub>ME</sub> = inóculo de Microrganismos Eficientes

R<sub>12h</sub> – do reator UASB sem adição de ME, ao final do TDH = 12 h

R<sub>12h/ME</sub> – do reator UASB com adição de ME, ao final do TDH = 12 h

R<sub>6h</sub> – do reator UASB sem adição de ME, ao final do TDH = 6 h

R<sub>6h/ME</sub> – do reator UASB com adição de ME, ao final do TDH = 6 h

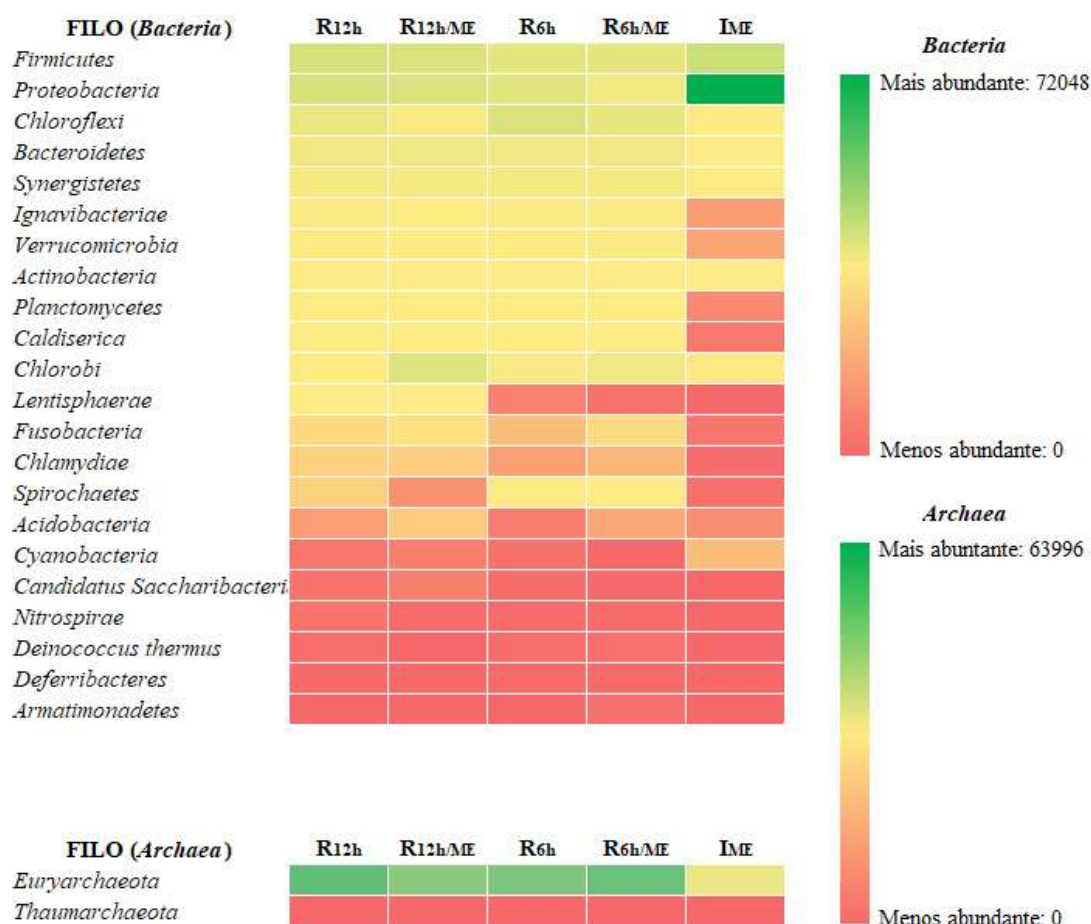
As comparações das comunidades foram feitas através de gráficos de abundância relativa, com base nos 16 gêneros de *Archaea* identificados e nos 22 gêneros de bactéria mais abundantes. Os índices de diversidade foram obtidos com o auxílio do *software* Past (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>) utilizando como dados de entrada as informações de espécie de cada domínio. O Índice de dominância representa a prevalência de uma ou mais espécies sobre as demais em uma mesma amostra, sendo que quanto menores os valores de dominância, mais equitativa é a amostra (GARCIA et al., 2017). O índice de diversidade foi obtido através do Índice de Shannon (HE et al., 2018; ZHANG; BAN; LI, 2018; ANTWI et al., 2017) em que as faixas de valores variam entre 1,5 e 3,5, podendo ultrapassar esse intervalo caso haja um elevado número de espécies na amostra (MAGURRAN, 2004). Portanto, um número máximo para o Índice de Shannon ocorre quando todas as espécies possuem abundâncias iguais. O Índice de equitabilidade J ou Equitabilidade de Pielou, por sua vez, indica a uniformidade na distribuição dos indivíduos dentro cada amostra variando entre 0 (amostra com distribuição desuniforme) e 1 (amostra com equitabilidade máxima) (PIELOW, 1966).

Foram elaborados gráficos de abundância relativa para cada amostra, bem como análise de agrupamento com índice de similaridade de Bray-Curtis cujos valores

variam de 0 (similaridade nula) a 1 (máxima similaridade) e Heat-map das amostras analisadas.

### 6.3. Resultados e Discussão

Os principais microrganismos que compõem o grupo de Microrganismos Eficientes são as leveduras, bactérias fotossintetizantes, bactérias produtoras de ácido lático e actinomicetos (ANDRADE et al., 2011; SZYMANSKI; PATTERSON, 2003). Nota-se que os Actinomicetos, representados pelo filo *Actinobacteria*, estão presentes em todas as amostras analisadas, em abundância média, independentemente da adição do inóculo (Figura 12). O mesmo padrão é observado para o filo *Firmicutes*, composto majoritariamente pelo gênero *Lactobacillus* responsáveis pela produção de ácido lático.

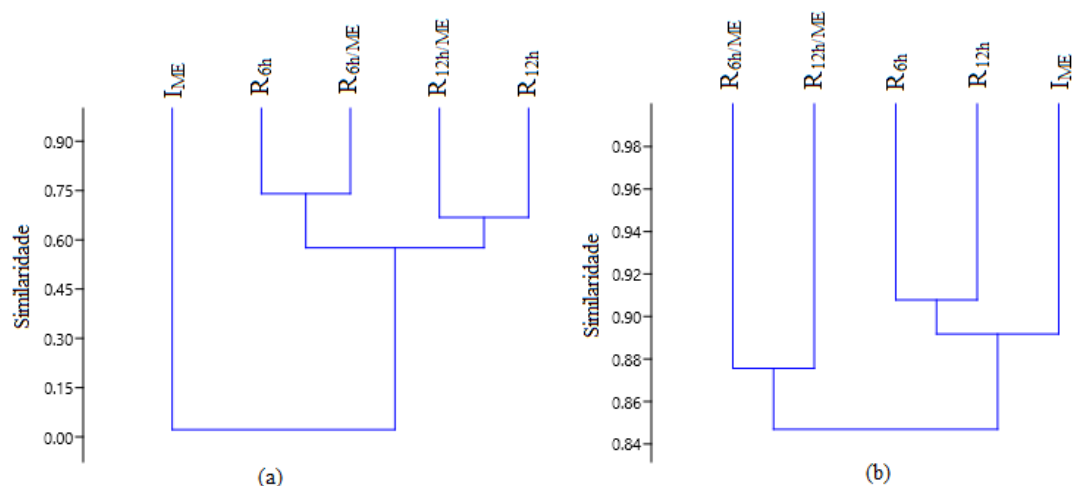


**Figura 12.** Heat-map dos filios de bactéria e *Archaea* observados no sequenciamento para as amostras de lodo e inóculo.

Organismos fotossintetizantes, representados pelos filios *Chloroflexi* (não-sulfurosas) e *Chlorobi* (sulfurosas) foram capazes de se desenvolver nos reatores com com abundância relativamente alta.

Portanto, o inóculo não provocou alteração na composição da microbiota dos reatores em termos de riqueza de indivíduos. Esse resultado pode estar relacionado aos resultados obtidos de eficiência de remoção de matéria orgânica (Capítulo 4), que não apresentaram diferença significativa com a adição do inóculo.

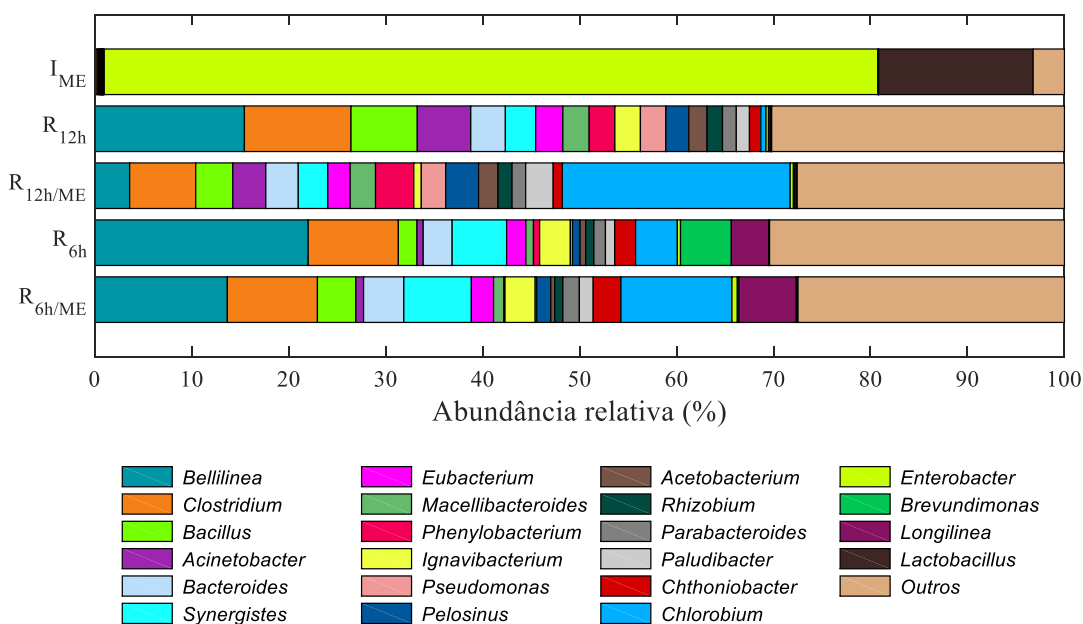
O inóculo de ME possui similaridade muito baixa com as amostras de lodo para bactéria e chega a ser mais similar às amostras do lodo sem ME para *Archaea* (Figura 13). Nota-se também que para o domínio *Bacteria*, as amostras dos dois reatores para um mesmo tempo foram mais similares, enquanto que para as *Archaea*, as amostras retiradas do mesmo reator, em tempos diferentes se agruparam com similaridade mais elevada. Portanto, é possível que o efeito do inóculo tenha sido diluído após a aplicação no reator no tempo proposto para o experimento.



**Figura 13.** Análise de agrupamento das amostras para espécies de (a) bactéria e (b) Archaea.

Distintas abundâncias relativas dos gêneros do domínio *Bacteria* foram encontradas no inóculo de ME (I<sub>ME</sub>) e nos reatores após 30 (R<sub>12h</sub> e R<sub>12h/ME</sub>) e 90 (R<sub>6h</sub> e R<sub>6h/ME</sub>) dias operação (Figura 14).

Os gêneros predominantes no inóculo foram *Enterobacter* e *Lactobacillus*, ambos anaeróbios facultativos, mas esses não foram capazes de se estabelecer no reator inoculado com ME e também não estavam presentes em abundância no lodo utilizado como biomassa de partida dos reatores (R<sub>12h</sub>). No reator inoculado com ME (R<sub>12h/ME</sub>) houve uma elevada abundância relativa do gênero *Chlorobium*, que pertence ao filo *Chlorobi* e são organismos fototróficos e sulfurosos (GARCIA et al, 2017).



**Figura 14.** Abundância relativa de gêneros de bactérias no inóculo de Microrganismos Eficientes (ME) e nos reatores UASB, com e sem adição do inóculo, após 30 e 90 de operação.

Nota-se que ao final do período operacional ( $R_{6h}$  e  $R_{6h/ME}$ ) (Figura 14), o gênero *Bellilinea* foi capaz de se desenvolver e se tornar mais abundante no tempo proposto nos dois reatores. Esse gênero também pertence ao filo *Chlorobi*, citado anteriormente. O gênero *Chlorobium* observado em abundância no início da operação do reator com ME apresentou queda do número de indivíduos no final do experimento, mas ainda se manteve como um dos gêneros mais abundantes deste reator.

Em termos de diversidade microbiana, o inóculo de ME foi pouco diverso, mas muito abundante no que se refere aos dois principais gêneros apontados (*Enterobacter* e *Lactobacillus*). O lodo dos reatores tanto com 30 quanto com 90 dias de operação, apresentaram elevada riqueza e baixa abundância dos gêneros identificados. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 3 onde são mostrados os índices de diversidade que caracterizam as amostras.

Observa-se que a equitabilidade dos dois reatores nos dois tempos analisados, para o domínio bactéria foi semelhante (aproximadamente 0,6), enquanto que para o inóculo o valor foi de 0,17. Esse resultado indica que, quando se compara o inóculo com as demais amostras analisadas, este apresentou distribuição desuniforme com muitos indivíduos agrupados em poucos gêneros. As amostras retiradas dos dois reatores, com 30 e 90 dias de experimento, apresentaram Índice de Shannon superior a 3,7 indicando que a diversidade se manteve elevada durante todo o período

operacional. Observa-se também que as amostras apresentaram maiores índices de Shannon com 30 dias independente do reator analisado, ou seja, com o decorrer da operação dos reatores, a riqueza da comunidade bacteriana diminuiu. Essa tendência, já observada para o domínio *Bacteria* (XU et al, 2018), pode estar relacionada com a capacidade de utilização do substrato pelos microrganismos quando submetidos a um menor TDH. Essa característica permite que somente os organismos mais adaptados ou com maior taxa de crescimento específica ( $\mu$ ) possam se desenvolver no sistema proposto.

O inóculo de ME apresentou índice de Shannon de 0,957 e pode ser considerada como uma amostra pouco diversa em relação ao domínio *Bacteria*, como constatado na Figura 14.

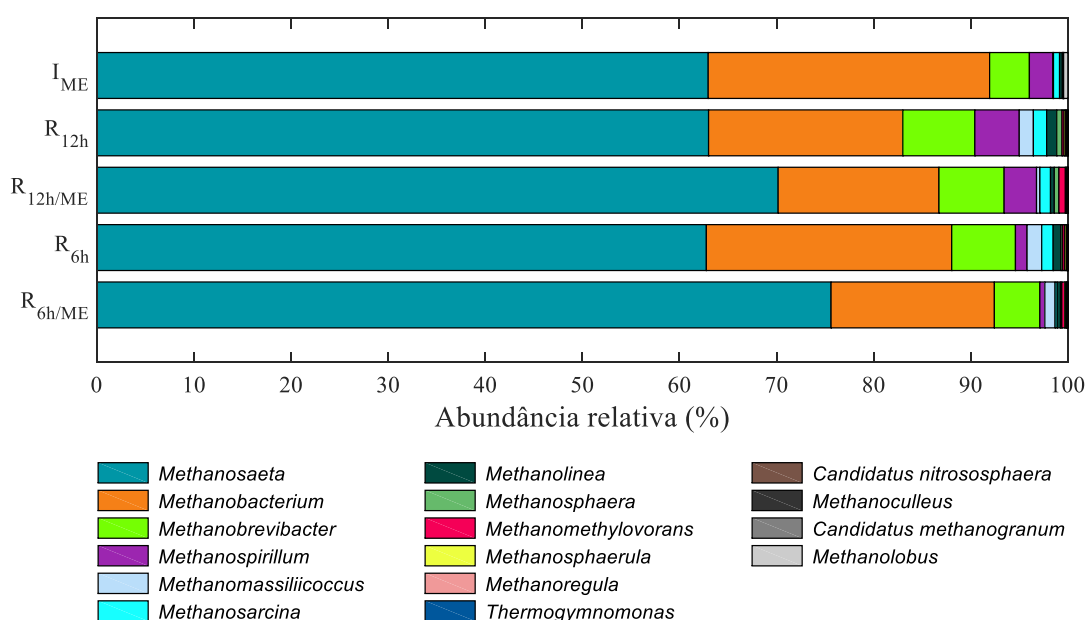
**Tabela 3.** Índices de diversidade microbiana e número de sequências identificadas de espécies nas amostras analisadas.

<i>Bacteria</i>					
	R <sub>12h</sub>	R <sub>6h</sub>	R <sub>12h/ME</sub>	R <sub>6h/ME</sub>	I <sub>ME</sub>
Dominância	0,0487	0,0690	0,0706	0,0545	0,5855
Equitabilidade J	0,6542	0,6138	0,6260	0,6089	0,1709
Shannon	4,1050	3,8170	3,9050	3,7570	0,9570
<i>Archaea</i>					
	R <sub>12h</sub>	R <sub>6h</sub>	R <sub>12h/ME</sub>	R <sub>6h/ME</sub>	I <sub>ME</sub>
Dominância	0,3635	0,3491	0,4950	0,4467	0,3962
Equitabilidade J	0,4710	0,4700	0,3818	0,3886	0,4500
Shannon	1,5860	1,5490	1,2580	1,2950	1,3010

Sabendo-se que quanto maior a dominância, menor a diversidade de espécies, observa-se na Tabela 3 que a amostra de inóculo de ME para o domínio bactéria alcançou dominância de 8 a 12 vezes superior do que as amostras de lodo dos reatores com 30 e 90 dias, o que explica, mais uma vez, o baixo índice de Shannon para a amostra de inóculo.

Na Figura 15 é apresentada a abundância relativa do domínio *Archaea* a nível de gênero para as amostras de lodo dos reatores com 30 (R<sub>12h</sub> e R<sub>12h/ME</sub>) e 90 (R<sub>6h</sub> e R<sub>6h/ME</sub>)

dias operação e no inóculo de ME ( $I_{ME}$ ). A riqueza das cinco amostras é bastante semelhante, o que indica que os organismos adicionados por meio do inóculo já estavam presentes no lodo de partida dos reatores. As *Archaeas* metanogênicas acetoclásticas apresentaram maior abundância relativa tanto nos reatores quanto no inóculo de ME, representadas pelo gênero *Methanosaeta*. Os outros três gêneros mais abundantes: *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanospirillum* são compostos por organismos metanogênicos hidrogenotróficos. Em estudos recentes, esses quatro gêneros também já foram reportados como os mais abundantes em reatores anaeróbios (XU et al., 2018; YANG et al., 2018) e outros trabalhos (ZHANG; BAN; LI, 2018; QIN et al., 2018; LIN et al., 2017) também identificaram o gênero *Methanosaeta* como sendo o mais abundante em termos de *Archaea*.



**Figura 15.** Abundância relativa de gêneros de Archaea no inóculo de Microrganismos Eficientes (ME) e nos reatores UASB, com e sem adição do inóculo, após 30 e 90 de operação.

Nota-se que, para os dois períodos analisados (12 e 6 horas), as *Archaeas* metanogênicas acetoclásticas sofreram um aumento na sua abundância relativa com a adição do inóculo de ME.

As *Archaeas* metanogênicas acetoclásticas são predominantes sobre as hidrogenotróficas durante o processo de formação do lodo granular e indicam que o grânulo formado é consistente (HULSHOFF POL; LOPES; LENS, 2004). Além disso, o gênero *Methanosaeta*, é capaz de utilizar o acetato na produção do metano e são

frequentemente encontrados em reatores que apresentam desenvolvimento de biomassa em na forma lodo granular (ZHANG; BAN; LI, 2018).

#### **6.4. Conclusão**

A partir das análises realizadas, observou-se que é provável que o efeito do inóculo tenha sido diluído com o tempo de operação e por esse motivo não foram observadas grandes diferenças de diversidade com a adição do inóculo de ME ao reator. A forma descontínua como o inóculo foi aplicado neste trabalho pode ter sido responsável pelos padrões observados de desempenho dos reatores, granulação e diversidade microbiana.

Os gêneros de bactéria presentes no inóculo não foram capazes de se estabelecer nos reatores nos TDH propostos, mesmo apresentando elevada abundância relativa. Não foi observada alteração na riqueza dos gêneros de bactéria das amostras de lodo após a adição do inóculo de ME e essa característica pode explicar a inexistência de diferença significativa de remoção de compostos orgânicos entre os dois reatores, observada no Capítulo 4 desta dissertação.

O aumento da abundância de *Archaeas* metanogênicas acetoclásticas, ocasionado pela adição do inóculo de ME, favoreceu a existência de condições adequadas para que o grânulo no reator com ME apresentasse melhor capacidade de resistir às tensões de cisalhamento e produção mais eficiente de EPS (Capítulo 5).

#### **6.5. Referências Bibliográficas**

ANDRADE, F. M. C.; BONFIM, F. P. G.; HONÓRIO, I. C. G.; REIS, I. L.; PEREIRA, A. J.; SOUZA, D. B. Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre o uso ecológico e social do EM. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 2011.

ANTWI, P.; LI, J.; BOADI, P. O.; MENG, J.; SHI, E.; XUE, C.; ZHANG, Y.; AYIVI, F. Functional bacterial and archaeal diversity revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing during potato starch processing wastewater treatment in a UASB. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 348-357, 2017.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. 2 ed. ampl. e atual. Belo Horizonte: Editora UFMG, 375 p. 2016.

CHONG, S.; SEM, T. K.; KAYAALP, A.; ANG, H. M. The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment – A State-of-the-art review. **Water Research**, v. 46, p. 3434-3470, 2012.

FERRERA, I.; SÁNCHEZ, O. Insights into microbial diversity in wastewater treatment systems: How far have we come?. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 790-802, 2016.

GARCIA, G. P. P.; DINIZ, R. C. O.; BICALHO, S. K.; FRANCO, V.; PEREIRA, A. D.; BRANDT, E. F.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAUJO, J. C. Microbial Community and sulphur behaviour in phototrophic reactors treating UASB effluents under different operational conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 119, p. 486-498, 2017.

HE, S.; CHEN, Y.; QIN, M.; MAO, Z.; YUAN, L.; NIU, Q.; TAN, X. Effects of temperature on anammox performance and community structure. **Bioresour. Technology**, v. 260, p. 186-195, 2018.

HULSHOFF POL, L. W.; LOPES, S. I. C.; LENS, L. P. N. L. Anaerobic sludge granulation. **Water Research**, v. 38, p. 1376-1389, 2004.

LIN, R.; CHENG, J.; ZHANG, J.; ZHOU, J.; CEN, K.; MURPHY, J. D. Boosting biomethane yield and production rate with graphene: The potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. **Bioresour. Technology**, v. 239, p. 345-352, 2017.

MAGURRAN, A. E. **Measuring biological diversity**. John Wiley & Sons, 2013.

METCALF, E.; EDDY, H. P. I. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4 ed. USA, McGraw-Hill Book Company, 1815p. 2003.

PIELOW, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. **Journal of Theoretical Biology**, v. 13, p. 131-144, 1966.

QIN, H.; JI, B.; ZHANG, S.; KONG, Z. Study on the bacterial and Archaeal Community structure and diversity of activated sludge from three wastewater treatment plants. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, p. 801-807, 2018.

SANT'ANNA JR, G. L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 418p. 2010.

STAZI, V.; TOMEI, M. C. Enhancing anaerobic treatment of domestic wastewater: State of the art, innovative Technologies and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 78-91, 2018.

SZYMANSKI, N.; PATTERSON, R. A. Effective microorganisms (EM) and wastewater systems. **Future Directions For On-Site Systems: Best Management Practice Proceedings of On-Site**, v. 3, p. 347-354, 2003.

WAGNER, M.; LOY, A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 218-227, 2002.

XU, H.; LIU, Y.; GAO, Y.; LI, F.; YANG, B.; WANG, M.; MA, C.; TIAN, Q.; SONG, W. Granulation process in an expanded granular sludge blanket (EGSB) reactor for domestic sewage treatment: Impact of extracellular polymeric substances compositions and evolution of microbial population. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 133-161, 2018.

YANG, B.; WANG, M.; WANG, J.; SONG, X.; WANG, Y.; XU, H.; BAI, J. Mechanism of high contaminant removal performance on the expanded granular sludge blanket (EGSB) reactor involved with granular activated carbon for low-strength wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 1176-1185, 2018.

ZHANG, L.; BAN, Q.; LI, J. Microbial Community dynamics at high organic loading rates revealed by pyrosequencing during sugar refinery wastewater treatment in UASB reactor. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 12, n. 4, p. 1-12, 2018.

ZHOU, H.; LI, X.; XU, G.; YU, H. Overview of strategies for enhanced treatment of municipal/domestic wastewater at low temperature. **Science of the Total Environment**, v. 643, p. 225-237, 2018.

## ANEXO A – Ficha informativa para produção do inóculo de Microrganismos Eficientes



### PREPARO DE MICRORGANISMOS EFICIENTES (E.M)

Os microrganismos eficientes são seres muito pequenos (fungos e bactérias) que vivem naturalmente em solos férteis e em plantas.

Esses microrganismos podem ser utilizados na agricultura e na criação animal.

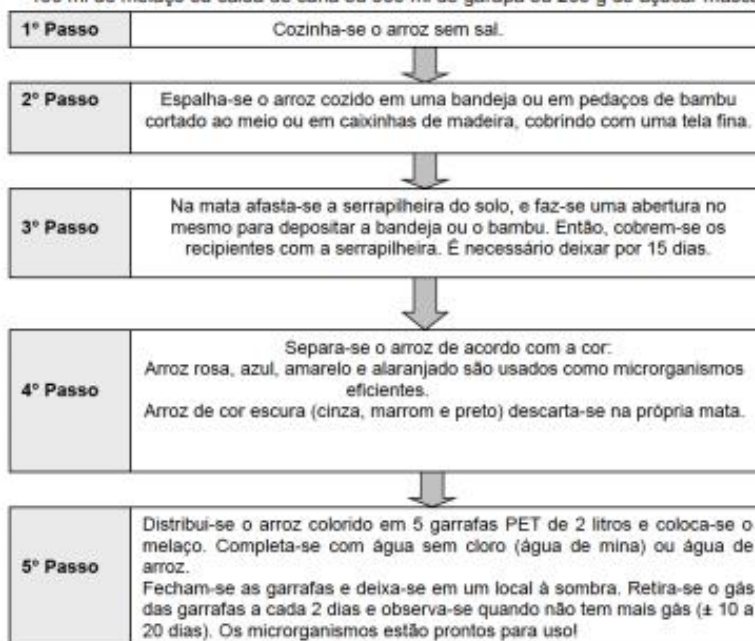
Os microrganismos eficientes são capturados em uma mata (preferencialmente virgem) e, depois disso, ativados com melão.

#### Vantagens do uso do E.M:

- É uma técnica acessível e de baixo custo;
- É de fácil preparo na propriedade.

#### Ingredientes (1ª opção):

- 700 g de arroz;
- 100 ml de melão ou calda de cana ou 500 ml de garapa ou 200 g de açúcar mascavo.



#### Ingredientes (2ª opção):

- 2,3 kg de arroz cozido (ou 4,5 kg de farelo de arroz);
- 500 ml de melão para cada 5 litros de água
- 2,7 m de plástico (preferencialmente de cor preta).

**Captura de microrganismos de mata:**

Cozinha-se o arroz sem sal.

Coleta-se um saco de serrapilheira de uma mata, preferencialmente folhas que possuam fungos ou bactéria;

No chão, espalha-se a serrapilheira sobre um plástico (preferencialmente preto) e mistura-se com o arroz cozido (ou o farelo de arroz);

Umedecer a mistura de arroz e serrapilheira com a solução de melaço e água e deixar repousar ao ar livre por 3 dias para fazer a captura (preferencialmente quando não estiver chovendo).

É importante monitorar a mistura e observar se existem colônias de bactérias ou fungos de cor esbranquiçada nas folhas. Ao final se obtém um saco de folhas com microrganismos de mata, os microrganismos eficientes.

**Ingredientes para elaborar EM sólido:**

- 60 kg de farelo de arroz

- 1 saco de serrapilheira com microrganismos de mata capturados (conforme descrito acima);

- 500 ml de melaço para cada 5 litros de água

- 1 barril plástico com capacidade de 100 ou 200 litros.

**Elaboração do EM sólido:**

Colocar o farelo de arroz sobre uma superfície limpa ou um plástico;

Adicionar o saco de serrapilheira de microrganismos de mata capturados e misturar;

Umedecer a mistura com o melaço, evitando o excesso de umidade;

Colocar a mistura em um barril, compactar e tampar;

Destampar o barril a cada dois ou três dias para liberar gases;

Os microrganismos eficientes estarão prontos para uso após 30 dias.

**Elaboração do EM líquido:**

Para produzir o EM líquido, colocar aproximadamente 500g de EM sólido em 100 litros de água e depois coar.

Os microrganismos eficientes podem ser aplicados em todas as culturas. Para sugestões de uso, ver a ficha Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas nº 32 - uso de Microrganismo Eficiente.

**Importante!**

- Os microrganismos eficientes podem permanecer armazenados até um ano. Não se deve usá-los quando se constata mau cheiro!
- O tempo que o arroz permanece na mata (captura) pode variar de acordo com a região.
- Não usar água com cloro, pois isso mata os microrganismos.

**Elaboradores da ficha:** LEITE, C. D.; MEIRA, A. L;

Referência bibliográfica:

CASALI, V. W. D. (Org.) **Caderno dos microrganismos eficientes (EM):** Instruções práticas sobre o uso ecológico e social do EM. Viçosa, MG, 2009. 31p.

GÓMEZ, D.; VÁSQUEZ, M. **Abonos orgânicos.** Tegucigalpa: PyMeRural, 2011. 27p. (Serie: Producción orgánica de hortalizas de clima templado).

**APÊNDICE A – Valores obtidos de concentração e eficiência de remoção de DBO, DQO e nitrogênio amoniacal dos efluentes bruto e tratados.**

**Tabela 4.** Concentração e eficiência de remoção de DBO dos efluentes bruto e tratados dos reatores sem e com ME.

		Semana	Esgoto Bruto	Efluente tratado (mg.L <sup>-1</sup> )		Eficiência de remoção (%)	
				Sem ME	Com ME	Sem ME	Com ME
TDH	12 horas	1	142	57	47	60	67
		4	140	92	94	34	33
		5	160	57	74	64	54
	9 horas	1	176	73	90	58	49
		2	216	84	86	61	60
		3	252	106	111	58	56
		4	160	52	41	68	74
		5	152	54	61	65	60
	6 horas	1	280	97	104	65	63
		2	262	59	67	77	74
		3	314	75	98	76	69
		4	218	72	80	67	63
		5	275	78	66	72	76

**Tabela 5.** Concentração e eficiência de remoção de DQO dos efluentes bruto e tratados dos reatores sem e com ME.

	Dia	Efluente bruto	Efluente tratado (mg.L <sup>-1</sup> )		Eficiência de remoção (%)	
			Sem ME	Com ME	Sem ME	Com ME
TDH = 12 horas	1	429	315	139	27	68
	3	429	315	233	27	46
	5	399	264	253	34	37
	8	552	183	214	67	61
	10	1011	411	461	59	54
	12	1184	537	522	55	56
	15	637	317	280	50	56
	17	604	354	327	41	46
	19	464	357	346	23	26
	22	1048	334	334	68	68
	24	506	333	251	34	50
	26	643	292	270	55	58
	29	941	437	400	54	58
TDH = 9 horas	1	703	345	419	51	40
	3	728	296	284	59	61
	5	446	292	318	34	29
	8	491	190	223	61	55
	10	541	232	233	57	57
	12	477	201	166	58	65
	15	717	213	202	70	72
	17	508	206	230	59	55
	19	913	254	327	72	64
	22	604	267	299	56	50
	24	485	158	227	67	53
	26	394	115	125	71	68
	29	447	99	57	78	87
TDH = 6 horas	1	727	277	296	62	59
	3	512	202	243	61	53
	5	580	202	208	65	64
	8	735	197	222	73	70
	10	817	271	298	67	64
	12	583	210	254	64	56
	15	795	178	222	78	72
	17	892	210	246	77	72
	19	626	176	221	72	65
	22	655	178	168	73	74
	24	788	133	137	83	83
	26	503	120	142	76	72
	29	618	160	155	74	75

**Tabela 6.** Concentração e eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal dos efluentes bruto e tratados dos reatores sem e com ME.

		Semana	Esgoto Bruto	Efluente tratado (mg.L <sup>-1</sup> )		Eficiência de remoção (%)	
				Sem ME	Com ME	Sem ME	Com ME
TDH	12 horas	1	33,7	32,0	30,4	4,8	9,7
		2	60,8	35,9	36,4	41,1	40,2
		3	65,7	59,2	70,6	9,9	0,0
		4	67,9	72,8	72,2	0,0	0,0
		5	74,2	79,3	74,5	0,0	0,0
	9 horas	1	75,1	71,3	76,2	5,1	0,0
		2	67,6	67,6	70,1	0,0	0,0
		3	77,2	81,5	83,8	0,0	0,0
		4	83,9	83,8	85,8	0,1	0,0
		5	90,2	82,3	86,9	8,7	3,6
	6 horas	1	43,5	44,5	44,5	0,0	0,0
		2	50,0	50,0	52,1	0,0	0,0
		3	92,3	88,0	89,1	4,7	3,5
		4	90,2	82,3	86,9	8,7	3,6
		5	90,2	82,3	86,9	8,7	3,6

**APÊNDICE B – Classificação das sequências obtidas com o primer 27f/338r para o domínio *Bacteria***

**Tabela 7.** Classificação e quantidade de sequências obtidas a nível de filo do domínio bactéria.

FILO	NÚMERO DE READS				Inóculo
	30d s/ ME	30d c/ ME	90d s/ ME	90d c/ ME	
<i>Caldiserica</i>	255	104	442	310	11
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	7	15	2	1	0
<i>Actinobacteria</i>	614	461	846	269	184
<i>Synergistetes</i>	2089	2212	2939	3066	85
<i>Armatimonadetes</i>	0	1	0	5	0
<i>Lentisphaerae</i>	91	126	15	6	0
<i>Planctomycetes</i>	430	316	492	757	20
<i>Chlamydiae</i>	64	61	34	49	2
<i>Deinococcus Thermus</i>	3	0	2	4	0
<i>Ignavibacteriae</i>	1026	311	1205	977	32
<i>Nitrospirae</i>	7	3	2	3	0
<i>Firmicutes</i>	12102	10176	7240	7295	14538
<i>Bacteroidetes</i>	3963	4498	3552	3768	125
<i>Cyanobacteria</i>	9	14	6	0	52
<i>Chlorobi</i>	207	9449	1636	3590	90
<i>Acidobacteria</i>	32	60	13	39	22
<i>Deferribacteres</i>	1	1	2	2	0
<i>Fusobacteria</i>	69	75	53	70	8
<i>Spirochaetes</i>	64	25	118	85	5
<i>Chloroflexi</i>	6288	1658	10103	6325	165
<i>Proteobacteria</i>	11023	10152	8442	3704	72048
<i>Verrucomicrobia</i>	617	500	899	1041	37

**Tabela 8.** Classificação e quantidade de sequências obtidas a nível de gênero do domínio bactéria.

GÊNERO	NÚMERO DE READS				Inóculo
	30d s/ ME	30d c/ ME	90d s/ ME	90d c/ ME	
<i>Kopriimonas</i>	2	12	0	0	0
<i>Undibacterium</i>	8	7	1	4	0
<i>Paenibacillus</i>	11	2	1	2	17
<i>Treponema</i>	63	23	115	80	5
<i>Proteocatella</i>	5	7	39	62	2
<i>Thermacetogenium</i>	14	8	1	5	0
<i>Thermodesulfovibrio</i>	3	2	1	1	0
<i>Planctomyces</i>	15	5	2	5	3
<i>Solobacterium</i>	19	33	1	7	1
<i>Pseudochrobactrum</i>	4	6	3	1	1

<i>Methyloferula</i>	4	2	4	2	0
<i>Lachnoclostridium</i>	7	7	5	5	4
<i>Nitrospira</i>	4	1	1	2	0
<i>Sphingobacterium</i>	0	0	60	0	0
<i>Acidisphaera</i>	2	1	2	1	4
<i>Fusibacter</i>	1	4	2	4	0
<i>Anaeromyxobacter</i>	1	0	2	0	0
<i>Ensifer</i>	25	28	20	14	1
<i>Oscillibacter</i>	80	109	11	22	1
<i>Methylovirgula</i>	1	1	1	0	0
<i>Thioflavicoccus</i>	1	2	0	0	0
<i>Desulfomicrobium</i>	90	90	161	147	5
<i>Rhodovarius</i>	5	3	0	1	0
<i>Agromyces</i>	0	2	2	0	0
<i>Zoogloea</i>	27	52	3	3	1
<i>Haemophilus</i>	0	0	0	0	4
<i>Cloacibacterium</i>	12	19	21	20	2
<i>Anaerovorax</i>	117	153	107	100	8
<i>Acidobacterium</i>	7	8	5	22	5
<i>Oscillochloris</i>	140	76	122	70	10
<i>Enhydrobacter</i>	57	79	1190	27	15
<i>Marinifilum</i>	1	1	3	1	0
<i>Ruminiclostridium</i>	0	0	5	4	0
<i>Ruminococcus</i>	370	686	508	532	25
<i>Lutispora</i>	178	144	125	147	5
<i>Blastopirellula</i>	41	26	56	38	0
<i>Deferribacter</i>	1	1	2	2	0
<i>Kineosphaera</i>	2	1	2	0	0
<i>Sinorhizobium</i>	19	14	3	4	1
<i>Thiobacillus</i>	2	1	14	83	1
<i>Oceanicaulis</i>	11	9	0	0	0
<i>Desulfocaldus</i>	54	26	20	52	3
<i>Microvirga</i>	84	19	175	11	4
<i>Filomicrobium</i>	0	2	0	5	0
<i>Pseudomonas</i>	1021	1012	85	49	41
<i>Olsenella</i>	23	20	2	1	0
<i>Aminomonas</i>	102	111	33	32	3
<i>Bosea</i>	203	91	103	30	7
<i>Lysobacter</i>	3	5	2	2	0
<i>Desulfuromusa</i>	69	119	20	21	0
<i>Nitrospirillum</i>	0	0	0	0	9
<i>Clostridium</i>	4283	2741	3538	2915	152
<i>Petrimonas</i>	118	149	251	325	4
<i>Azospirillum</i>	9	2	12	3	0
<i>Sporomusa</i>	15	26	17	12	2

<i>Pleomorphomonas</i>	141	138	58	30	4
<i>Anaerofilum</i>	31	52	14	23	1
<i>Leucobacter</i>	19	21	17	10	0
<i>Sandaracinobacter</i>	5	0	1	0	0
<i>Acetivibrio</i>	9	11	12	29	2
<i>Dehalogenimonas</i>	2	0	5	3	0
<i>Labrys</i>	1	1	2	2	0
<i>Dongia</i>	1	0	4	0	4
<i>Caldicoprobacter</i>	0	1	1	3	0
<i>Anaerofustis</i>	0	4	1	0	0
<i>Gemella</i>	0	0	1	0	9
<i>Spirochaeta</i>	1	1	0	3	0
<i>Cupriavidus</i>	14	13	8	0	0
<i>Chitinophaga</i>	43	42	14	14	0
<i>Kaistia</i>	91	58	32	10	2
<i>Desulfofaba</i>	6	2	9	13	0
<i>Devosia</i>	2	8	4	1	0
<i>Flexivirga</i>	1	0	1	0	4
<i>Arsenicococcus</i>	3	6	4	1	0
<i>Methylocella</i>	3	3	2	2	0
<i>Roseateles</i>	2	5	1	1	0
<i>Sarcina</i>	160	84	103	82	6
<i>Geothrix</i>	25	52	8	17	2
<i>Acidocella</i>	0	0	2	0	26
<i>Acetobacterium</i>	734	806	221	129	14
<i>Geobacillus</i>	0	0	0	0	3
<i>Desulforhabdus</i>	9	8	9	9	0
<i>Actinocatenispora</i>	0	0	0	0	4
<i>Sphingopyxis</i>	203	158	38	45	9
<i>Atopobium</i>	0	0	0	0	3
<i>Roseovarius</i>	1	32	0	0	0
<i>Sulfurovum</i>	1	1	96	13	0
<i>Chelativorans</i>	4	3	1	1	0
<i>Dermacoccus</i>	6	3	9	4	0
<i>Solirubrobacter</i>	1	1	1	0	0
<i>Blautia</i>	0	0	2	1	0
<i>Mariniphaga</i>	44	32	210	332	5
<i>Intestinimonas</i>	0	1	1	1	0
<i>Proteiniphilum</i>	2	0	3	10	0
<i>Sporanaerobacter</i>	2	3	9	19	1
<i>Paracraurococcus</i>	1	0	0	0	2
<i>Stenotrophomonas</i>	35	39	431	10	13
<i>Chryseobacterium</i>	4	3	292	20	10
<i>Pseudoxanthomonas</i>	73	63	90	26	1
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	7	15	2	1	0

<i>Rhodoblastus</i>	31	25	6	7	2
<i>Wolbachia</i>	0	0	0	0	3
<i>Novosphingobium</i>	78	29	44	17	95
<i>Blastochloris</i>	123	148	30	18	5
<i>Geodermatophilus</i>	1	0	3	1	0
<i>Catenibacterium</i>	1	2	1	1	0
<i>Anoxybacillus</i>	86	67	9	5	7
<i>Variovorax</i>	54	36	18	16	0
<i>Turcibacter</i>	372	244	223	163	9
<i>Syntrophorhabdus</i>	12	6	21	15	2
<i>Macellibacteroides</i>	1058	1051	299	329	17
<i>Psychrosinus</i>	4	7	6	5	0
<i>Bartonella</i>	1	3	1	1	0
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	1	89
<i>Catabacter</i>	9	11	3	5	0
<i>Dehalobacter</i>	0	0	1	3	0
<i>Afipia</i>	5	0	0	0	1
<i>Roseomonas</i>	163	93	59	27	6
<i>Brooklawnia</i>	52	37	44	20	3
<i>Christensenella</i>	4	7	10	12	0
<i>Anaerolinea</i>	87	67	129	104	4
<i>Fusobacterium</i>	61	68	47	56	8
<i>Pirellula</i>	249	105	276	222	13
<i>Flaviflexus</i>	3	2	0	0	0
<i>Gemmobacter</i>	47	33	17	12	2
<i>Merismopedia</i>	3	3	1	0	0
<i>Parabacteroides</i>	555	564	454	534	17
<i>Arthrobacter</i>	0	0	41	3	2
<i>Leptolyngbya</i>	0	0	0	0	44
<i>Tessaracoccus</i>	5	4	3	2	0
<i>Ochrobactrum</i>	40	51	81	10	2
<i>Gallicola</i>	1	2	2	4	0
<i>Armatimonas</i>	0	1	0	5	0
<i>Desulfomonile</i>	2	2	2	3	0
<i>Amaricoccus</i>	54	20	48	16	3
<i>Leptotrichia</i>	7	6	5	6	0
<i>Gordonia</i>	59	45	213	29	11
<i>Jannaschia</i>	7	5	2	0	0
<i>Mobilicoccus</i>	0	2	3	0	0
<i>Sporichthya</i>	7	4	4	6	0
<i>Candidatus Odysella</i>	0	5	0	1	0
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	1	1	1	1	0
<i>Dehalococcoides</i>	4	1	1	0	0
<i>Ancalomicrobium</i>	17	13	0	4	0
<i>Soonwooa</i>	0	0	13	17	0

<i>Intestinibacter</i>	63	38	39	46	6
<i>Trichococcus</i>	0	0	4	4	0
<i>Desulforhopalus</i>	0	2	3	0	0
<i>Paracoccus</i>	89	78	71	29	7
<i>Bradyrhizobium</i>	5	3	6	1	0
<i>Sphingomonas</i>	314	215	109	51	19
<i>Isosphaera</i>	26	14	13	4	1
<i>Propionibacterium</i>	60	46	30	11	37
<i>Prolixibacter</i>	5	5	0	0	0
<i>Desulfovibrio</i>	143	99	43	55	6
<i>Porphyrobacter</i>	8	1	1	0	0
<i>Gemmata</i>	82	160	135	474	3
<i>Aquabacterium</i>	199	413	11	16	5
<i>Xenophilus</i>	3	3	1	2	0
<i>Pseudoflavonifractor</i>	1	5	0	4	0
<i>Shinella</i>	126	135	56	53	4
<i>Papillibacter</i>	0	1	2	0	0
<i>Phyllobacterium</i>	4	0	1	2	0
<i>Leptospira</i>	0	1	3	2	0
<i>Microbacterium</i>	83	45	89	19	0
<i>Dethiobacter</i>	11	20	26	25	0
<i>Thermanaeromonas</i>	0	2	4	15	0
<i>Desulfitispora</i>	3	0	2	1	0
<i>Anaerosinus</i>	18	24	4	3	1
<i>Denitrobacter</i>	11	1	0	1	0
<i>Phycisphaera</i>	7	2	1	4	0
<i>Blastomonas</i>	4	3	1	1	0
<i>Eoetvoesia</i>	0	0	4	0	0
<i>Chelatococcus</i>	6	1	6	1	0
<i>Anaerophaga</i>	2	2	3	5	0
<i>Actinomyces</i>	11	14	12	8	0
<i>Rhodobacter</i>	138	143	101	46	7
<i>Oligella</i>	0	0	1	2	0
<i>Propionispora</i>	283	366	19	48	6
<i>Opitutus</i>	2	6	0	0	0
<i>Schlesneria</i>	2	0	2	0	0
<i>Bdellovibrio</i>	0	2	1	0	0
<i>Nevskia</i>	0	0	0	0	3
<i>Prevotella</i>	0	0	0	0	8
<i>Methylobacterium</i>	2	3	1	0	5
<i>Kluyvera</i>	0	1	1	0	46
<i>Pseudoxanthobacter</i>	0	2	0	2	0
<i>Legionella</i>	3	1	1	0	0
<i>Gordonibacter</i>	14	10	8	8	0
<i>Enterobacter</i>	99	133	125	174	69765

<i>Pelobacter</i>	2	6	2	0	0
<i>Oligotropha</i>	103	33	73	24	8
<i>Xanthobacter</i>	25	22	17	5	0
<i>Blastococcus</i>	2	0	2	5	0
<i>Tetrasphaera</i>	31	24	22	32	0
<i>Pantoea</i>	2	0	2	2	1
<i>Roseburia</i>	3	5	3	1	0
<i>Fretibacterium</i>	1	4	5	1	0
<i>Corynebacterium</i>	2	4	6	1	6
<i>Caldilinea</i>	0	1	2	0	0
<i>Terriglobus</i>	0	0	0	0	12
<i>Lactivibrio</i>	210	202	201	219	11
<i>Thermomonas</i>	112	135	45	41	6
<i>Flavobacterium</i>	137	72	410	379	9
<i>Acetobacter</i>	2	2	3	3	1000
<i>Sphingoterrabacterium</i>	0	0	0	0	3
<i>Oscillospira</i>	56	69	34	58	0
<i>Rhodopseudomonas</i>	4	2	6	1	0
<i>Saccharibacter</i>	18	25	2	1	1
<i>Desulforegula</i>	18	25	24	26	0
<i>Pandoraea</i>	1	1	1	1	2
<i>Synergistes</i>	1218	1226	2136	2184	52
<i>Ralstonia</i>	29	35	9	12	23
<i>Thermovenabulum</i>	0	3	0	0	0
<i>Chlorobium</i>	207	9449	1636	3590	90
<i>Rhodococcus</i>	26	23	209	5	5
<i>Janthinobacterium</i>	49	123	10	6	3
<i>Alishewanella</i>	5	1	1	0	0
<i>Pseudoramibacter</i>	137	141	2	4	2
<i>Hyphomicrobium</i>	54	35	41	18	2
<i>Delftia</i>	2	8	0	1	1
<i>Lentisphaera</i>	91	126	14	4	0
<i>Anaerotruncus</i>	13	77	5	13	0
<i>Anaeromusa</i>	4	3	3	1	0
<i>Anaerorhabdus</i>	0	2	0	6	0
<i>Veillonella</i>	5	5	17	35	0
<i>Aquaspirillum</i>	0	1	7	8	0
<i>Acinetobacter</i>	2149	1367	246	252	51
<i>Idiomarina</i>	2	0	5	3	0
<i>Pelosinus</i>	922	1363	296	456	30
<i>Martellella</i>	107	72	33	28	0
<i>Dehalobacterium</i>	2	1	2	6	1
<i>Saccharofermentans</i>	5	15	9	17	0
<i>Microbulbifer</i>	0	0	0	0	3
<i>Desulfobulbus</i>	20	23	10	16	1

<i>Soehngenia</i>	1	0	5	1	0
<i>Singulisphaera</i>	5	2	1	3	0
<i>Pseudorhodobacter</i>	0	0	2	1	0
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	7	10	9	9	0
<i>Thermus</i>	3	0	2	4	0
<i>Phascolarctobacterium</i>	42	45	22	34	0
<i>Bifidobacterium</i>	11	14	3	5	1
<i>Rhodoplanes</i>	28	25	14	10	3
<i>Gottschalkia</i>	7	3	2	2	0
<i>Laribacter</i>	3	4	1	1	0
<i>Aminivibrio</i>	1	0	4	2	0
<i>Sebaldella</i>	1	1	1	8	0
<i>Flexibacter</i>	1	1	1	0	0
<i>Azovibrio</i>	0	0	2	2	0
<i>Lactobacillus</i>	23	29	36	56	13930
<i>Hylemonella</i>	38	14	103	38	2
<i>Methylosinus</i>	24	11	18	10	0
<i>Streptomyces</i>	4	2	13	22	1
<i>Mycobacterium</i>	126	97	75	52	107
<i>Nakamurella</i>	11	5	3	1	0
<i>Pedosphaera</i>	77	39	27	25	4
<i>Prosthecomicrobium</i>	15	4	7	2	0
<i>Erythrobacter</i>	129	83	57	25	3
<i>Leifsonia</i>	3	5	5	2	0
<i>Tetracoccus</i>	13	5	9	7	0
<i>Aminobacterium</i>	297	330	388	434	11
<i>Rudaea</i>	2	0	1	1	0
<i>Flavihumibacter</i>	9	10	1	2	0
<i>Achromobacter</i>	21	17	23	6	0
<i>Natronoflexus</i>	2	4	0	0	0
<i>Sporobacter</i>	1	9	10	3	0
<i>Bacteroides</i>	1390	1346	1135	1302	31
<i>Syntrophobacter</i>	108	25	66	45	0
<i>Rhodomicrobium</i>	4	4	3	2	0
<i>Eubacterium</i>	1092	928	755	718	40
<i>Luteolibacter</i>	12	9	14	11	0
<i>Prosthecobacter</i>	9	5	1	2	0
<i>Enterococcus</i>	0	3	2	0	0
<i>Bulleidia</i>	2	11	0	0	1
<i>Rhodoferax</i>	5	15	5	10	1
<i>Acidiphilium</i>	0	0	0	0	6
<i>Caulobacter</i>	10	3	8	2	9
<i>Plasticicumulans</i>	1	2	5	2	1
<i>Pusillimonas</i>	6	2	2	2	0
<i>Rhodopirellula</i>	2	1	5	6	0

<i>Smithella</i>	401	70	383	413	7
<i>Camelimonas</i>	23	12	9	0	1
<i>Sphingobium</i>	131	86	19	11	5
<i>Dysgonomonas</i>	49	42	14	15	1
<i>Gloeobacter</i>	3	8	5	0	8
<i>Oligosphaera</i>	0	0	1	2	0
<i>Dyella</i>	0	0	0	0	8
<i>Magnetococcus</i>	7	2	2	2	0
<i>Gloeothece</i>	1	2	0	0	0
<i>Acidaminococcus</i>	4	8	0	1	0
<i>Anaerococcus</i>	0	0	0	0	8
<i>Neisseria</i>	7	12	8	15	0
<i>Comamonas</i>	119	147	96	146	6
<i>Williamsia</i>	8	5	5	3	0
<i>Aquamicrobium</i>	2	0	0	1	0
<i>Akkermansia</i>	3	3	0	1	0
<i>Chthoniobacter</i>	458	381	821	898	25
<i>Geobacter</i>	65	32	67	78	2
<i>Streptococcus</i>	44	73	8	33	51
<i>Klebsiella</i>	0	0	2	0	8
<i>Bellilinea</i>	6013	1447	8373	4288	125
<i>Nitrosovibrio</i>	38	60	13	9	1
<i>Diaphorobacter</i>	14	12	30	3	0
<i>Coxiella</i>	5	11	4	2	0
<i>Exiguobacterium</i>	1	0	83	0	1
<i>Desulfosarcina</i>	8	5	8	4	0
<i>Propioniceella</i>	1	1	0	1	0
<i>Alkaliphilus</i>	3	4	3	1	1
<i>Candidatus Competibacter</i>	1	2	1	3	0
<i>Desulfobacterium</i>	0	0	2	5	0
<i>Dokdonella</i>	0	2	0	1	3
<i>Thermaerobacter</i>	7	1	5	10	2
<i>Cloacibacillus</i>	260	339	172	194	8
<i>Moorella</i>	13	8	10	17	0
<i>Bacillus</i>	2663	1539	730	1241	79
<i>Microvirgula</i>	11	33	1	0	0
<i>Succinispira</i>	1	6	1	1	0
<i>Verrucomicrobium</i>	40	30	36	104	8
<i>Candidatus Gortzia</i>	24	28	10	12	0
<i>Faecalibacterium</i>	6	10	3	5	0
<i>Brevundimonas</i>	65	63	1993	51	25
<i>Pseudaminobacter</i>	2	1	0	0	0
<i>Rickettsiella</i>	1	1	0	1	0
<i>Longilinea</i>	41	66	1466	1857	26
<i>Ignavibacterium</i>	1026	311	1205	977	32

<i>Aneurinibacillus</i>	1	2	0	0	1
<i>Rhodopila</i>	0	0	0	0	7
<i>Candidatus Babela</i>	9	83	17	81	2
<i>Defluviicoccus</i>	66	24	30	14	5
<i>Acidovorax</i>	309	559	143	201	22
<i>Sporacetigenium</i>	1	2	2	1	0
<i>Thiorhodospira</i>	10	24	0	0	0
<i>Caldanaerobacter</i>	4	3	1	3	1
<i>Mesorhizobium</i>	57	26	22	6	3
<i>Cuspidothrix</i>	2	1	0	0	0
<i>Rhizobium</i>	621	583	321	261	12
<i>Thiomonas</i>	87	126	17	26	2
<i>Rickettsia</i>	47	43	13	8	3
<i>Peptoclostridium</i>	17	11	10	10	0
<i>Butyricicoccus</i>	1	2	0	1	0
<i>Edaphobacter</i>	0	0	0	0	3
<i>Methylocystis</i>	9	6	6	3	1
<i>Caldisericum</i>	255	104	442	310	11
<i>Brachymonas</i>	135	151	68	75	3
<i>Alcaligenes</i>	4	0	2	2	1
<i>Dechloromonas</i>	8	10	3	3	0
<i>Levilinea</i>	1	0	5	3	0
<i>Escherichia</i>	5	7	14	1	592
<i>Geoalkalibacter</i>	3	0	6	2	0
<i>Uruburuella</i>	7	10	17	31	2
<i>Actinobaculum</i>	7	2	4	10	0
<i>Hyphomonas</i>	2	2	3	1	0
<i>Methyloversatilis</i>	6	0	2	1	0
<i>Syntrophus</i>	100	20	149	173	5
<i>Paludibacter</i>	528	1142	363	447	18
<i>Corallococcus</i>	3	3	167	3	3
<i>Thermosinus</i>	5	2	0	0	0
<i>Ectothiorhodospira</i>	2	1	2	4	0
<i>Agrobacterium</i>	114	75	28	10	2
<i>Erysipelothrix</i>	7	11	9	19	0
<i>Desulfovirga</i>	6	0	1	2	0
<i>Pasteuria</i>	98	73	61	79	0
<i>Acetanaerobacterium</i>	8	22	12	8	1
<i>Ottowia</i>	71	77	43	53	2
<i>Beijerinckia</i>	4	4	4	4	3
<i>Iamia</i>	3	1	0	0	0
<i>Wolinella</i>	2	0	0	4	0
<i>Xanthomonas</i>	3	3	0	1	0
<i>Phenylobacterium</i>	1033	1588	242	41	32
<i>Curvibacter</i>	4	4	1	1	0

<i>Azonexus</i>	0	2	2	2	0
<i>Thermincola</i>	4	1	10	2	2
<i>Neorhizobium</i>	24	29	3	2	0
<i>Desulfuromonas</i>	59	2	72	36	3
<i>Brevifollis</i>	16	27	0	0	0
<i>Neochlamydia</i>	64	61	34	49	2
<i>Thauera</i>	3	4	4	6	0
<i>Lactococcus</i>	0	0	0	0	16
<i>Aeromonas</i>	3	4	1	2	0
<i>Kribbia</i>	29	15	11	7	0
<i>Phaselicystis</i>	3	1	0	2	0
<i>Cytophaga</i>	3	11	5	10	0
<i>Rhodocyclus</i>	86	149	46	65	4

**APÊNDICE C – Classificação das sequências obtidas com o primer 349f/534r para o domínio *Archaea*.**

**Tabela 9.** Classificação e quantidade de sequências obtidas a nível de filo do domínio *Archaea*.

FILO	NÚMERO DE READS				Inóculo
	30d s/ ME	30d c/ ME	90d s/ ME	90d c/ ME	
<i>Euryarchaeota</i>	63996	49482	54347	61067	14871
<i>Thaumarchaeota</i>	10	9	2	2	0

**Tabela 10.** Classificação e quantidade de sequências obtidas a nível de gênero do domínio *Archaea*.

GÊNERO	NÚMERO DE READS				Inóculo
	30d s/ ME	30d c/ ME	90d s/ ME	90d c/ ME	
<i>Candidatus Methanogranum</i>	5	2	2	7	0
<i>Thermogymnomonas</i>	21	17	14	42	1
<i>Methanolobus</i>	5	0	6	12	65
<i>Methanosphaera</i>	347	234	96	80	5
<i>Methanosarcina</i>	875	540	642	133	93
<i>Methanolinea</i>	665	194	437	209	43
<i>Methanosaeta</i>	40322	34725	34114	46176	9363
<i>Methanosphaerula</i>	103	50	92	82	0
<i>Methanomassiliicoccus</i>	930	172	819	646	8
<i>Methanobacterium</i>	12805	8196	13735	10272	4310
<i>Methanoregula</i>	94	46	47	45	0
<i>Methanobrevibacter</i>	4748	3322	3567	2860	609
<i>Methanomethylovorans</i>	138	330	123	185	13
<i>Methanospirillum</i>	2928	1652	650	313	361
<i>Candidatus Nitrososphaera</i>	10	9	2	2	0
<i>Methanoculleus</i>	10	2	3	5	0