

**RAFLES ANSELMO DA MATA**

**TRATAMENTO TERMOFÍLICO DE EFLUENTES DE FÁBRICA DE POLPA  
CELULÓSICA KRAFT BRANQUEADA COM LODO AERÓBIO GRANULAR**

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

Orientador: Claudio Mudadu Silva

Coorientador: Ismarley Lage H. Morais

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

Mata, Rafles Anselmo da, 1988-

M425t Tratamento termofílico de efluentes de fábrica de polpa  
2020 celulósica kraft branqueada com lodo aeróbio granular / Rafles  
Anselmo da Mata. – Viçosa, MG, 2020.

90 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Claudio Mudadu Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Resíduos industriais. 2. Lodo de fábrica de papel.  
3. Águas residuais - Purificação. 4. *Meiothermus*. 5. *Thermus*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia  
Civil. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil.  
II. Título.

CDD 22. ed. 628.51

**RAFLES ANSELMO DA MATA**

**TRATAMENTO TERMOFÍLICO DE EFLUENTES DE FÁBRICA DE POLPA  
CELULÓSICA KRAFT BRANQUEADA COM LODO AERÓBIO GRANULAR**

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


APROVADA: 21 de agosto de 2020.

Assentimento:



---

Rafles Anselmo da Mata  
Autor



---

Claudio Mudadu Silva  
Orientador

**A Adriana Bertoldo da Mata e à  
Yasmin Bertoldo da Mata.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas.

A minha mãe, Dona Maria, pela dedicação, carinho e apoio incondicional. Aos meus irmãos e irmãs, por apoiarem minhas decisões.

A Adriana, pelo companheirismo, paciência, e por estar sempre ao meu lado, apoiando-me incondicionalmente.

A universidade Federal de Viçosa-UFV, que pelo programa de pós-graduação da Engenharia Civil, me permitiu a oportunidade de vivenciar esta experiência, juntamente agradeço à SIF e à CENIBRA, pelo fornecimento de materiais essenciais para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador professor Claudio Mudadu, pelo apoio, orientação e pela amizade. A professora Ana Augusta pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores da pós-graduação do Departamento de Engenharia Civil e do Departamento de Floresta pelos ensinamentos e dedicação, aos secretários pelo apoio sempre que necessário.

Aos colegas e amigos do LCP em geral, e em especial à turma do meio ambiente.

A todos que de alguma forma, fez parte dessa trajetória, o meu sincero obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Código de Financiamento 001.

## **BIOGRAFIA**

RAFLES ANSELMO DA MATA, filho de Maria da Conceição Gonçalves Mata e Anselmo Florentino da Mata, nasceu no dia 10 de janeiro de 1988, em Santa Maria de Itabira, Minas Gerais- Brasil.

Em fevereiro de 2007, iniciou o curso de graduação em Engenharia Ambiental na Fundação Comunitária de Ensino Superior de Itabira- FUNCESI, Diplomando-se em 2011, Engenheiro Ambiental.

Em março de 2014, iniciou o curso de pós-graduação em Engenharia Civil, na área de Saneamento ambiental, na Universidade Federal de Viçosa- UFV, desenvolvendo trabalhos na linha de tratamento de águas residuárias industriais, e obteve o título de Magister Scientiae, em fevereiro de 2016.

Em março de 2016, iniciou o curso de pós-graduação em Engenharia Civil, na área de Saneamento ambiental, na Universidade Federal de Viçosa- UFV, desenvolvendo trabalhos na linha de tratamento de águas residuárias industriais, e obteve o título de Doctor Scientiae, em agosto de 2020.

## RESUMO

DA MATA, Raffles Anselmo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2020. **Tratamento termofílico de efluentes de fábrica de polpa celulósica kraft branqueada com lodo aeróbio granular.** Orientador: Cláudio Mudadu Silva. Coorientador: Ismarley Lage Horta Morais.

O tratamento termofílico de efluentes com o lodo aeróbio granular se destaca com grandes vantagens aos processos convencionais por via biológica no tratamento de efluentes orgânicos industriais por favorecer uma elevada taxa de degradação, ser mais resistentes às cargas orgânicas ou substâncias tóxicas e por operar a altas temperaturas evitando a necessidade de resfriamento prévio. As vantagens supracitadas impulsionam as pesquisas no tocante a compreensão e na aplicação do lodo aeróbio granular termofílico. A presente tese apresenta um amplo estudo sobre o lodo granular aeróbio em condições termofílicas para o tratamento de efluente de fábrica de polpa celulósica kraft. É apresentado no Capítulo 1 uma revisão bibliográfica que ressalta o uso incipiente da tecnologia, mas com elevado potencial de aplicação em escala industrial, especialmente para indústrias que geram efluentes com temperaturas elevadas. O Capítulo 2 apresenta um estudo sobre a utilização do lodo aeróbio granular termofílico para tratar efluentes de uma indústria brasileira de produção de polpa celulósica branqueada. Comparou-se a eficiência de remoção da demanda química de oxigênio (DQO) de um sistema de lodo granular a outro com lodo floculento operados em temperaturas de 35 °C (mesofílico) a 55 °C (termofílico) e estudou-se a estabilidade e manutenção das características físicas dos grânulos operando a 55 °C. Também verificou-se a influência da aplicação de cálcio (100 e 200 mg. L<sup>-1</sup>) na estabilidade do lodo granular. O lodo aeróbio granular apresentou eficiência de remoção de DQO superior a 60% nas temperaturas de 35 °C e 55 °C, similar aos resultados para o lodo floculento. Os grânulos aeróbios mantidos nos reatores apresentaram diâmetro médio variando de 4 a 8 mm e uma velocidade de sedimentação de 40 m.h<sup>-1</sup>, ou seja, 8 vezes maior que a sedimentação do lodo floculento. A aplicação de 100 mg.L<sup>-1</sup> de cálcio contribuiu positivamente para tornar os grânulos mais coesos e aumentar sua resistência mecânica. O Capítulo 3 apresenta uma caracterização do microbioma do lodo aeróbio granular termofílico, onde se constatou que as substâncias poliméricas extracelulares (SPE) foram produzidas em proporções satisfatórias para a agregação do lodo microbiano, principalmente nas condições de maior

temperatura (55 °C) quando há um maior estresse. Os tratamentos a 55 °C apresentaram uma menor diversidade microbiana, reflexo da dominância de alguns grupos observada em 55 °C. O perfil de filos e gêneros foram agrupados pelas diferentes temperaturas, sendo que os filos Planctomycetes, Proteobacteria, Armatimonadetes, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Caldiserica, Chlamydiae e Acidobacteria foram os mais abundantes. E os gêneros Thermus e Meiothermus se destacaram a 55 °C.

**Palavras-chave:** Resíduos Industriais. Tratamento Termofílico. Lodo Aeróbio Granular Termofílico. Microbiota do Lodo Granular. Meiothermus. Thermus.

## ABSTRACT

DA MATA, Raffles Anselmo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2020. **Effluent treatment of a bleached kraft pulp mill with thermophilic granular aerobic sludge.** Adviser: Cláudio Mudadu Silva. Co-adviser: Ismarley Lage Horta Morais.

The aerobic granular sludge thermophilic effluent treatment stands out with great advantages over conventional biological processes for the treatment of industrial organic effluents, such as the higher rate of degradation and resistance to organic or toxic substances added to the avoidance of a prior cooling system. These advantages are the main driving forces for a better understanding of the thermophilic granular aerobic sludge for the treatment of industrial effluents. This thesis presents a thorough study on thermophilic aerobic granular sludge for the treatment of kraft pulp mill effluent. Chapter 1 presents an up-to-date literature review on this topic. Chapter 2 shows the results of a lab-scale research carried out on the use of thermophilic granular aerobic sludge to treat effluents from a Brazilian bleached kraft pulp mill. The efficiency of chemical oxygen demand (COD) removal of a granular sludge system was compared to a flocculent sludge system operated at temperatures from 35 °C (mesophilic) to 55 °C (thermophilic). The stability and maintenance physical properties of the granules operating at 55 °C and the influence of the application of calcium (100 and 200 mg. L<sup>-1</sup>) on the stability of the granular sludge were studied. The aerobic granular sludge showed COD removal efficiency greater than 60% at temperatures of 35 °C and 55 °C, similar to the results for the flocculent sludge. The aerobic granules kept in the reactors showed an average diameter ranging from 4 to 8 mm and a settling velocity of 40 m.h<sup>-1</sup>, i.e., 8 times greater than the settling velocity of the flocculent sludge. The application of 100 mg. L<sup>-1</sup> of calcium contributed positively to make the granules more cohesive and increase their mechanical resistance. Chapter 3 presents a characterization of the thermophilic granular aerobic sludge microbiom. Extracellular polymeric substances (SPE) were produced in satisfactory proportions for the aggregation of the microbial sludge, mainly in the conditions of higher temperature (55 °C) when there is a greater biomass stress. Treatments at 55 °C showed a smaller microbial diversity, reflecting the dominance of some groups observed at 55 °C. The phylum and genera profile were grouped by the temperature differences, the phylum Planctomycetes, Proteobacteria, Armatimonadetes, Firmicutes,

Gemmatimonadetes, Caldiserica, Chlamydiae and Acidobacteria were the most abundant, and the Thermus and Meiothermus genera stood out at 55 °C.

**Keywords:** Industrial Wastes. Thermophilic Treatment. Thermophilic Granular Sludge. Granular Sludge Microbiota. Meiothermus. Thermus.

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL .....	12
REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO 1.....	19
TRATAMENTO TERMOFÍLICO COM LODO AERÓBIO GRANULAR: REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	19
RESUMO.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 Tratamento biológico termofílico .....	21
2.1 Sistemas termofílicos aplicados ao tratamento de efluentes de fábrica de polpa celulósica .....	24
3 Tratamento com lodo Granular Aeróbio.....	27
4 Efeitos da temperatura no tratamento por lodo aeróbio granular .....	37
6 CONSIDERAÇÕES .....	38
REFERENCIAS.....	39
CAPÍTULO 2.....	43
Characterization of Thermophilic Aerobic Granular Sludge for the Treatment of Bleached Kraft Pulp Mill Effluent.....	43
ABSTRACT.....	43
1. INTRODUCTION .....	43
2. EXPERIMENTAL.....	46
2.1 Materials .....	46
2.2 Experimental design .....	46
2.2.1 Experimental apparatus.....	47
2.3 Methods .....	48
2.3.1 Physicochemical characterization.....	48
2.3.2 Analysis of the physical characteristics of aerobic granular sludge.....	49
2.4 Statistical Test.....	50
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	50
3.1 Characterization of Bleached Kraft Pulp Mill Effluent .....	50
3.2 Organic matter removal efficiency .....	50
3.3 Physical characteristics of granular aerobic sludge at different temperatures.....	52
CONCLUSIONS .....	58
ACKNOWLEDGMENTS .....	58
REFERENCES .....	59

CAPÍTULO 3.....	63
MICROBIOTA OF THERMOPHILIC GRANULAR AEROBIC SLUDGE FOR TREATMENT OF KRAFT PULP MILLS EFFLUENT .....	63
ABSTRACT.....	63
1 INTRODUCTION .....	64
2 MATERIAL AND METHODS .....	65
2.1 Experimental plan .....	65
2.3 Physical, chemical and microbiological analysis .....	65
2.3.1 Physicochemical characterization .....	65
2.3.2 Quantification of extracellular polymeric substances-EPSs .....	66
2.3.3 Morphological characterization .....	67
2.3.4 Microbiological characterization of thermophilic aerobic granules .....	67
2.3.5 Statistical test .....	68
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	68
3.1 Performance of the reactors .....	68
3.2 Determination of extracellular polymeric substances (EPSs).....	71
3.3 Sludge morphology .....	74
3.4- Diversity of prokaryotes in biological sludge .....	77
4- CONCLUSIONS .....	83
ACKNOWLEDGMENTS .....	84
REFERENCES .....	85
II. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES GERAIS .....	89

## I. INTRODUÇÃO GERAL

A disponibilidade de água em qualidade suficiente para atender aos requisitos de seus variados usos tem sido afetada constantemente pelas atividades antrópicas, sobretudo pelas elevadas demandas industriais. Diferentes processos industriais podem provocar alterações das propriedades e características das águas, tornando-as inadequadas para suas funções primordiais como a manutenção da biodiversidade aquática (EUROPEAN COMMISSION, 2015; COLLA et al., 2017).

Os efluentes de diferentes processos industriais podem conferir, dentre outros aspectos, uma elevada carga orgânica que requer considerável atenção, devido ao seu potencial poluidor. Assim, tem-se buscado cada vez mais a otimização dos processos de tratamento como também a redução da geração de efluentes, facilitando a manutenção da qualidade ambiental e o cumprimento das normas ambientais vigentes.

O setor de produção de polpa celulósica se destaca pela busca constante de otimização da redução do consumo de água e respectiva geração de efluentes. Em um período de aproximadamente 40 anos o setor apresentou uma redução do consumo de 200 m<sup>3</sup> para 25 m<sup>3</sup> de água por tonelada de polpa celulósica produzida nas fábricas modernas (SAADIA e ASHFAQ, 2010; RAMEZANI et al., 2011).

A iniciativa contribui para a minimização do impacto ambiental tanto pela redução de consumo de água quanto pela redução da geração de efluentes tipicamente orgânicos, gerados a partir do processamento da madeira. Os efluentes possuem entre os seus constituintes, sólidos suspensos, incluindo partículas de casca, fibras, pigmentos e sujeira; compostos orgânicos coloidais dissolvidos como hemiceluloses, açúcares, compostos de lignina, álcoois, terebintina e cor elevada advinda, sobretudo de compostos de lignina, além de componentes inorgânicos dissolvidos (SAADIA e ASHFAQ, 2010; Da MATA et al., 2019).

As concentrações típicas de DQO e DBO dos efluentes gerados em fabricas de polpa celulósica kraft giram em torno de 1400 e 500 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, apresentando um fator de biodegradabilidade favorável ao uso de mecanismos de degradação biológica (CALVO et al., 2007; LAGE et al., 2018; Da MATA, et al., 2019).

O tratamento de águas residuárias orgânicas é comumente realizado por via biológica. Os processos de tratamento biológico podem ser anaeróbios, aeróbios ou facultativos. O principal requisito para a adoção de processos biológicos se baseia no grau de biodegradabilidade dos compostos presentes nos efluentes.

Embora a utilização de processos de tratamento biológico de efluentes da indústria de polpa celulósica seja intensa, o setor enfrenta dificuldades devido à alta variação das características e condições dos efluentes gerados. O efluente pode sofrer variações em razão da própria configuração do processo industrial, da qualidade da madeira processada e/ou de eventuais problemas operacionais. O tratamento biológico de efluentes mostra-se sensível às variações abruptas de cargas orgânicas causando efeitos prejudiciais à comunidade microbiológica e resultando em um déficit de eficiência do tratamento (ZITA; HERMANSSON, 1994; SALVADÓ et al., 2001; AB HALIM et al., 2016; HAO et al., 2016).

Uma característica intrínseca do processo de produção de polpa celulósica é a geração de efluentes com elevada temperatura. Destaca-se que os processos biológicos mais utilizados na atualidade por fabricas de polpa celulósica são na maioria por lodos ativados e operam em faixa de temperatura em torno de 35°C (mesofílica) (THOMPSON et al., 2005). Isso implica na necessidade de implementação de processos de resfriamento dos efluentes, que incrementam os custos de implantação e operação das estações de tratamento, devido ao alto consumo energético demandado na etapa de resfriamento.

Os sistemas convencionais de tratamento de efluentes por lodos ativados operam com o uso do lodo aeróbio em forma de flocos (floculento) e apresentam uma alta remoção das cargas orgânicas (ZHANG; XU; ZHU, 2017; KARLIKANOVAITE-BALIKCI; YAGCI, 2019), porém demandam grandes estruturas de decantação, em função da baixa velocidade de sedimentação do lodo. O lodo floculento também apresenta uma sensibilidade às variações de cargas orgânicas que chegam no reator, principalmente aos compostos que apresentam toxicidade (RINTALA; LEPIST, 1992; SINGH; SRIVASTAVA; JAGADISH, 2017).

Na busca de melhorias do processo de tratamento de efluentes orgânicos industriais, o lodo granular aeróbio tem se apresentado como uma boa alternativa aos processos convencionais de lodo floculento utilizados. O lodo aeróbio granular é um recurso biotecnológico ambiental que tem se mostrado promissor ao tratamento das águas residuárias, mas, ainda, com baixa aplicação em escala real (EBRAHIMI; GABUS, 2010; CORSINO et al., 2016; PRONK et al., 2017; MORAIS et al., 2018).

Esforços têm sido empenhados para a compreensão e otimização desta tecnologia. O lodo aeróbio granular tem gerado uma gama de novas possibilidades para o tratamento de águas residuárias, justificado por sua alta taxa de retenção de biomassa combinada com uma maior resistência às variações de cargas dos efluentes, o que gera maior robustez aos

sistemas de tratamento (ADAV et al., 2008; CHEN, Y. et al., 2016; WANG.; LOOSDRECHT; SAIKALY, 2017; MORAIS et al., 2018).

Avanços têm ocorrido para a manutenção e estabilidade dos grânulos que, outrora, foi evidenciada como um fator limitante para o uso do lodo aeróbio granular em larga escala (ZHANG et al., 2013; HAO et al., 2016; MORAIS et al., 2018). Uma maior força estrutural dos grânulos aeróbios possibilitaria o seu emprego em sistemas de tratamento com elevadas temperaturas, uma vez que, problemas de estabilidade foram relatados na utilização do lodo aeróbio granular em condições termofílicas (HAKIM et al., 2015).

Há, ainda, uma lacuna no conhecimento do uso do lodo aeróbio granular para o tratamento de águas residuárias a temperaturas elevadas. A compreensão do processo e a sua otimização podem contribuir para uma ampla utilização da tecnologia na indústria, especialmente nos setores geradores de efluentes com altas temperaturas como as observadas na produção de polpa celulósica kraft.

Os sistemas de tratamento termofílicos foram estudados em primeira instância em reatores anaeróbios (LAPARA; ALLEMAN, 1999; SREEKANTH et al., 2009; ABBÀ et al., 2017). Assim como as primeiras evidências de lodo granular foram observadas nos sistemas de tratamento anaeróbio de águas residuárias.

O tratamento de efluentes em condições termofílicas se destaca pela elevada taxa de degradação dos compostos orgânicos, e pela menor geração de lodo (ADAV; LEE; et al., 2008; HAKIM et al., 2016; IBRAHIM et al., 2017), que somado às vantagens do lodo aeróbio granular podem resultar em uma promissora combinação a ser aplicada em diversas indústrias que geram efluentes com elevada temperatura (GUVEN, 2004; QUESNEL, 2005; ZITOMER et al., 2007).

Pouco ainda se conhece a respeito dessa associação do lodo aeróbio granular em condições termofílicas, apesar de alguns estudos terem buscado elucidar determinados fatores e parâmetros de operação do sistema com o lodo aeróbio granular (LAGE et al., 2018). Ainda existem muitas incertezas para que a tecnologia se torne segura e confiável, principalmente quando utilizada em reatores com temperaturas acima de 55°C (YU; TAY; FANG, 2001; BEUN; LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2002; ZITOMER et al., 2007).

As hipóteses testadas ao longo deste trabalho, apoia-se que o uso do lodo granular termofílico pode conferir vantagens ao sistema de tratamento de efluentes nas indústrias de polpa celulósica e de outras cadeias produtivas que geram efluentes orgânicos com elevadas temperaturas. As possibilidades de se utilizar uma estrutura mais compacta tanto para o reator aeróbio quanto para a unidade de clarificação e uma maior robustez às cargas de

choque tornam essa opção especialmente atrativa para a indústria. Nesse sentido, infere-se que o lodo granular aeróbio, aclimatado em elevada temperatura, pode ser mantido, e o tratamento com lodo granular aeróbio termofílico é capaz de manter uma alta taxa de remoção de matéria orgânica. Assim, acredita-se que na adaptação do lodo às condições termofílicas, diferentes grupos de microrganismos respondem similarmente às funções de degradação de compostos orgânicos como na condição mesofílica.

A presente pesquisa busca avaliar o uso do lodo aeróbio granular termofílico no tratamento de efluentes de fábrica de polpa celulósica branqueada e investigar a eficiência de remoção de DQO, a estabilidade mecânica do lodo granular, a capacidade de manutenção dos grânulos em elevada temperatura, bem como investigar o microbioma que compõem o lodo granular termofílico. Para tanto, a presente tese foi subdividida em três capítulos.

O Capítulo 1 trata de uma revisão bibliográfica atualizada com uma abordagem teórica sobre os avanços dos sistemas de tratamento termofílicos com o uso do lodo granular aeróbio e os desafios ainda existentes.

O Capítulo 2 apresenta uma avaliação das características físicas do lodo aeróbio granular termofílico. O estudo foi realizado utilizando-se reatores em bateladas sequenciais em escala laboratorial com efluentes de uma indústria brasileira de produção de polpa celulósica Kraft.

O Capítulo 3 apresenta uma investigação sobre o microbioma do lodo aeróbio granular termofílico e a comparação da predominância de microrganismos no lodo granular aeróbio mesofílico e termofílico.

## REFERÊNCIAS

- AB Halim, M. H; Anuar, A. N; Jamal; N. S. A. Azmi; S. I., Z; Bob, M. M. (2016) “Influence of high temperature on the performance of aerobic granular sludge in biological treatment of wastewater”. *Journal of Environmental Management*. v. 184, p. 271–280. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.09.079
- Abbà, A; Collivignarelli, M. C; Manenti, S; Pedrazzani, R; Todeschini, S; Bertanza, G. (2017) “Rheology and Microbiology of Sludge from a Thermophilic Aerobic Membrane Reactor”. *Journal of Chemistry*, v. 2017. p. 19. DOI: 10.1155/2017/8764510
- Adav, S. S; Lee, D; Show, K-Y; Tay, J. H.(2008) “Aerobic granular sludge: Recent advances”. *Biotechnology Advances* . v. 26, n. 5, p. 411–423. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.05.002
- Beun, J. J.; Loosdrecht, M C M Van; Heijnen, J. J.(2002) “Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor”. *Water Research*. v. 36. p. 702–712. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00250-0
- Calvo, L.; Gilarranz, M. A.; Casas, J. A.; Mohedano, A. F.; Rodríguez, J. J. (2006) “

- Detoxification of Kraft pulp ECF bleaching effluents by catalytic hydrotreatment". *Water Research*. v. 41, p. 915–923. DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.018
- Chen, Y; Pan, X; Li, J; Lee, D-J. (2016) "Strengthening aerobic granule by salt precipitation". *Bioresource Technology*. v. 218, p. 1253–1256. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.06.111
- Colla, V; Matino, I; Branca, T. A; Fornai, B; Romaniello, L; Rosito, F. (2017) "Efficient use of water resources in the steel industry". *Water (Switzerland)*. v. 9, n. 11, p. 1–15. DOI: 10.3390/w9110874
- Corsino, S. F; Campo, R; Di Bella, G; Torregrossa, M; Viviani, G. (2016) "Study of aerobic granular sludge stability in a continuous-flow membrane bioreactor ". *Bioresource Technology*. v. 200, p. 1055–1059. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.065
- Da Mata, R. A.; Silva, C. M.; Zanuncio, J. C.; Materazzi, L. B. (2019) "Effects of electrostatic precipitators ash leachate (EPAL) from recovery boilers on the biological treatment of effluent of kraft pulp mills ". *Science of the Total Environment*. v. 659. p. 905-911 . DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.413
- Ebrahimi, S.; Gabus, S.; Rohrbach-Brandt, E.; Hosseini, M.; Rossi, P.; Maillard, J.; Holliger, C. (2010) "Performance and microbial community composition dynamics of aerobic granular sludge from sequencing batch bubble column reactors operated at 20 ° C , 30 ° C , and 35 ° C ". *Applied Microbiology Thecnology*. v.87 .p. 1555–1568. DOI: 10.1007/s00253-010-2621-4
- European Commission. (2015) "Guidance document on the application of water balances for supporting the implementation of the WFD". [S.l.]: [s.n.].
- Guen, Engin. (2004) "Granulation in thermophilic aerobic wastewater treatment". *Dissertations (1962 - 2010)* Access via Proquest Digital Dissertations. AAI3153999. <https://epublications.marquette.edu/dissertations/AAI3153999>. 2004.
- Hakim, M.; Anuar, A. N.; Jamal, N. S. A.; Azmi, S. I.; Ujang, Z.; Bob, M. (2016) "Influence of high temperature on the performance of aerobic granular sludge in biological treatment of wastewater". *Journal of Environmental Management*. v. 184, p. 271–280. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.09.079.
- Hao, W.; Li, Y.; Lv, J.; Chen, L.; Zhu, J. (2016) "The biological effect of metal ions on the granulation of aerobic granular activated sludge". *Journal of Environmental Sciences*. v. 44, p. 252–259. DOI: 10.1016/j.jes.2015.10.031
- Ibrahim, S.; Wahab, N. A.; Anuar, A. N.; Bob, M. (2017) "Parameter Optimisation of Aerobic Granular Sludge at High Temperature Using Response Surface Methodology". *IJECE*. v. 7, n. 3, p. 1522–1529. DOI: 10.11591/ijece.v7i3.pp1522-1529
- Karlikanovaite-Balikeci, A.; Yagci, N. (2019) "Determination and evaluation of kinetic parameters of activated sludge biomass from a sludge reduction system treating real sewage by respirometry testing". *Journal of Environmental Management*. v. 240, n. March, p. 303–310. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.03.131
- Lapara, T. M.; Alleman, J. E. (1999) "Thermophilic aerobic biological wastewater treatment". *Water Research*. v. 33, n. 4, p. 895–908. DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00282-6
- Lin, Y.; Ngoc, N.; Huang, S. (2016) "International Biodeterioration & Biodegradation Metaproteomic analysis of the microbial community present in a thermophilic swine manure digester to allow functional characterization : A case study". *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 115, p. 64–73. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.06.013
- Lv, Y.; Wan, C.; Lee, D.; Liu, X.; Tay, J-H. (2014) "Microbial communities of aerobic granules : Granulation mechanisms". *Bioresource Technology*. v. 169, p. 344–351. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.07.005
- Morais, I. L. H.; Silva, C. M.; Zanuncio, J. C.; Zanuncio, A. J. V. (2018) "Structural

- Stabilization of Granular Sludge by Addition of Calcium Ions into Aerobic Bioreactors”. *Bioreseources*. v. 13, n. 1, p. 176–191. DOI: 10.15376/biores.13.1.176-191
- Pronk, M.; Neu, T. R.; Van Loosdrecht, M. C. M.; Lin, Y. M. (2017) “The acid soluble extracellular polymeric substance of aerobic granular sludge dominated by *Deffluviococcus* sp” . *Water Research*. v. 122, p. 148–158. DOI: 10.1016/j.watres.2017.05.068
- Quartaroli, L.; Silva, L. C. F.; Silva, C. M.; Lima, H. S.; Paula, S. O.; Oliveira, V. M.; Silva, M. C. S.; Kasuya, M. C. M.; Sousa, M. P.; Torres, A. P. R.; Souza, R. S.; Bassin, J. P.; Silva, C. C. (2017) “Ammonium Removal From High-Salinity Oilfield-Produced Water: Assessing the Microbial Community Dynamics at Increasing Salt Concentrations”. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 101. p. 859-870. DOI: 10.1007/s00253-016-7902-0.
- Quesnel, D.; Nakhla, G. (2005) “Characterization and treatability of aerobic bacterial thermophilically treated wastewater by a conventional activated sludge and granular activated carbon”. *Water Research*. v. 39, p. 677–687. DOI: 10.1016/j.watres.2004.11.010
- Ramezani, O.; Kermanian, H.; Razmpour, Z.; Rahmaninia, M. (2011) “Water consumption reduction strategies in recycled paper production companies in Iran”. *CEUR Workshop Proceedings*. v. 1152, p. 865–877. DOI: 10.13140/2.1.4573.0242
- Rintala, J.; Lepistö, R.; Chand, S. (1992) “Toxicity of Kraft Bleaching Effluents on Thermophilic and Mesophilic VFA Methanation”. *Bioresource Technology*. v. 42, p. 17–26. DOI: 10.1016/0960-8524(92)90083-A
- Saadia, A.; Ashfaq, A. (2010) “ Environmental management in pulp and paper industry”. *Journal of Industrial Pollution Control*. v. 26, n. 1, p. 71–77. Disponível em :<<http://www.icontrolpollution.com/articles/environmental-management-in-pulp-and-paper-industry-.php?aid=45211>>
- Salvadó, H.; Mas, M.; Menéndez, S.; Garcia, P. (2001) “Effects of Shock Loads of Salt on Protozoan Communities of Activated Sludge”. *Acta Protozoologica*. p. 177–185.. Disponível em: <[https://pdfs.semanticscholar.org/19b0/423821727f0bfda13202176378d51b90006.pdf?\\_ga=2.207715159.433334320.1594695095-1958986741.1586374214](https://pdfs.semanticscholar.org/19b0/423821727f0bfda13202176378d51b90006.pdf?_ga=2.207715159.433334320.1594695095-1958986741.1586374214)>
- Singh, P.; Srivastava, N.; Jagadish, R. (2017) “Toxicity Removal of Pulp and Paper Mill Effluent by Employing Chemicals”. *IRA-International Journal of Applied Sciences*. v. 6, n. 2, p. 62. DOI: 10.21013/jas.v6.n2.p5
- Sreekanth, D.; Sirvaramkrishna, D.; Himabindu, V.; Anjaneyulu, Y. (2009) “ Thermophilic treatment of bulk drug pharmaceutical industrial wastewaters by using hybrid up flow anaerobic sludge blanket reactor “. *Bioresource Technology*. v. 100, n. 9, p. 2534–2539. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.028
- Suvilampi, J.; Rintala, J. (2004) “Thermophilic aerobic wastewater treatment , process performance , biomass characteristics , and effluent quality”. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*.v. 2 p. 35-51. DOI: 10.1023/B:RESB.0000022959.46025.9a
- Thompson, G.; Swain, J.; Kay, M.; Foster, C. F. (2005) “ The treatment of pulp and paper mill effluent: a review ”. *Bioresources Technology*. v. 77. p. 275-286. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00060-2
- Wang, Z.; Loosdrecht, Van Mark, C. M.; Saikaly, P. E. (2017) “Gradual adaptation to salt and dissolved oxygen : Strategies to minimize adverse effect of salinity on aerobic granular sludge ”. *Water Research*. v. 124, p. 702–712. DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.026
- Yu, H. Q. M.; Tay, J H; Fang, H. H. P. (2001) “The roles of calcium in sludge granulation during uasb reactor start-up”. *Water Research*. v. 35, n. 4, p. 1052–1060. DOI:

10.1016/s0043-1354(00)00345-6

- Zhang, B.; Xu, X.; Zhu, L.(2017) “Structure and function of the microbial consortia of activated sludge in typical municipal wastewater treatment plants in winter”. *Scientific Reports*. n. September, p. 1–11. DOI: 10.1038/s41598-017-17743-x
- Zita, A.; Hermansson, M. (1994) “Effects of Ionic Strength on Bacterial Adhesion and Stability of Flocs in a Wastewater Activated Sludge System”. *Appl Environ Microbiol.* v. 60, n. 9, p. 3041–3048. 1994. PMID: 16349365
- Zitomer, D. H.; Duran, M.; Albert, R.; Guven, E. (2007) “Thermophilic aerobic granular biomass for enhanced settleability”. *Water Research*. v. 41, p. 819–825. DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.037

## CAPÍTULO 1

### **Tratamento Termofílico Com Lodo Aeróbio Granular: Revisão Bibliográfica**

#### **RESUMO**

O uso de lodo biológico aeróbio granular termofílico para o tratamento de águas residuárias é uma tecnologia ambiental recém desenvolvida e a sua utilização vem gradativamente evoluindo. Por se tratar de uma técnica recente, existem vários problemas a serem enfrentados, destacando-se a qualidade estrutural do lodo granular, que ainda esconde uma série de incógnitas e que limita o seu uso. Diversos estudos têm buscado conhecer e desvendar as novas possibilidades que abrangem a tecnologia do lodo aeróbio granular. Somado a isso, o conhecimento do comportamento e desempenho do lodo aeróbio granular em condições termofílicas abrem novas oportunidades para o tratamento de águas residuárias, principalmente das indústrias que geram efluentes com elevadas temperaturas, como é o caso das fábricas de polpa celulósica. O presente trabalho tem como objetivo realizar um levantamento bibliográfico buscando identificar os últimos avanços do uso da tecnologia de lodo granular termofílico e ressaltar sua aplicação no tratamento de efluentes de fábricas de polpa celulósica e papel. A revisão bibliográfica permitiu observar que o tratamento biológico termofílico, apresenta divergências conclusivas. Tais variações advém de estudos onde se investigou variadas características de substratos em diferentes tipos de reatores. No entanto, destaca-se a necessidade de trazer a luz novas contribuições acerca do tratamento biológico termofílico, justificado pelas vantagens apontadas e pelos avanços ocorridos ao longo do tempo, que em determinadas situações responde a algumas deficiências destacadas no passado. Os avanços alcançados para a manutenção das características físicas do lodo granular, como a maior estabilidade da estrutura física dos grânulos aeróbios, em condições mesofílicas, abre a possibilidade de serem incorporados às condições termofílicas. A associação do lodo aeróbio granular fisicamente estável com a elevada temperatura pode resultar em um contexto vantajoso para uso no tratamento de efluentes de indústrias que geram efluentes de elevada temperatura, como ocorre nas fábricas de polpa celulósica.

**Palavras-chave:** lodo granular, tratamento termofílico, lodo aeróbio granular termofílico

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento biológico termofílico tem sido uma tecnologia de interesse crescente em comparação com sua contraparte mesofílica devido à capacidade de tratar águas residuais em elevadas temperaturas, eliminando a necessidade de resfriamento e outras vantagens como taxas rápidas de biodegradação, menor rendimento de lodo e boa estabilidade do processo (SUVILAMPI; RINTALA, 2004).

Por este motivo, o tratamento termofílico passou a ser estudado vislumbrando a economia de energia em sistema de resfriamento (SUVILAMPI; RINTALA, 2004; IBRAHIM et al., 2017). Por outro lado, o emprego de sistema de aquecimento, quando necessária, se torna uma desvantagem devido ao elevado consumo de energia, dessa forma apresenta-se como uma alternativa atraente para as indústrias que geram águas residuais quentes, particularmente na indústria de celulose e papel, que tem buscado formas de aprimoramento dos sistemas de tratamento visando a minimização do consumo de água, por meio da função de reuso (SUVILAMPI; RINTALA, 2004).

A crescente busca de otimização dos sistemas de tratamento bem como a redução da geração de resíduos, tem visto o processo de granulação aeróbia como uma boa alternativa em relação aos sistemas convencionais de lodos ativados, uma aposta à menor geração de subprodutos, e ainda manter uma satisfatória eficiência global da remoção de carga orgânica.

O sistema de tratamento termofílico apresenta suas principais características bastantes distintas dos sistemas de lodos ativados convencional, haja vista que a elevação de temperatura favorece a taxa de degradação dos compostos orgânicos, e isso faz com que haja uma microbiota adaptada às condições do sistema termofílico (LAPARA; ALLEMAN, 1999). Estas características se diferem ainda mais do sistema convencional, quando empregado a tecnologia dos grânulos aeróbios aos tratamentos termofílicos.

A formação do lodo granular geralmente é condicionada a partir do lodo flocoento, dentre outros fatores destaca-se a operacionalização, que consiste em alterar os parâmetros operacionais convencionais a ocasionar situação de estresse à microbiota, impulsionando assim o aumento da produção de substâncias poliméricas extracelulares, que por sua vez favorece a granulação. Outros fatores podem ser citados, como alternância da relação Alimento/Microrganismos (A/M), ou ainda, a aplicação de uma maior taxa de aeração provocando maior força de cisalhamento, e também com a redução gradativa do tempo de sedimentação, que favorece, sobretudo, a seleção dos grânulos já formados. O processo de

granulação geralmente ocorre a partir do inóculo em condições mesofílicas, e na sequência, submetido às variações que se deseja avaliar.

A proposta do presente capítulo situa-se na revisão bibliográfica sobre o tratamento termofílico, e o uso do lodo granular aeróbio em elevadas temperaturas, e sua utilização para o tratamento de efluentes de fábricas polpa celulósica.

## **2 Tratamento biológico termofílico**

Efluentes recalcitrantes com elevada carga orgânica, gerados em elevadas temperaturas apresentam potencial para tratamento termofílico (QUARMBY E FOSTER, 1995). Neste contexto se enquadra a indústria de produção de polpa celulósica kraft.

Diversos pesquisadores têm investigado o tratamento biológico em condições termofílicas (Del BORGHI et al. 1999; KIM, et al., 2012; DUTTA et al., 2014; YU, et al., 2014), para diferentes tipos de efluentes. No entanto, há uma grande variação nos resultados e nas conclusões acerca desse tratamento, geralmente associadas às condições testadas, ao tipo de efluente ou ainda à configuração dos reatores utilizados. Contudo, destaca-se uma divergência nas recomendações de uso do sistema termofílico em comparação ao sistema mesofílico.

Os tratamentos biológicos termofílicos podem ser aplicados sob duas vertentes, anaeróbios e aeróbios. O tratamento biológico termofílico anaeróbio é às vezes considerado por alguns pesquisadores como sistemas instáveis, e imprecisos ( Van LIER et al., 1999; GUERRERO, et al 1999). E o tratamento biológico aeróbio termofílico trás ainda mais preocupações, devido a baixa capacidade de saturação de oxigênio em elevada temperatura.

O tratamento anaeróbio termofílico é uma tecnologia em que sua eficiência é dependente de fatores relacionados à microbiologia e dos processos bioquímicos que estes realizam no reator, que implicam na manutenção da estabilidade dos agregados biológicos, e inicialmente no uso de inóculo capaz de suportar e se desenvolver em elevadas temperaturas.

Em condições termofílicas as cadeias poliméricas das biomoléculas que compõem os resíduos orgânicos são quebradas mais facilmente, dando origem a monômeros degradáveis,

fato que leva a uma maior eficiência na produção de biogás, e conseqüentemente na remoção global de carga orgânica (Del BORGHI et al. 1999).

Nesse sentido, entende-se que a digestão anaeróbia em condições termofílicas apresenta como vantagens a redução do tempo de retenção total necessário para a digestão, e a possibilidade de uma operação com elevadas cargas orgânicas, no entanto, a temperatura elevada leva ao aumento da produção de ácidos orgânicos, e a acumulação microbiana nos reatores anaeróbios, podendo gerar instabilidade no funcionamento do reator, necessitando portanto de maior atenção no controle operacional (WEVER et al., 2007). Tais motivos levam alguns pesquisadores a considerar a operação dos sistemas de tratamento anaeróbio em condições mesofílicas mais estável do que em condições termofílicas (KIM, et al., 2012).

Sabe-se que as características físicas, químicas e biológicas dos sistemas de tratamento termofílicos são bastantes diferentes dos sistemas convencionais conhecidos. Os principais microrganismos que possuem aplicação nos sistemas de tratamentos termofílicos anaeróbios são pertencentes aos domínios das Archaea e Bactérias, que apresentam desenvolvimento ótimo em faixa de temperatura de 45 °C e 80 °C, mas sobrevivem em ampla faixa de temperatura (LAPARA; ALLEMAN, 1999; MADIGAN et al. 2004).

Valendo-se dos efeitos provocados pela temperatura nos sistemas anaeróbios, muitos estudos têm buscado compreender melhor essa relação, e beneficiar-se das vantagens, ou ainda salientar as limitações. A elevação da temperatura, para condições termofílicas aumenta a velocidade de crescimento da população microbiana, em especial das metanogênicas, e acelera as reações bioquímicas envolvidas no processo, embora o sistema termofílico apresentar menor diversidade, apresenta maior eficiência na degradação da matéria orgânica (DUTTA et al., 2014; YU, et al., 2014), requerendo, dessa forma, menor tempo de inicialização, podendo conduzir a uma melhor qualidade do efluente e a alta taxa de conversão refletida no rendimento de biogás (ZHANG, et al., 2012; PAP et al., 2015; VRIEZE, DE et al., 2016; GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2017).

Outra característica citada positivamente é que o processo termofílicos permite o uso de reatores de menores e mais baixos tempos de retenção hidráulicas, mas com eficiência satisfatória, possibilitando tratar maior volume de efluentes em menor tempo (VRIEZE, DE et al., 2016; GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2017).

Os estudos demostram de forma geral que os reatores anaeróbios apresentam satisfatória eficiência de conversão dos compostos orgânicos em biogás, no entanto a utilização do sistema apresenta limitações, que inclui dentre eles o efeito da temperatura, que acima do ponto ótimo causa efeitos adversos à microbiota do sistema, como a redução

da atividade microbiana (HWU; LETTINGA, 1997; NIELSEN; ANGELIDAKI, 2008; KHEMKHAO et al., 2012; JEONG et al., 2014).

Dentro do campo das limitações e ou dificuldades de uso do sistema anaeróbio termofílico, tem-se que as dificuldades de se controlar e otimizar o sistema, ainda o processo implica em casos específicos, no uso de caras tecnologias para manutenção da temperatura de digestão, um maior grau de monitoramento e mais cuidados na operação. Assim, salienta-se que é importante não haver variação de temperatura no sistema termofílico ao longo da digestão, a fim de evitar prejuízos no metabolismo dos microrganismos (ZHANG et al., 2012; VRIEZE, DE et al., 2016; DUNCAN et al., 2017; GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2017).

Além do controle de temperatura, a variação de pH também é mostrada como um interferente que pode prejudicar o processo biológico termofílico, sendo que, em condições termofílicas o pH tende a ser mais elevado devido à solubilidade mais baixa de CO<sub>2</sub>, embora a elevação do pH contribua para o desenvolvimento das populações metanogênicas em sistemas de digestão anaeróbia, um valor ótimo situa-se entre 6,5 e 8 (VAN LIER; SANZ MARTIN, 1996; DUTTA et al., 2014; YU, D. et al., 2014).

Sobre o tratamento biológico anaeróbio termofílico é possível observar que existem vantagens como a maior produção de biogás e a elevada taxa de degradação que impulsionam a busca pela tecnologia, porém há também desvantagens, como operacionalização mais tecnicada para controle de temperatura, que limitam o uso da tecnologia em escala industrial, e que os diferentes trabalhos conduzidos chegaram a respostas que as vezes se complementam ou ainda que divergem totalmente, no entanto, isso acontece devido as diferentes características que são avaliadas em cada estudo.

Do ponto de vista do tratamento aeróbio termofílico, outros aspectos são levantados, contudo, as vantagens descritas se acercam ainda da elevada taxa de degradação dos compostos orgânicos (LAPARA; ALLEMAN, 1999). Outra vantagem ainda apresentada, é a menor quantidade de lodo em excesso em processos termofílicos quanto comparados a mesofílicos, devido aos altos requerimentos energéticos para a manutenção e altos coeficientes de decaimento microbiano para termófilos (LAPARA; ALLEMAN, 1999; JAHREN et al., 2002).

De acordo com LAPARA e ALLEMAN (1999), o tratamento termofílico se torna interessante, para indústrias onde o efluente é gerado em elevada temperatura e também para efluentes com altas cargas, os quais contém energia necessária para facilitar a operação sem a necessidade de aquecimento. Estudos realizados sobre tratamento termofílico aeróbio realizados para tratar efluente de fábricas de polpa celulósica e papel tiveram resultados

variáveis, sendo portanto, a limitação comum a perda de lodo no efluente tratado. Porém, Vogellar et al. (2002) não considera crítica a turbidez ocasionada pelo arraste de lodo frequentemente descrito. No entanto o uso do tratamento aeróbio termofílico para este tipo de efluente (indústria de celulose e papel) ainda é pouco estudado, ou seja, há ainda pouca informação disponível sobre a aplicabilidade desse sistema (TRIPATHI e ALLEN, 1999).

Outra situação descrita por Barr et al. (1996), é que a temperatura de operação de sistemas de tratamento aeróbio como o de lodos ativados pode afetar a atividade microbiana, a taxa de transferência de oxigênio e as características de sedimentação do lodo, podendo influenciar na eficiência global do processo.

Dessa forma é notável que, embora o sistema de tratamento termofílico anaeróbio e aeróbio demonstrem importantes características positivas, é necessário otimizações para que as tecnologias a serem utilizadas em grandes escalas possam assegurar maior confiabilidade, como por exemplo, buscar formas de aumentar a estabilidade e sedimentabilidade do lodo aeróbio termofílico, para facilitar a clarificação do efluente tratado. Nesse sentido, destaca-se a opção de tratamento aeróbio termofílico com uso do lodo granular.

## **2.1 Sistemas termofílicos aplicados ao tratamento de efluentes de fábrica de polpa celulósica**

Fabricas de polpa celulósica kraft branqueada, são unidade geradoras de efluentes de elevada temperatura, contudo, não é comum o emprego de sistemas de tratamento em termofílico em escala real. O sistema predominante para uso de tratamento dos efluentes gerados nessas indústrias, são em sua maioria sistema mesofílico aeróbio.

Diferentes possibilidades de tratamento dos efluentes gerados na fábrica de polpa celulósica em elevada temperatura têm sido investigadas, algumas pesquisas trazem a subdivisão dos efluentes setoriais e outras atuam com a perspectivas do tratamento de “fim de tubo”, ou seja, tratamento do efluente geral resultante de todos os processos desempenhados dentro da unidade fabril (LAPARA; ALLEMAN, 1999; REDDY et al., 2005).

Uma das primeiras investigações sobre o tratamento termofílico de efluentes de fábrica de polpa celulósica e papel ocorreu ainda a cerca de 1953, onde foi realizada uma comparação com o sistema mesofílico, e verificou-se que as respostas aos tratamentos foram

similares, mas a má agregação da massa microbiana foi um fator limitante para o sistema termofílico (LAPARA; ALLEMAN, 1999).

Em outros casos foram reportados com sucesso o tratamento do efluente da fábrica de polpa celulósica kraft que durante três meses oscilou a temperatura entre 50°C a 53°C, e neste período nenhum efeito adverso da temperatura foi encontrado (AMANN; GLO; NEEF, 1997; BARR; TAYLOR; DUFF, 1996).

Um estudo similar mostrou que o tratamento de efluentes de fábrica de polpa celulósica e papel foi investigado em diferentes temperaturas (de 26 a 52°C), no qual a eficiência de remoção de carga orgânica (DBO) foi reduzindo quanto mais a temperatura era acrescida, assim obteve-se remoção máxima de DBO de 80,5% (37 ° C) a um mínimo de 37% (52 ° C) (CARPENTER et al. 1968; apud NANCHARAI AH; REDDY, 2018).

Outro estudo que investigou a aplicação do tratamento termofílico apenas para o condensado contaminado, que é gerado na condensação de vapores ricos em metanol e enxofre, resultante da combustão do licor negro, encontrou resultados de remoção de carga orgânica compatível com o sistema mesofílico, neste estudo foi utilizado um biorreator de leito móvel a 65°C (REDDY et al., 2005).

O uso do sistema de tratamento termofílico para o efluente de fábrica de polpa celulósica, no geral reporta eficiências similares aos sistemas mesofílicos, principalmente para sistemas aeróbios (RINTALA; LEPIST, 1992; BARR et al., 1996).

Outros sistemas de tratamento em condições termofílicas também já foram estudados, como o uso dos biorreatores a membrana (Tabela 1) para tratar efluentes oriundos das fábricas de polpa celulósica e papel.

**Tabela 1-** Tratamento termofílico aplicado à efluentes de fábrica de polpa celulósica e papel, via biorreator a membrana

Efluentes	Temp. (°C)	TDH (d)	OD mg. L-1	Remoção de DQO (%)	Referência
Newsprint White-water Kraft Evaporator Condensate	55	0,33	-	58	Ragona and Hall (1998)
Kraft Evaporator Condensate	60	0,5	-	-	Berube and Hall (1999)
Kraft Evaporator Condensate	60	0,5	-	95	Berube and Hall (2000a)
Kraft Evaporator Condensate	60	18	-	93	Berube and Hall (20001a) Lopetegui and Sancho (2003)
Pulp and paper UASB	55	1,67	-	70	Dias et al.(2005)
Kraft Pulp Condensate	55	0.79	>2	87	de Sousa et al. (2011)
Paper mill White-water	55	0,42	2,8	94	Simstich et al. (2012)
Paper mill deinking	50	1,04	3	84	Qu et al. (2012)
TMP Pressate	51	1,1	-	88	

**Fonte:** Adaptado de DUNCAN et al. (2017).

Os efluentes setoriais tratados em elevadas temperaturas acima de 50°C, apresentaram eficiência de remoção acima de 70%, com exceção do item 01 (Tabela 1), que apresentou remoção de DQO de apenas 58%. Os demais estudos evidenciam promissoras aplicações dos sistemas termofílicos, com resultados satisfatórios para a remoção de DQO, e com tempo de detenção hidráulica relativamente curtos.

Na Tabela 1, são mostradas diversas características positivas e negativas para o sistema de tratamento termofílico, em geral o principal fator que impede a aplicação da tecnologia em grande escala apoia-se fortemente na instabilidade dos agregados. Uma alternativa que vem sendo estudada para contornar a instabilidade dos agregados é o processo de granulação do lodo nos sistemas aeróbios, e nesse sentido tem-se reportado diferentes técnicas que auxiliam a conseguir a manutenção da estabilidade dos grânulos formados (LIU; TAY, 2006; LIU, et al., 2012; HAO et al., 2016; HAMZA et al., 2018; MORAIS et al., 2018). No entanto, o uso do lodo granular em condições termofílicas ainda é pouco reportado, recentemente o lodo granular termofílico foi utilizado por Filho et al. (2019), para o tratamento de efluentes da fábrica de polpa celulósica, com satisfatória eficiência de remoção de carga orgânica, similar ao sistema mesofílico.

O uso do lodo granular aeróbio termofílico, representa uma ótima oportunidade de redução de custos se utilizados no tratamento de efluentes de fábricas que geram efluentes de elevada temperatura, como as fabricas de polpa celulósica kraft. No entanto, o baixo volume de informações descreve a necessidade de novas investigações a luz dos parâmetros

operacionais e técnicas a serem empregadas nos sistemas em escala real, com maior segurança e confiabilidade.

### **3 Tratamento com lodo Granular Aeróbio**

O lodo granular aeróbio é composto por um denso aglomerado de organismos simbióticos, com bom desempenho de atividade biológica e excelente eficiência de transferência de massa (HAKIM et al., 2015).

Os estudos sobre a tecnologia de lodo aeróbio granular têm demonstrado promissoras oportunidades acerca do tratamento de águas residuárias, apontando significativas eficiência de remoção da carga orgânica, incluindo cargas orgânicas recalcitrantes e ainda uma maior robustez a componentes tóxicos presentes nos efluentes (ADAV et al., 2008; CHEN et al., 2016; ZHANG; HU; LEE, 2016).

Nos últimos anos, pesquisadores tem buscado com mais interesses a respeito do desenvolvimento de lodo ativado granular, de rápida velocidade de sedimentação, tendo em vista que a eficiência de um processo de lodo ativado depende muito da qualidade do lodo formado no reator, que precisa além de apresentar satisfatória remoção da carga orgânica e apresentar boa sedimentabilidade, o que contribui para a clarificação do efluente final.

Quando comparado com o convencional lodo ativado flocofúlo, o lodo granulado apresenta uma estrutura compacta, forte e coeso, e também possui alta velocidade de sedimentação e boa capacidade de retenção de biomassa (ZHENG et al., 2005; CHEN et al., 2016).

A tecnologia de lodo aeróbio granular, ainda é incipiente e há muito o que se conhecer deste processo. Os primeiros estudos sobre essa tecnologia demonstram que os grânulos aeróbios formados pareciam ter uma estabilidade relativamente baixa em comparação com grânulos anaeróbios (MORGENROTH et al., 1997).

Com a finalidade de aumentar a estabilidade do lodo aeróbio granular, vários estudos buscaram identificar os aspectos que mais influenciam o desenvolvimento de lodo granular aeróbio, dos quais citam a taxa de carga orgânica, a força de cisalhamento e a característica do substrato (ADAV, et al., 2009; MORAIS et al., 2018).

A aparente fraca estabilidade dos grânulos aeróbios limita sua aplicação no campo do tratamento de águas residuais, e torna a operação do reator não confiável e difícil. No

sentido de otimizar e ampliar as possibilidades de uso desta tecnologia, foram desenvolvidos esforços para criar estratégias para melhorar a estabilidade dos grânulos aeróbios (LIU; YANG; TAY, 2004; ZHENG, et al., 2006).

O lodo granular tem sido amplamente estudado, devido sua boa eficiência na remoção de carga orgânica e nutrientes, também pelo fato de proporcionar baixa taxa de produção de excesso de lodo. Grande parte dos estudos sobre lodo granular investigaram principalmente o uso do lodo granular aeróbio em condições mesofílicas, temperatura ambiental, utilizando principalmente escala de bancadas em reator por batelada sequencial (RBS) (WHANG; PARK, 2001, MOSQUERA-CORRAL et al., 2005; ADAV, et al., 2008).

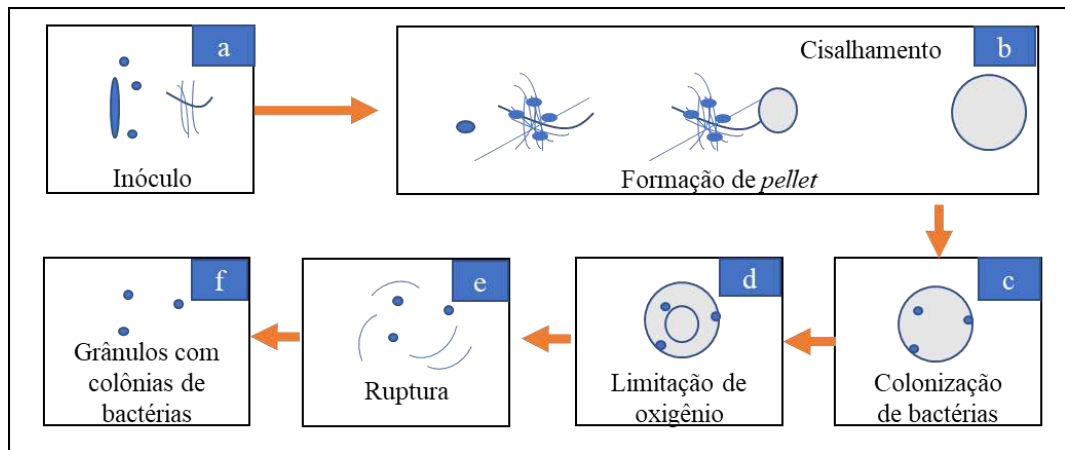
Nesse sentido, os esforços neste campo de atuação incluem investigar e conhecer mais sobre os princípios de formação do lodo granular, bem como os fatores intervenientes, que auxiliam ou dificultam a formação e a estabilidade dos grânulos formados.

O processo de granulação pode ser iniciado pela adsorção e adesão bacteriana em materiais inertes e precipitados inorgânicos, ou ainda, pela adesão de microrganismos a outras células através de interações físico-químicas, as bactérias filamentosas participam deste processo promovendo a estrutura que suportam a adesão de novas células (YU, et al., 2001).

Entende-se que o processo de formação de grânulos aeróbios é um passo crucial para sua aplicabilidade em plantas de tratamento de águas residuais, uma vez que, o lodo ativado convencional pode levar várias semanas para formar os grânulos biológicos. Neste contexto, Zheng et al. (2006), descreve que os grânulos aeróbios podem crescer a partir de diferentes fontes de carbono e são formados sob diferentes cargas orgânicas, mas o estágio de formação dos grânulos aeróbios, é crucial para a eficiência global do sistema de tratamento.

A formação de grânulos aeróbios foi descrita por diversos pesquisadores, que apresentaram grânulos com diâmetro médio que variaram de 0,6mm a 12mm. O tempo de formação apresentado pelos estudos é bastante variável, sendo encontrado a formação com tempos relativamente curtos dentro de uma a três semanas, ou ainda por tempos mais prolongados (MORGENROTH et al., 1997; BEUN; LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2002; LEE, et al., 2010).

Segundo WILÉN et al. (2018), a granulação aeróbia se deve a uma série de interações, bióticas e abióticas, entre os microrganismos e as partículas de lodo, resultando na auto imobilização destes microrganismos em uma matriz de substância polimérica. Um modelo de formação dos grânulos aeróbios foi proposto por Beun et al. (1999), que é mostrado na Figura 1.

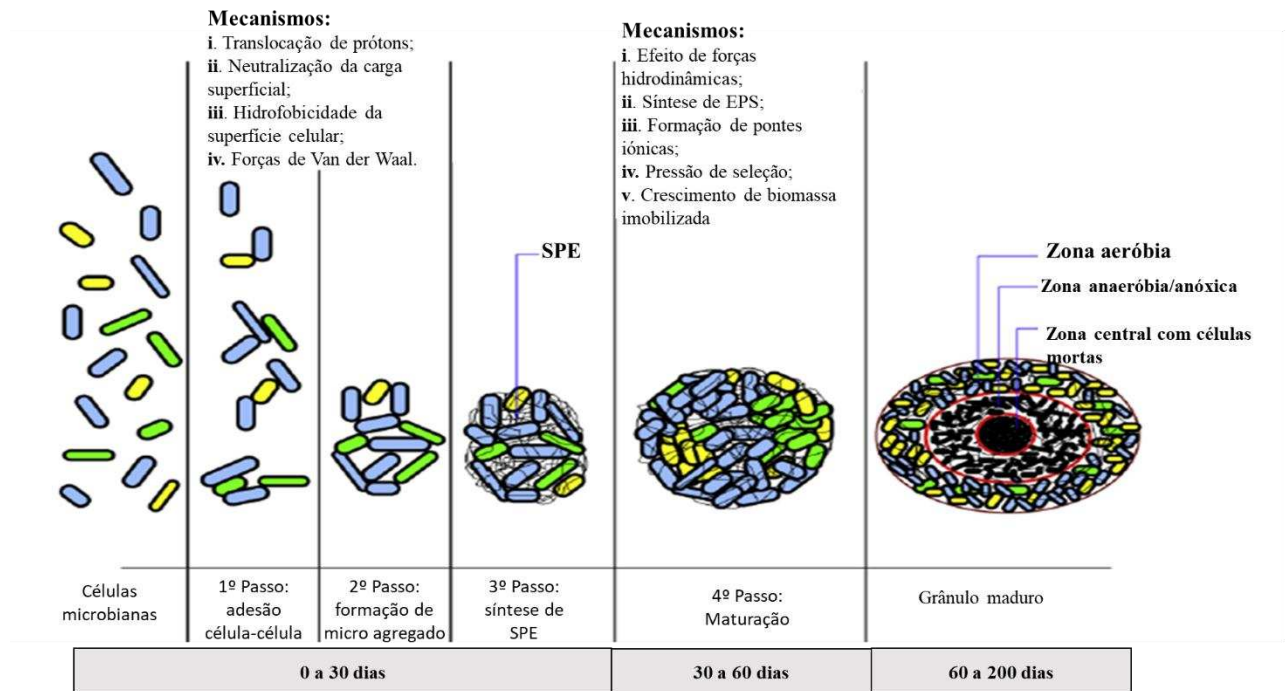
**Figura 1-** Formação dos grânulos aeróbios

**Fonte:** Adaptado de Beun et al. (1999)

A Figura 1 indica que após a inoculação com lodo ativado convencional (Fig1-a), os fungos se tornam os microrganismos dominantes, e formam agregados filamentosos com boa capacidade de sedimentação (pellet) (Fig.1-b), e permanecem no reator. As bactérias, que não possuem essa capacidade, saem do reator juntamente com o efluente tratado. Concomitantemente, devido à força de cisalhamento provocada pela aeração (Fig.1-b), os agregados vão se tornando mais compactos, atingindo o diâmetro de 5 a 6 mm. Estes pellets, parecem funcionar como uma matriz de imobilização de bactérias, que podem crescer aderidas a ela (Fig.1-c). Devido à falta de oxigênio no interior dos agregados, eles se rompem, gerando matrizes de novas colônias de bactérias (Fig. 1-d-e-f). Logo, as novas colônias se tornam agregados densos e com boa capacidade de sedimentação, transformando-se em grânulos maduros e permanecendo no reator (Beun et al., 1999).

Mais recentemente um novo modelo (Figura 2) foi proposto por Sarma, Tay e Chu, (2017).

**Figura 2-** Modelo de formação do lodo granular aeróbio, proposto por Sarma, Tay e Chu (2017)



**Fonte:** Adaptado de Sarma, Tay e Chu (2017).

Segundo os autores, o modelo o apresenta maior complexidade, e descrição dos mecanismos envolvidos em cada etapa, que a partir do inóculo inicia-se a adesão célula-célula (Passo1); a formação de micro agregados (Passo 2), do qual ocorre a síntese de SPE (Passo 3); e a sequente maturação (Passo 4). Entre os passos 1 e 2, é descrito a predominância dos mecanismos que envolvem a translocação de prótons, e a neutralização da carga superficial da partícula, e ligações por forças de Wan der Waal. Entre os passos 3 e 4, há predominância dos mecanismos que contemplam o efeito das forças hidrodinâmicas (cisalhamento), também ocorre a síntese de SPE, a formação de pontes iônicas; há também a ocorrência de pressão de seleção, e o crescimento de biomassa imobilizada, levando o grânulo aeróbio ao estágio de maturação.

A proposta do modelo ilustrado na Figura 1, partiu das premissas antes investigadas por Liu e Tay (2012), que buscou explicar a formação dos grânulos com a proposta da auto imobilização das células, o processo foi descrito em 4 passos, são eles:

1º Passo: contato entre os microrganismos e os microrganismos e demais sólidos em suspensão, que ocorre devido a ação de forças hidrodinâmicas, de difusão, gravitacional, termodinâmicas e a ação da mobilidade celular;

2º Passo: forças de atração, que mantém estável o contato entre os microrganismos e os microrganismos e demais sólidos em suspensão. As forças de atração atuantes podem ser físicas, químicas ou bioquímicas, podendo-se citar: Forças de Van der Waal, atração por cargas opostas, forças termodinâmicas, hidrofobicidade, pontes de hidrogênio, e presença de bactérias filamentosas, que podem unir células individuais;

3º Passo: estabilização do agregado de microrganismos, a partir da produção de polímeros extracelulares (SPE), crescimento do agregado celular e alterações genéticas e metabólicas, induzidas pelo ambiente, que facilitam e fortalecem a interação entre as células, aumentando a densidade do grânulo;

4º Passo: formação de uma estrutura tridimensional, modelada pela ação da força de cisalhamento hidrodinâmico. A forma e o tamanho do agregado dependem da interação entre as células e da força de cisalhamento aplicada.

Alguns estudos demonstraram que certas condições de operação do sistema favorecem o processo de granulação. Dentre os estudos, foi abordado como fatores favorável uma força relativamente alta de cisalhamento, assim também a baixa relação alimento microrganismos, que funciona como um gatilho efetivo para a granulação microbiana de lodo ativado (BEUN; LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2002; TAY; LIU; LIU, 2001).

É desejável que a operação de um reator de lodo aeróbio granular mantenha-se estável e confiável. Portanto, a estabilidade dos grânulos aeróbios é essencial para a operação de reatores de lodo aeróbio granular. Nesse sentido, conhecer e poder controlar os fatores intervenientes no processo de formação e estruturação dos grânulos formados podem alavancar o uso da tecnologia.

A taxa de carga orgânica é um dos parâmetros mais importantes que influenciam na característica dos grânulos aeróbios (MOY et al., 2002; MCSWAIN et al., 2005), de modo que a variação da carga orgânica estimula a secreção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) e melhora a granulação aeróbia (YU, et al., 2001; LIU; TAY, 2006).

Para otimizar a granulação outros procedimentos podem ser realizados, por exemplo, uma melhor granulação pode ser conseguida manipulando-se as condições de operação, como maior taxa de aeração, redução do tempo de sedimentação, entre outras (ADAV, et al., 2008), de modo a ocasionar situação estressante à microbiota, levando ao aumento da produção de SPE, e contribuindo conseqüentemente maior granulação.

Em contrapartida Shi et al. (2013), descreve que um processo de rápida granulação com curto período de estabilização e alta carga orgânica pode resultar em baixa estabilidade,

no entanto, essa condição pode ser variável de acordo com a característica do substrato utilizado.

Outra maneira de conseguir otimizar a granulação e conferir mais resistência mecânica e estabilidade ao grânulo, é o uso de sais inorgânicos como um fator favorável ao processo de granulação (LIU; TAY, 2015; MORAIS, et al, 2016). Isso ocorre porque a carga positiva de cátions divalentes neutraliza a carga negativa da superfície da biomassa microbiana e moléculas de SPE, aumentando assim a granulação. Esses cátions podem estimular a granulação neutralizando as cargas negativas presentes nas superfícies bacterianas, implicando fortes forças atrativas de van der Waals ou funcionando como pontes catiônicas entre bactérias, dado que a maioria dos microrganismos é carregada negativamente ao pH típico dos biorreatores (LIU; YANG; TAY, 2004).

Uma série de fatores podem interferir na formação e qualidade dos grânulos formados a partir de um inóculo de lodo floculento. No Quadro 1 é mostrado uma compilação dos fatores que influenciam a formação do lodo aeróbio granular.

**Quadro 1-** Fatores que influenciam na formação e manutenção dos grânulos aeróbios

Fatores		Descrição	Autores
Substrato	Composição	A formação do grânulo parece não depender do tipo de substrato utilizado	Liu et al. (2005)
	Concentração	Alta carga leva a uma granulação mais rápida e formação de grânulos maiores	Wang et al. (2009); Li et al. (2008)
		Alta carga gera grânulos maiores, porém instáveis	Adav, Lee e Lai (2010); Chen et al. (2008); Moy et al. (2002)
		A formação e estabilidade não é dependente da carga de substrato, e sim de um conjunto de fatores, que devem ser investigados como a relação com a aeração	Devlin et al. (2017);
		Concentrações variando de 0,2 kgDQO.m <sup>3</sup> .dia <sup>-1</sup> até 21,2 kgDQO.m <sup>3</sup> .dia <sup>-1</sup> foram investigadas na formação do grânulo aeróbio, indicando que não há uma relação simples e direta entre a concentração e a formação, e que esta é dependente de diversos outros fatores que precisam ser investigados	He et al. (2016); Adav, Lee e Lai (2010); (Chen et al. (2008); Liu, Moy e Tay (2007); Tay et al. (2004)
Taxa de aeração e força de cisalhamento		Formação de grânulos a partir de taxa acima de 1,2 cm.s <sup>-1</sup>	Tay, Liu e Liu (2001)
		Valores elevados de velocidade de ascensão do ar geram grânulos aeróbios mais compactos, mais densos, mais fortes e menores. Portanto, maior força de cisalhamento maior estabilidade dos grânulos formados	Chen et al. (2007); Tay et al. (2004)
		Lodo granular aeróbio formado com taxa de aeração inferior à 0,1 cm.s <sup>-1</sup>	He et al. (2018) e Li et al. (2019)
		Lodos granular aeróbio formado com velocidades entre 0,1 e 1,0 cm.s <sup>-1</sup>	Gao, Liu e Liang (2013); Pires (2018); He et al. (2016); Awang e Shaaban (2016)
		Não formação ou instabilidade de grânulos aeróbios são relatados para taxas variando entre 0,3 cm.s <sup>-1</sup>	Tay, Liu e Liu (2001); Tay et al. (2004)

(Continuação)

Fatores	Descrição	Autores
Regime Feast-Famine	o regime fome estimula a hidrofobicidade das bactérias, que é uma força indutora para a granulação aeróbia	Tay, Liu e Liu (2001);
	regime de feast inferior a 40% do tempo de aeração promove a formação de grânulos com boa capacidade de sedimentação e boa estabilidade	De Sousa Rollemberg et al. (2018)
	As relações entre o período de feast e de fome (1:7, 1:11 e 1:15) mostraram que a formação de grânulos para as três relações analisadas, e que grânulos maiores e mais uniformes foram observados para a relação 1:11	Li et al. (2019)
Produção de SPE	As substâncias poliméricas extracelulares (SPE) são responsáveis pela estabilidade dos grânulos aeróbios, e são formados principalmente por polissacarídeos (PS) e proteínas (PN)	De Kreuk et al.(2010); Ding et al.(2015); Mcswain et al.(2005)
	SPE é produzido principalmente na fase de feast do reator, após a alimentação, enquanto a Demanda Bioquímica de Oxigênio solúvel é degradada	De Sousa Rollemberg et al. (2018)
	Na fase fome as bactérias utilizam parte do EPS produzido como fonte de carbono e energia na respiração endógena	Corsino et al. (2016)

De acordo as pesquisas relacionadas no Quadro 1, a divergência dos resultados apresentados para cada estudo, sob diferentes condições não permite inferir nenhuma influência direta da concentração ou composição do substrato na formação dos lodos granulares aeróbios, nem mesmo sobre a taxa de aeração, mostrando que estas variáveis não podem ser estudadas de forma isoladas.

Outros fatores devem ser considerados para o processo de granulação aeróbia, que pode de ser influenciado pela comunidade bacteriana presente no lodo ativado. As Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) hidrófilas produzidas pelas bactérias têm uma menor tendência a se anexar a flocos de lodo do que as suas partes hidrofóbicas. Assim, quanto maior a quantidade de SPE hidrofóbicas no lodo, ocorre de forma mais rápida a granulação aeróbia (ADAV, et al., 2008).

Diversos estudos têm buscado conhecer acerca da comunidade microbiana presente no lodo aeróbio granular (MORAIS, et al., 2016; QUARTAROLLI, et al., 2017; FILHO, et al., 2019), tais esforços têm sido realizados para identificar, conhecer e entender sobre os microrganismos que apresentam fatores favoráveis ao processo de granulação e a estabilidade dos grânulos formados.

A composição microbiana dos grânulos variou em função da temperatura em um biotratamento destinado à remoção de fósforo. Bactérias filamentosas *Leptothrix* spp. foram mais abundantes a 20°C, do que a temperaturas mais elevadas (30 ° C e 35 ° C). A remoção de fósforo foi insignificante e houve uma maior abundância de Gammaproteobacteria a 30 e 35°C. A remoção de fósforo a 20°C foi relacionada à presença de Rhodocyclaceae. A presença de Sphingomonadaceae em todas as temperaturas indicou que esta família desempenhou um papel importante na manutenção e estabilidade de grânulos aeróbios (EBRAHIMI; GABUS, 2010).

Nesse contexto, He et al., (2016) descreve que as Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria e Deltaproteobacteria são indicadas como grupos que contribuem para o aumento da resistência mecânica e a formação de lodo aeróbio granular. E que a Chloroflexi excel contribui para a biodegradação, nitrificação e desnitrificação e as Actinobactérias são importantes para remoção de DQO (HE, et al., 2016). As Proteobacteria e Bacteroidetes são comumente as bactérias predominantes e têm a melhor adaptação às mudanças do ambiente (SONG, et al., 2009; ZHAO, et al., 2015).

Uma característica importante do lodo granular é que este devido seu formato geralmente esférico e com diâmetros consideráveis, gera ocorrência de núcleos anaeróbio com Rhodocyclaceae, coberto por uma concha esférica externa com cepas aeróbias e

anaeróbicas (LV, et al., 2014), tais características contribuem para a concomitante remoção de nutrientes e carga orgânica (QUARTAROLI, et al., 2017).

Na Tabela 2 é mostrada as principais famílias e gêneros de bactérias funcionais encontrados nos lodos granulares aeróbios.

**Tabela 2-** Principais bactérias e grupos funcionais no lodo granular aeróbio.

<b>Função</b>	<b>Família</b>	<b>Gênero</b>	<b>Referência</b>
Produção de EPS	Rhodocyclaceae	Thauera	
	Methylobacteriaceae	Meganema	Szabó et al. (2017)
	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	
	Hyphomicrobiaceae	Devosia	Luo et al. (2014)
	Rhodocyclaceae	Zoogloea	Fra-Vázquez et al. (2016)
	Comamonadaceae	Brachymonas	
	Rhodocyclaceae	Rhodocyclus	Adav, Lee e Lai, (2009)
	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrio	Liu et al. (2018)
	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	Amorim et al. (2018)
Nitrificação	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	Fra-Vázquez et al. (2016)
	Nitrosomonadaceae	Nitrosospira	
	Nitrospiraceae	Nitrospira	Szabó et al. (2017)
	Bradyrhizobiaceae	Nitrobacter	
	Brocadiaceae		
Desnitrificação	Xanthomonadaceae	Pseudoxanthomonas	Amorim et al. (2018)
	Methylobacteriaceae	Meganema	
	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	Szabó et al. (2017)
	Rhodocyclaceae	Azoarcus	
	Rhodocyclaceae	Thauera	Zhang et al. (2011)
	Accumulibacter		
	Rhodocyclaceae	Zoogloea	Weissbrodt, Shani e Holliger (2014)
	Thiobacillaceae	Thiobacillus	Xu et al. (2015)
	Rhodobacteraceae	Paracoccus	Wang et al. (2013)
	Hyphomicrobiaceae	Devosia	Luo et al. (2014)
	Xanthomonadaceae	Lysobacter	
	Comamonadaceae	Acidovorax	Weissbrodt et al. (2013)
	Moraxellaceae	Acinetobacter	Wan et al., (2015)
	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Yan et al. (2016)
Comamonadaceae	Comamonas		

**Fonte:** Adaptada (Xia et al., 2018; e de Sousa Rollemberg et al., 2018).

Em complemento, LV et al., (2014) descreve que a formação de grânulos em um reator aeróbio, indicou um aumento na abundância das espécies anaeróbias como a

Flavobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Rhodobacteraceae e Microbacteriaceae, devido à formação do núcleo anaeróbio. Estirpes de *Sphingomonas* sp., *Paracoccus* sp., *Sinorhizobium americanum* e *Flavobacterium* sp. presente no núcleo promoveu a produção de EPS e melhorou a formação de grânulos (WAN, et al., 2015).

#### **4 Efeitos da temperatura no tratamento por lodo aeróbio granular**

O lodo granular passou também a ser atraente nas investigações para tratamento em elevadas temperaturas devido seu bom desempenho e possíveis funcionalidades (ZITOME, et al., 2007; SONG et al., 2009; EBRAHIMI; GABUS, 2010; HAKIM et al., 2015).

Alguns aspectos interessantes corroboram para o uso do lodo aeróbio granular em elevadas temperaturas, como formação de lodo aeróbio de melhor estabilidade. Neste contexto, alguns estudos demonstram grânulos formados a 55°C com diâmetros entre 1 e 7 mm ou com um diâmetro entre 1,2 e 1,9 mm possuíam a resistência à desintegração comparável aos grânulos mesófilos aeróbios (ZITOMER et al., 2007), mostrando que é possível manter as características do lodo, mesmo em temperaturas elevadas, gerando assim novas perspectivas no uso do lodo aeróbio granular termofílico.

Em adição, o efeito da temperatura no processo de granulação foi avaliado em um sistema de reator em batelada para alcançar a nitrificação parcial. Neste estudo verificou-se que os grânulos não apresentaram alterações significativas nas suas características morfológicas com uma temperatura entre 28 e 37 ° C. O diâmetro de mais de 80% dos grânulos foi superior a 6 mm quando a temperatura foi aumentada para 39 ° C, mas a densidade diminuiu de 28 para 19 g.L<sup>-1</sup> e o índice de volume de lodo (SVI) aumentou de 33 para 80 mL.g<sup>-1</sup>. O sistema desestabilizou-se rapidamente e a nitrificação cessou quando a temperatura atingiu 41°C (LÓPEZ-PALAU et al., 2013). Por outro lado, para a remoção de amônia (97,5%) foi observada a 30°C, contra 94,6% e 94,4% a 40°C e 50°C, respectivamente (HAKIM et al., 2015).

No entanto, outros estudos demonstraram que a remoção de fosfato biológico foi maior no sistema a 50°C do que a 30°C e 40°C, com eficiências de 72%, 68% e 67%, respectivamente.

De modo geral, percebe-se que o incremento de temperatura pode ter efeitos negativos no sistema de tratamento por lodo aeróbio granular, no entanto, em determinadas

situações e principalmente quando o lodo aeróbio granular é bem formado, é possível conduzir o tratamento de efluentes a temperaturas elevadas, sendo, portanto, um importante ponto de partida para novos estudos e aplicações da tecnologia para as indústrias como a fábrica de polpa celulósica kraft.

## **6 CONSIDERAÇÕES**

As recentes pesquisas têm demonstrado o crescente interesse em desvendar e aprimorar o uso de técnicas e tecnologias acerca do tratamento biológico, sobretudo, com a utilização do lodo aeróbio granular.

O uso do lodo granular aeróbio em sistema de tratamento ainda é incipiente, principalmente quando se trata do uso do sistema em fluxo contínuo, como atuam as principais tecnologias convencionais de tratamento biológico como o lodo ativado.

O avanço dos estudos sobre os processos de granulação e suas interferências têm auxiliado a alcançar cenários importantes. Diversos estudos mostram que o uso do lodo aeróbio granular pode favorecer uma série de benefícios, mas ainda há poucos sistemas em escala industrial operando, sendo o destaque ao sistema Nereda, que opera em batelada.

O cenário modifica-se ainda mais quando o uso do lodo aeróbio granular é requisitado em condições termofílicas, visando atender a regiões de climas quentes e às fábricas e empreendimentos que geram efluentes de elevada temperatura.

Poucos são os estudos que unem o uso do lodo aeróbio granular com elevadas temperaturas. No entanto, destes os resultados mostram-se promissores.

## REFERENCIAS

- Adav, S. S., Lee, D.-J., Show, K.-Y., And Tay, J.-H. (2008). “Aerobic granular sludge: Recent advances,” *Biotechnol. Adv.* 26(5), 411–423. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.05.002
- Adav, S. S.; Lee, D.-J.; Lai, J.-Y. (2009) “Treating chemical industries influent using aerobic granular sludge : Recent development”. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* v. 40, p. 333–336. DOI: 10.1016/j.jtice.2009.02.002
- Amann, R.; Glo, F.; Neef, A. (1997) “Modern methods in subsurface microbiology : in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes”. *FEMS Microbiology Reviews.* v. 20. P. 191-200. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00308.x
- Barr, T. A.; Taylor, J. M.; Duff, S. J. B. (1996) “Effect of HRT, SRT and temperature on the performance of activated sludge reactors treating bleached kraft mill effluent”. *Water Research.* v. 30, n. 4, p. 799–810. DOI: 10.1016/0043-1354(95)00218-9
- BEUN, J. J. et al. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research,* v. 33, n. 10, p. 2283–2290, jul. 1999.
- Beun, J. J.; Loosdrecht, M. C. M. Van; Heijnen, J. J. (2002) “Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor”. *Water Research.* v. 36. p. 702–712. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00250-0
- Bumbac, C.; Dinu, R. L.; Patroescu, V. I. (2011) “ Evaluation of Aerobic Granular Sludge SBR Performances”. *Conference Papers.* p. 90–92. DOI: <http://hdl.handle.net/123456789/679>
- Chen, Y.Y.; Pan, X. Li, J.; Lee, D. (2016) “Strengthening aerobic granule by salt precipitation”. *Bioresource Technology.* v. 218, p. 1253–1256. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.06.111
- DE SOUSA ROLLEMBERG, S. L. et al. Aerobic granular sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms. *Bioresource Technology,* v. 270, p. 678–688, dez. 2018.
- Duncan, J.; Bokhary, A.; Ftehi, P.; Kong, F.; Liao, B. (2017) “Thermophilic membrane bioreactors : A review”. *Bioresource Technology.* v. 243, p. 1180–1193. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.059
- Dutta, K.; Tsai, C.-Y.; Chen, W.-H.; Lin, J. L. (2014) “Effect of carriers on the performance of anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating synthetic municipal wastewater”. *International Biodeterioration and Biodegradation.* v. 95, n. PA, p. 84–88. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.04.021
- Ebrahimi, S.; Gabus, S. (2010) “Performance and microbial community composition dynamics of aerobic granular sludge from sequencing batch bubble column reactors operated at 20 ° C , 30 ° C , and 35 ° C”. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 87. p. 1555–1568. DOI: 10.1007/s00253-010-2621-4
- Filho, N. P. Dias, J. C. T.; Silva, C. M.; Rezende, R. P. (2019) “ Treatment of Effluent of the Cellulose and Paper Industry Using Aerobic Granular Sludge Thermophilic”. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science.* v. 6, n. 4, p. 415–423. DOI: 10.22161/ijaers.6.4.49
- Gonzalez-Martinez, A.; Munoz-Palazon, B.; Rodriguez\_Sanches, A.; Maza\_Marquez, P.; Gonzales-Loes, J.; Vahala, R. (2017) “Start-up and operation of an aerobic granular sludge system under low working temperature inoculated with cold-adapted activated sludge from Finland”. *Bioresource Technology.* v. 239, p. 180–189. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.037
- Hakim, M.; Anuar, A. N.; Azmi, S. I.; Jamal, N. A.; Wahad, N. A.; Ujang, Z.; Shraim, A.;

- Bob, M. M. (2015) "Aerobic sludge granulation at high temperatures for domestic wastewater treatment". *Bioresource Technology*. v. 185, p. 445–449. DOI:10.1016/j.biortech.2015.03.024.
- Hamza, R. A.; Sheng, Z.; Lorhemen, O.; Zaghloul, M.; Tay, J. (2018) "Impact of food-to-microorganisms ratio on the stability of aerobic granular sludge treating high-strength organic wastewater". *Water Research*. v. 147, p. 287–298. DOI: 10.1016/j.watres.2018.09.061
- Hao, W.; Li, Y.; Lv, J.; Chen, L.; Zhu, J. (2016) "The biological effect of metal ions on the granulation of aerobic granular activated sludge". *Journal of Environmental Sciences*. v. 44, p. 252–259. DOI: 10.1016/j.jes.2015.10.031
- He, Q.; Zhou, J.; Wang, H.; Zhang, J.; Wei, L. (2016) "Microbial population dynamics during sludge granulation in an A / O / A sequencing batch reactor". *Bioresource Technology*. v. 214, p. 1–8. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.04.088
- Hwu, C. S.; Lettinga, G. (1997) "Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges". *Enzyme and Microbial Technology*. v. 21, n. 4, p. 297–301. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00050-1
- Ibrahim, S., Wahab, N. A., Anuar, A. N., And Bob, M. (2017) "Parameter optimisation of aerobic granular sludge at high temperature using response surface methodology," *Int. J. Elect. Comput. Eng.* 7(3), 1522–1529. DOI: 10.11591/ijece.v7i3.pp1522-1529
- Jeong, J. Y.; Son, S. M.; Pyon, J. H.; Park, J. Y. (2014) "Performance comparison between mesophilic and thermophilic anaerobic reactors for treatment of palm oil mill effluent". *Bioresource Technology*. v. 165, n. C, p. 122–128. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.007
- Jules B. Van Lier, Jose Luis Sanz Martin, G. L. (1996) "Effect Of Temperature On The Anaerobic Thermophilic Conversion Of Volatile Fatty Acids By Dispersed And Granular Sludge". *Water Research*. v. 30, n. 1, p. 199–207. DOI: 10.1016/0043-1354(95)00107-V
- Khemkhao, M.; Nuntkumjorn, B.; Techkarnjanaruk, S.; Phalakornkule, C. (2012) "UASB performance and microbial adaptation during a transition from mesophilic to thermophilic treatment of palm oil mill effluent". *Journal of Environmental Management*. v. 103, p. 74–82. DOI: 10.1016/j.jenvman.2012.03.004
- Kim, H. W.; Nam, J. Y.; Kang, S. T.; Kim, D. H.; Jung, K. W.; Shin, H. S. (2012) "Hydrolytic activities of extracellular enzymes in thermophilic and mesophilic anaerobic sequencing-batch reactors treating organic fractions of municipal solid wastes". *Bioresource Technology*. v. 110, p. 130–134. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.146
- Lapara, T. M.; Alleman, J. E. (1999) "Thermophilic aerobic biological wastewater treatment". *Water Research*. v. 33, n. 4, p. 895–908. DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00282-6
- Lee, D. J.; Chen, Y. Y.; Show, K. Y.; Whiteley, C.; Tay, J. Y. (2010) "Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation". *Biotechnology Advances*. v. 28, n. 6, p. 919–934. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.007
- Liu, H.; Li, Y.; Yang, C.; Pu, W.; He, L.; Bo, F. (2012) "Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane". *Bioresource Technology*. v. 121, p. 111–118. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.016
- Liu, Y. Q.; Tay, J. H. (2005) "Variable aeration in sequencing batch reactor with aerobic granular sludge". *Journal of Biotechnology*. v. 124, n. 2, p. 338–346. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.037
- Liu, Y. Q.; Tay, J. H. (2015) "Fast formation of aerobic granules by combining strong

- hydraulic selection pressure with overstressed organic loading rate”. *Water Research*. v. 80. p. 256-266. DOI: 10.1016/j.watres.2015.05.015
- Liu, Y.; Yang, S.; Tay, J. H. (2004) Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria”. *J Biotechnol*. v.108. p.161-169. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2003.11.008.
- Lv, Y.; Wan, C.; Lee, D. J.; Liu, X.; Tay, J. H. (2014) “Microbial communities of aerobic granules : Granulation mechanisms”. *Bioresource Technology*. v. 169, p. 344–351. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.07.005
- Morais, I. L. H.; Silva, C. M.; Zanuncio, J. C.; Zanincio, A. J. (2018) “Structural Stabilization of Granular Sludge by Addition of Calcium Ions into Aerobic Bioreactors”. *Bioresources*. v. 13, n. 1, p. 176–191. DOI: 10.15376/biores.13.1.176-191
- Mosquera-Corral, A.; Krenuk, M. K.; Heijnen, J. J.; Van Loosdrecht, M. C. M. (2005) “Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor”. *Water Research*. v. 39, p. 2676–2686. DOI: 10.1016/j.watres.2005.04.065
- Moy, B. Y.; Tay, J. H. Toh, S. K.; Liu, Y.; Tay, S. T. L. (2002) “High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules”. *Lett Appl Microbiol*. v. 34. p. 407–412. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01108.x.
- Nancharaiah, Y. V.; Kiran Kumar Reddy, G. (2018) “Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications”. v. 247, p. 1128-1143. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.131
- Nielsen, H. B.; Angelidaki, I. (2008) “Congestion of manure and industrial organic waste at centralized biogas plants: Process imbalances and limitations”. *Water Science and Technology*. v. 58, n. 7, p. 1521–1528. DOI: 10.2166/wst.2008.507
- Pap, B.; Gyorkei, A.; Boboescu, L.; Nagy, I.; Biro, T. (2015) “Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation”. *Bioresource Technology*. v. 177, p. 375–380. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.021
- Reddy, P.; Pillay, V.; Kunamneni, A.; Singh, S. (2005) “Degradation of pulp and paper-mill effluent by thermophilic micro-organisms using batch systems”. *Water SA*. v. 31, n. 4, p. 575–580. DOI: 10.4314/wsa.v31i4.5147
- Rintala, J.; Lepist, R. (1992) “Toxicity of Kraft Bleaching Effluents on Thermophilic and Mesophilic VFA Methanation”. *Bioresources Thecnology*. v. 42, p. 17–26. DOI: 10.1016/0960-8524(92)90083-A
- SARMA, S. J.; TAY, J. H.; CHU, A. Finding Knowledge Gaps in Aerobic Granulation Technology. *Trends in Biotechnology*, v. 35, n. 1, p. 66–78, jan. 2017.
- Shi, Y.; Xing, S. Wang, X.; Wang, S. (2013) “Changes of the reactor performance and the properties of granular sludge under tetracycline ( TC ) stress”. *Bioresource Technology*. v. 139, p. 170–175. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.037
- Song, Zhiwei; Ren, Nanqi; Zhang, Kun; Tong, L. (2009) “Influence of temperature on the characteristics of aerobic granulation in sequencing batch airlift reactors”. *Journal of Environmental Sciences*. v. 21, p. 273–278. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62263-9
- Suvilampi, J.; Rintala, J. (2004) “Thermophilic aerobic wastewater treatment , process performance , biomass characteristics , and effluent quality”. *Environmental Science and Biotechnology*. v. 2 p. 35–51. DOI: 10.1023/B:RESB.0000022959.46025.9a
- Tay, J; Liu, Q.; Liu, Y. (2001) “ Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor”. *Journal os Applied Microbiology*.v. 91. p. 168–175. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01374.x
- Vrieze, J.; Smet, D.; Klok, J. Colsen, J.; Angenent, L.; Vlaeminck, S. E. (2016) “Thermophilic sludge digestion improves energy balance and nutrient recovery potential in full-scale municipal wastewater treatment plants”. *Bioresource*

- Technology. v. 218, n. 2016, p. 1237–1245. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.06.119
- Wan, C.; Lee, D.; Yang, X.; Wang, Y.; Wang, X.; Liu, X. (2015) “Calcium precipitate induced aerobic granulation”. *Bioresource Technology*. v. 176, p. 32–37. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.008
- Wever, H.; Weiss, S.; Reemtsma, T.; Vereecken, J.; Muller, J.; Knepper, T.; Gonzalez, S.; Barcelo, D.; Hernando, M. (2007) “Comparison of sulfonated and other micropollutants removal in membrane bioreactor and conventional wastewater treatment”. *Water Research*. v. 41, p. 935–945. DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.013
- Whang, L.; Park, J. K. (2001) “Competition between Polyphosphate- and Glycogen-Accumulating Organisms in Systems : Effect of Temperature and Sludge Age”. *Water Sci Technol*. v. 46:191-4. PMID: 12216623
- XIA, J. et al. Microbial community structure and function in aerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 9, p. 3967–3979, maio 2018.
- Yu, D.; Kurola, J. M.; Lahde, K.; Kymalainen, M.; Sinkkonen, A.; Romantschuk, M. (2014) “Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes”. *Journal of Environmental Management*. v. 143, p. 54. DOI: 10.1016/j.jenvman.2014.04.025
- Yu, H. Q. M.; Tay, J H; Fang, H. H. P. (2001) “The roles of calcium in sludge granulation during uasb reactor start-up”. *Water Research*. v. 35, n. 4, p. 1052–1060. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00345-6
- Zhang, Jingxin; Zhang, Y.; Quan, X. (2012) “Electricity assisted anaerobic treatment of salinity wastewater and its effects on microbial communities”. *Water Research*. v. 46, n. 11, p. 3535–3543. DOI: 10.1016/j.watres.2012.03.059
- Zhang, Q.; Hu, J.; Lee, D. (2016) “Aerobic granular processes : Current research trends”. *Bioresource Technology*. v. 210, p. 74–80. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.098
- Zhao, X.; Chen, Z.; Wang, X.; Li, J.; Shen, J.; Xu, H. (2015) “Remediation of pharmaceuticals and personal care products using an aerobic granular sludge sequencing bioreactor and microbial community profiling using Solexa sequencing technology analysis”. *Bioresource Technology*. v. 179, p. 104–112. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.12.002
- Zheng, Y. M.; Yu, H.; Liu, S.; Liu, X. (2006) “Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions”. *Chemosphere*. v. 63, n. 10, p. 1791–1800. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.08.055
- Zheng, Y.; Yu, H.; Sheng, G. (2005) “Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor”. *Process Biochemistry*. v. 40, p. 645–650. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.056
- Zitomer, D. H. Duran, M., Albert, R., And Guven, E. (2007) “Thermophilic aerobic granular biomass for enhanced settleability”. *Water Research*. 41(4), 819–825. DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.037

## CAPÍTULO 2

### Characterization of Thermophilic Aerobic Granular Sludge for the Treatment of Bleached Kraft Pulp Mill Effluent

#### ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the physical characteristics of the thermophilic granular aerobic sludge used in the treatment of bleached kraft pulp mill effluents. Four sequential batch reactors (SBRs) were operated with cycles of 12 hours. Reactor (R1-FSR) with flocculent sludge was used as control. The other three reactors (R2-GSR, R3-GSR<sub>+100</sub>, and R4-GSR<sub>+200</sub>) were operated with granular aerobic sludge. Concentrations 100 and 200 mg. L<sup>-1</sup> of calcium were applied in the R3-GSR<sub>+100</sub> and R4-GSR<sub>+200</sub>, respectively. The pH was maintained in the neutral range in all reactors. The experimental plan was carried out for 490-day period, in 5 phases at different temperatures of 35 °C to 55 °C. All SBRs showed COD removal efficiency above 60% in all temperature ranges. The granule average diameter in the R2-GSR, R3-GSR<sub>+100</sub>, and R4-GSR<sub>+200</sub> ranged from 5 to 8 mm. The reactor R3-GS<sub>+100</sub> showed better stability due to the addition of 100 mg. L<sup>-1</sup> of calcium. The granular sludge sedimentation velocity was 40 m.h<sup>-1</sup>, which was eight times higher than the flocculent sludge. Thermophilic treatment (55 °C) using aerobic granular sludge proved to be a promising way for treating bleached kraft pulp mill effluent without a prior cooling process.

**Keywords:** Thermophilic aerobic granules; High-temperature; Integrity coefficient; Industrial wastewater

#### 1. INTRODUCTION

Pulp mills demand significant amounts of water and generate high volumes of effluent with high organic matter and high temperatures, requiring biological treatment prior to discharge (Calvo et al. 2007; Morais et al. 2018; Da Mata et al. 2019). The effluent from pulp mills presents potential for biological treatability, for which it is generally applied the activated sludge process an aerobic system, which shows advantages in comparison with anaerobic treatments (Thompson et al. 2005). However, the activated sludge used to treat the pulp mills effluent generally is operated at a mesophilic temperature (about 35 °C), which implies the need for effluent cooling, increasing the operating costs of treatment plants due

to the high energy consumption required in the cooling stage. Such costs could be avoided by using the treatment system in thermophilic conditions.

Thermophilic biological wastewater treatment has been the subject of studies since the early 1950s (Lapara and Alleman 1999). In this way, researchers have been documenting and encouraging the use of aerobic thermophilic treatment as an alternative to mesophilic processes, especially in industries that generate high-temperature effluent (above 50 °C), thus eliminating the need for cooling systems (Suvilampi and Rintala 2004; Adav et al. 2008). Recent research has shown that thermophilic treatment allows a high rate of removal of organic loads (Halim et al. 2016; Ibrahim et al. 2017), and the use of the thermophilic condition in biological treatment has been investigated with positive contributions to the pulp and paper industry (Zheng and Liao 2014). However, some biological processes require greater care in the operation, as described by Zheng and Liao (2016), when studying membrane aerated biofilm reactors for thermomechanical pulping pressate (TMP) treatment, such as a promising technology that request a necessary careful biofilm thickness control for achieving better performance.

Some studies have shown that thermophilic conditions can cause negative effects on the microbiology of sludge, interfering with microbial diversity and richness, which can result in a drop in efficiency in the treatment system (Silva et al. 2010).

Besides the effects on microbiology, the thermophilic biological treatment has several difficulties for its implementation, due to the negative effect of high temperature on the formation and sedimentability of biological sludge (Hakim et al. 2016).

A hypothesis that supports the thermophilic treatment suggests the use of granular sludge, which provides more physical/mechanical resistance on the biological aggregates formed, maintaining the stability of the treatment at high temperature. The use of thermophilic anaerobic granular sludge has been reported earlier than the use of thermophilic aerobic granular sludge; however, a greater consumption rate of organic matter by aerobic way, can be more attractive for treatment of the biggest volume of effluent due to the smaller hydraulic retention time (Van Lier et al. 1996; Dutta et al. 2014; Soerensen et al. 2015). There are useful opportunities of the thermophilic treatment systems applying aerobic granular sludge that proposed a substitution of the mesophilic condition where the flocculent sludge was used (Zitomer et al. 2007; Hakim et al. 2016).

The first step for the technology application is to produce the biological aerobic aggregates. Granulation is a gradual process of conversion of flocculent sludge into granular sludge through the selection of aggregates by sedimentation. The granulation process can be

initiated by bacterial adsorption and adhesion to inorganic, inert, and precipitated materials, as well as by the adhesion of microorganisms to other cells through physicochemical interactions. Some groups of bacteria, such as filamentous bacteria, contribute to and enhance the granulation process, making the granules more resistant (Yu et al. 2001; Morais et al. 2018).

Aerobic granulation has gained importance in the wastewater treatment field (Ebrahimi et al. 2010; Lee et al. 2010; Ren et al. 2017; Morais et al. 2018), although the use of full-scale plants is still incipient. Aerobic granular sludge technology is currently applied on a full-scale level by Royal Haskoning DHV (Nijmegen, Netherlands) in a system called Nereda® (Pronk et al. 2015).

Few studies have reported the use of full-scale granular sludge, and normally full-scale systems operate in batch mode, which still acts as a limiting factor for the use in high-flow effluent treatment systems (Giesen and Thompson 2013). The physical instability of the granule structure over the bioreactor operating time is one of the most severe obstacles to a practical application of aerobic granular sludge, especially in continuous-feed flow systems.

An important step for granular sludge technology to be used on a large scale is to develop techniques that give the sludge a greater cohesion and more mechanical resistance to withstand the shear stress of the effluent in the aerated bioreactors. The aerobic granules can be classified according to their capacity to tolerate high shear forces by measuring the integrity coefficient (Ghangrekar et al. 2005).

A more complex scenario is observed when aerobic granular sludge is subjected to high temperatures. Little is known about the formation of granules and the effects of high temperatures on the physical characteristics of the granules, as well as the performance of organic matter removal efficiency on the wastewater treatment plant under thermophilic conditions.

The objectives of the present research were to evaluate the physical characteristics of the aerobic granular sludge and the organic matter removal efficiency when treating bleached kraft pulp mill effluents under the thermophilic conditions.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Materials

The effluent was obtained from a Brazilian eucalyptus bleached kraft pulp mill that has a  $D_{\text{hot}}$  (EP) DP bleaching sequence. The effluent was collected upstream of the activated sludge treatment system and the biosludge was collected in the sludge recirculation line for further use in the lab sequential batch bioreactors.

### 2.2 Experimental design

The experimental design is shown in Fig. 1.

**Fig. 1.** Experimental design

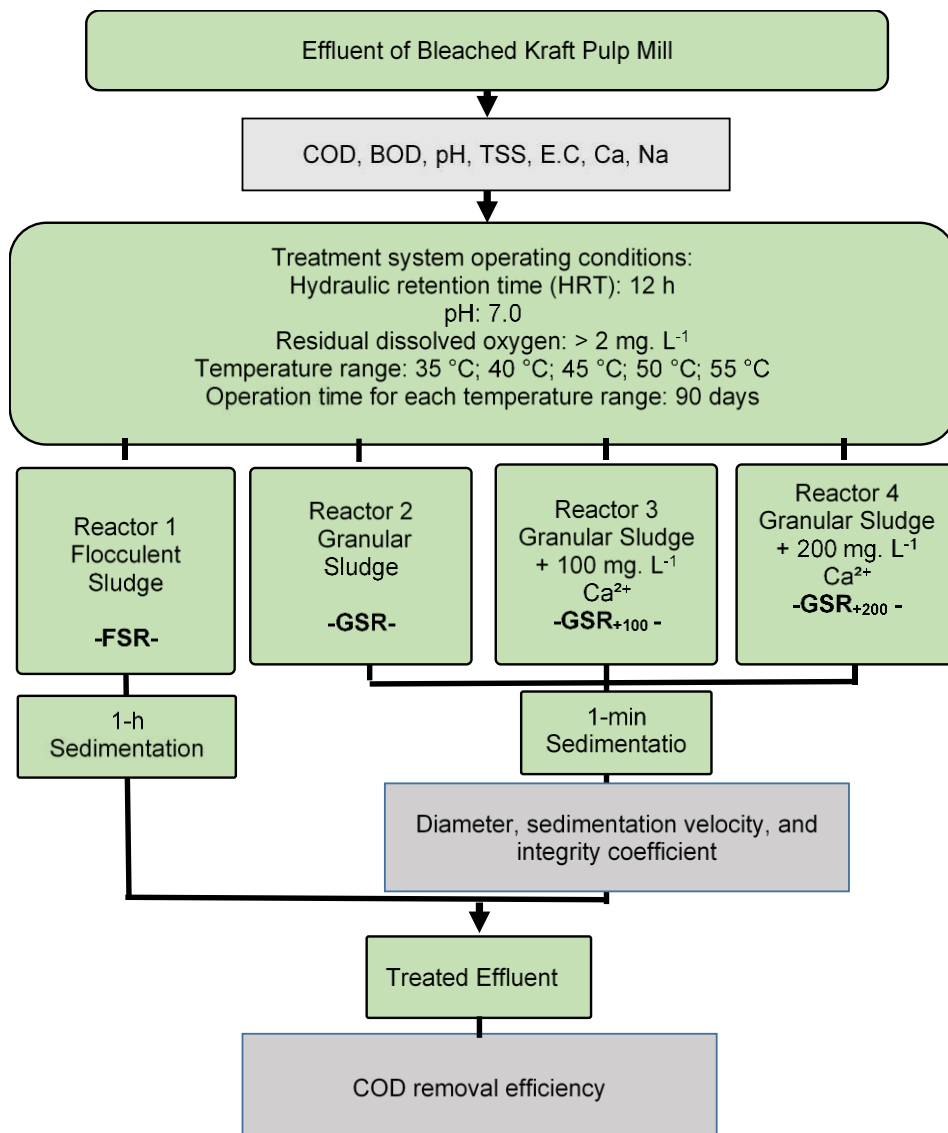


Table 1 describes the analytical processes and the frequency of the analysis. The operation period in each temperature phase was 90 days, for a total of 450 days for the 5 phases at different temperature beginning at 35 °C and intercalated by 5 °C every 90 days until 55 °C.

**Table 1.** Analytical Program

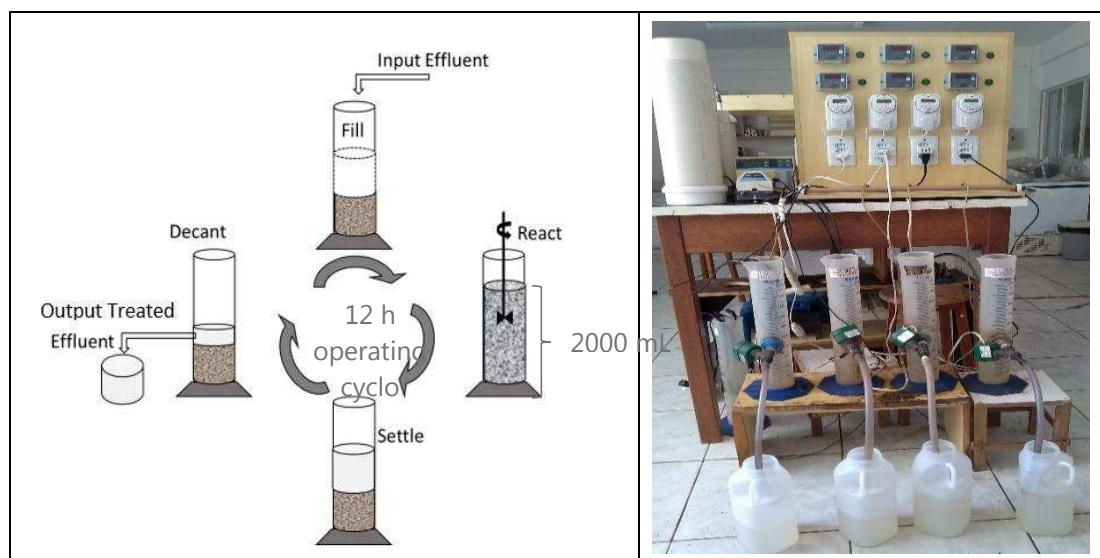
Nature	Analyses	Location	Frequency
Characterization	COD, BOD, pH, TSS, VSS, E.C, Calcium, and Sodium	Input	For every sample
Routine	COD, pH, TSS	Output	Three times a week
Routine	Size Determination (Petri dish sludge photographs)	Granular Sludge	Twice a week
Routine	Granule strength and sedimentation rate test	Flocculent and Granular Sludge	Monthly

COD- Chemical oxygen demand, BOD- Biochemical oxygen demand, TSS- Total suspended solids, VSS- Volatile suspended solids, EC- Electrical conductivity

### 2.2.1 Experimental apparatus

A sequential batch reactor (SBR) system composed of four reactors (Fig. 2), with a volume of 2000 mL each, was assembled.

**Fig. 2.** Sequential batch reactors/ Experimental apparatus



Each reactor was equipped with an air diffusion aeration system and a semi-automatic treated effluent discharge system composed of a timer and a solenoid valve.

Effluent feeding was performed via a peristaltic pump. In each reactor, a thermostatically controlled heater was installed. The temperatures were programmed for each phase of the test, beginning with a temperature of 35 °C and increasing 5 °C in each phase up to a temperature of 55 °C.

The system operated in batch cycles of 12 h each. The pH in each reactor was kept in the neutral range (pH = 7) through the addition of sulfuric acid when necessary. Dissolved oxygen (DO) concentration was always kept above 2 mg.L<sup>-1</sup> in all reactors.

The bleached pulp mill effluent received the addition of nutrients (N and P) in the ratio of 250:5:1 for COD:N:P (Morais et al. 2018), because the effluents are poor in nutrients for the microorganisms.

Reactor R1-FSR with flocculent sludge was operated in flocculent sludge conditions (1-h sedimentation time). Reactors R2-GSR with granular sludge, R3 - GSR<sub>+100</sub> granular sludge and 100 mg.L<sup>-1</sup> of additional calcium, and R4-GSR<sub>+200</sub> granular sludge with 200 mg.L<sup>-1</sup> of additional calcium were operated under granular sludge formation conditions (1-min sedimentation time). The R3-GSR<sub>+100</sub> and R4-GSR<sub>+200</sub> reactors received a fixed dosage of 100 and 200 mg Ca<sup>2+</sup> L<sup>-1</sup>, respectively, in the form of calcium chloride. All reactors operated with a 12-hour cycle. Reactor R1-FSR operated with 11 hours of reaction time, which included 5 minutes for filling, 1 hour of sedimentation, and 2 minutes discharge. Reactors R2-GSR, R3-GSR+ 100 and R4-GSR+ 200 had the cycles of 11 hours and 57 minutes of reaction including 5 minutes for filling, 1 minute for sedimentation, and 2 minutes for discharging.

## 2.3 Methods

### 2.3.1 Physicochemical characterization

The physical-chemical parameters analyzed were COD (method 5220D), BOD and DO by respirometry test (method 5220B), solids concentration (methods 2504B, C, D and E), based on methodology described in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012), as well as the procedures of collection, preservation and pretreatment of the samples (APHA 2012). The pH was measured using the HACH HQ40D multi-parameter.

Calcium, potassium, and sodium were determined by atomic absorption spectroscopy according to TAPPI T266 om-02 (2006).

### 2.3.2 Analysis of the physical characteristics of aerobic granular sludge

#### a) Size of the granules

The determination of the size and circularity of the granules was carried out using ImageJ software (NIH, 1.51K, Bethesda, MA, USA) (Rasband 2017). The diameters were calculated as equivalent circular diameters (Lochmatter et al. 2013). The images used in the ImageJ software were obtained by diluting the sludge samples, placing them in a glass Petri dish, and photographing them together with a graduated ruler, for the conversion of the scalar factor of the image pixels produced.

#### b) Sedimentation velocity and stress test

The average sedimentation rate was determined using the sedimentation column assay (Ghangrekar et al. 2005).

The procedure consisted of filling a sedimentation column of a diameter of 7.5 cm and a height of 75 cm with water, to which 25 mL of diluted sludge (5:1) was added. Collection was performed at time intervals of 0.5, 1, 1.5, 3, 7.5, 15, and 60 min. From the collected material, the TSS of each sample was determined to quantify the fraction of settled sludge at each time point.

The average sedimentation velocity was calculated by Eq. 1,

$$v_{\text{mean sed.}} = \frac{\sum v \times m}{M} \quad (1)$$

where  $v_{\text{mean sed.}}$  is the mean sedimentation velocity ( $\text{m. h}^{-1}$ ),  $v$  is the sedimentation velocity ( $\text{m. h}^{-1}$ ) of the fraction in the interval,  $m$  is the mass (g) of sedimented fraction over time, and  $M$  is the total mass (g) of sludge sample.

The stress test was conducted on the fraction of the sludge that settled in 1 min. The granules were transferred to a 250-mL Erlenmeyer flask, and the volume was completed with tap water to a total volume of 150 mL. The sample was placed on a shaker at 200 rpm for a period of 5 min. After stirring, the sample was allowed to rest for 1 min. Then, the total suspended solids of the supernatant and the decanted liquid were measured. The results of the TSS analyses were used to determine the integrity coefficient, which is defined as the ratio of the mass of the supernatant solids divided by the mass of the total solids of the sample. Thus, the lower the integrity coefficient, the greater the strength of the granules (Ghangrekar et al. 2005).

## 2.4 Statistical Test

The results were submitted to an analysis of variance and the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ), using the R software (RFSC, v.R 3.3.3. Vienna, Austria) in the data processing.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Characterization of Bleached Kraft Pulp Mill Effluent

The characteristics of the effluent used during the experiment are shown in Table 2.

**Table 2.** Characterization of the Bleached Kraft Pulp Mill Effluent

Sample	COD (mg.L <sup>-1</sup> )	BOD (mg.L <sup>-1</sup> )	E.C (mS.cm <sup>-1</sup> )	TSS (mg.L <sup>-1</sup> )	VSS (mg.L <sup>-1</sup> )	Ca (mg.L <sup>-1</sup> )	Na (mg.L <sup>-1</sup> )	K (mg.L <sup>-1</sup> )
Effluent	1309 ± 75	530 ± 93	3,2 ± 0,3	185 ± 13	114 ± 20	170 ± 10	603 ± 14	18 ± 4.0

The effluent showed typical characteristics of kraft pulp mill wastewaters, with an average COD of 1309 mg.L<sup>-1</sup>, and an approximate BOD/COD ratio of 0.4 (Morais et al. 2018; Da Mata et al. 2019). The effluent had a conductivity value (3.2 mS.cm<sup>-1</sup>) that was significantly correlated with the presence of calcium, sodium, and potassium salts (170, 603, and 18 mg.L<sup>-1</sup>, respectively). It is noteworthy that high electrical conductivity can affect the formation of biological aggregates (Da Mata et al. 2019). The value found, although high, is within the typical values for this type of effluent.

The calcium concentration was increased in the R3-GSR<sub>+100</sub> (100 mg Ca L<sup>-1</sup>) and R4-GSR<sub>+200</sub> (200 mg Ca L<sup>-1</sup>) reactors, so that the R3-GSR<sub>+100</sub> reactor had a total concentration of 270 mg.L<sup>-1</sup> of calcium, and the R4-GSR<sub>+200</sub> increased to 370 mg.L<sup>-1</sup>.

### 3.2 Organic matter removal efficiency

The COD removal efficiency using granular sludge in the sequence batch reactor system is shown in Table 3.

**able 3.** COD Removal Efficiency at Different Temperatures

Parameter	COD Removal Efficiency (%)				
	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
Operating Temperature					
R1-FSR	69 ± 3.2	65 ± 9.2	67 ± 5.2	67 ± 5.9	66 ± 10.1
R2-GSR	67 ± 5.2	65 ± 7.4	67 ± 8.4	68 ± 7.3	64 ± 7.8
R3-GSR <sub>+100</sub>	68 ± 5.1	67 ± 8.1	65 ± 9.5	68 ± 5.5	64 ± 9.4
R4-GSR <sub>+200</sub>	68 ± 4.2	66 ± 4.7	67 ± 8.4	64 ± 10.5	65 ± 7.5

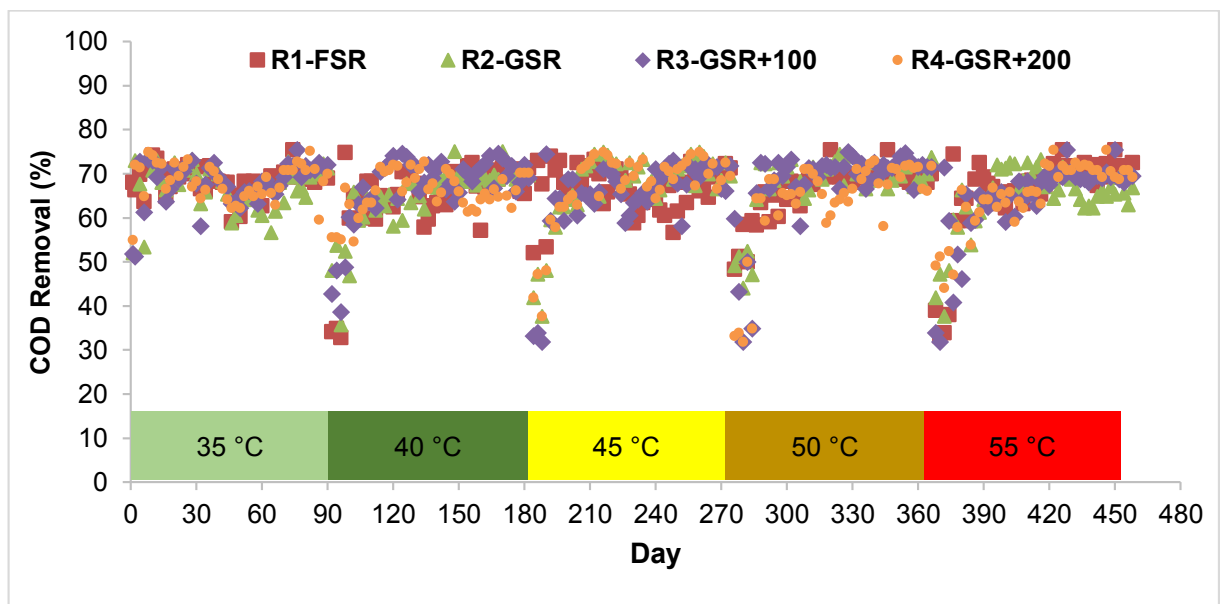
R1-FSR = Flocculent sludge reactor; R2-GSR = Granular sludge reactor; R3-GSR<sub>+100</sub> = Granular sludge reactor 100 mg.L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>; R4-GSR<sub>+200</sub> = Granular sludge reactor 200 mg.L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>, n = 46

The overall removal efficiency was above 60% under all tested conditions. The efficiencies achieved for COD removal are similar to those reported in the literature for bleached pulp mill effluents (Kamali and Khodaparast 2015; Morais et al. 2018; Da Mata et al. 2019).

The SBR performance did not present statistically significant variation between the average COD removal efficiency of the different reactors, within the same temperature range.

Performance was similar among the flocculent (R1-FSR) and granular (R2-GSR, R3-GSR<sub>+100</sub>, and R4-GSR<sub>+200</sub>) sludge reactors. The addition of calcium was not found to have any adverse effect on organic load removal efficiency (Morais et al. 2018).

Figure 3 presents the results of the overall reactor efficiency over the experiment period, in the different temperature phases.

**Fig. 3.** Performance of reactors in soluble COD removal

The treatment maintained a COD removal efficiency of over 60% at all temperatures. The COD removal efficiency above 60% at high temperatures was also observed in the use of granular sludge (Song et al. 2009).

Temperature transition can negatively affect biological activities. It was observed that after each temperature transition, there was an efficiency drop of up to 30%, but the removal efficiency returned gradually to maximum after a short period of adaptation at the new temperature. It is noteworthy that the recovery of COD removal efficiency in the temperature transition from 50 to 55 °C was longer, only returning to total recovery after approximately 20 days, while in the other temperature ranges the recovery of efficiency occurred over a medium period of 10 days.

The drop in efficiency can be attributed to the fact that high temperatures may cause adverse effects on the microbial sludge community and sludge formation (Hakim et al. 2015; Ibrahim et al. 2017).

At no time did the addition of calcium influence the reactors' performances regarding the COD removal.

The efficiency of COD removal shows that it was possible to treat the effluent in all conditions tested. Thus, it was possible to observe that the effluent treatment of the cellulose mill can be carried out in thermophilic conditions, suggesting a viable alternative for the industry, with a significant reduction in the installation and operation costs of the effluent treatment system. Above all, meeting the standards for launching environmental standards.

The thermophilic treatment with the granular sludge combines the advantages of the characteristics of the granular sludge (excellent sedimentation rate, less area requirement, greater robustness to shock loads) with the benefits of high temperature operation (higher degradation rate, less generation sludge), being an attraction for the use of technology on an industrial scale.

### **3.3 Physical characteristics of granular aerobic sludge at different temperatures**

The diameter and sedimentation velocity of the granules were determined (Table 4).

**Table 4.** Diameter, Sedimentation Rate, and Granule Integrity Coefficient

Temperature	Treatments	Diameter (mm)	Sedimentation Rate (m.h <sup>-1</sup> )	Integrity Coefficient x 100
35 °C	R1-FSR	-	4.70 ± 1.40	-
	R2-GSR	7.17 ± 3.14	40.21 ± 1.80	4.70 ± 1.93
	R3-GSR <sub>+100</sub>	7.80 ± 3.82	41.55 ± 0.85	0 ± 0
	R4-GSR <sub>+200</sub>	7.81 ± 3.8	41.53 ± 2.95	9.64 ± 5.48
40 °C	R1-FSR	-	3.93 ± 0.81	-
	R2-GSR	6.29 ± 4.00	39.36 ± 2.36	12.24 ± 4.45
	R3-GSR <sub>+100</sub>	5.83 ± 3.21	41.81 ± 1.99	0 ± 0
	R4-GSR <sub>+200</sub>	8.30 ± 9.51	41.21 ± 3.92	13.62 ± 13.37
45 °C	R1-FSR	-	3.81 ± 0.83	-
	R2-GSR	6.74 ± 4.77	38.58 ± 0.19	18.02 ± 12.23
	R3-GSR <sub>+100</sub>	7.56 ± 5.19	40.55 ± 3.69	2.49 ± 1.04
	R4-GSR <sub>+200</sub>	5.36 ± 3.85	44.415 ± 1.47	18.95 ± 5.84
50 °C	R1-FSR	-	5.08 ± 0.69	-
	R2-GSR	6.60 ± 4.61	42.50 ± 1.51	14.69 ± 7.51
	R3-GSR <sub>+100</sub>	8.08 ± 5.25	42.06 ± 1.16	1.85 ± 2.62
	R4-GSR <sub>+200</sub>	7.65 ± 5.21	41.29 ± 7.04	20.39 ± 6.51
55 °C	R1-FSR	-	5.47 ± 0.75	-
	R2-GSR	6.74 ± 4.77	41.69 ± 0.25	6.73 ± 5.11
	R3-GSR <sub>+100</sub>	7.57 ± 5.25	42.01 ± 1.09	1.39 ± 1.96
	R4-GSR <sub>+200</sub>	6.32 ± 4.66	41.29 ± 4.04	17.95 ± 0

R1-FSR= Flocculent sludge reactor; R2-GSR = Granular sludge reactor; R3-GSR<sub>+100</sub> = Granular sludge reactor + 100 mg.L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>; R4-GSR<sub>+200</sub> = Granular sludge reactor + 200 mg.L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>

Reactors R2-GSR, R3-GSR<sub>+100</sub>, and R4-GSR<sub>+200</sub> presented predominantly average diameters between 4 and 8 mm, similar to those reported in studies that point out granular sludge as a viable alternative for industrial and municipal effluent treatment (Zitomer et al. 2007; Ebrahimi and Gabus 2010; Wilson et al. 2013; Pronk et al. 2017; Morais et al. 2018). A statistical comparison between the average diameters recorded in each temperature range and between the different granular aerobic sludge reactors showed no significant variation, with a confidence level of 95%. This shows that the diameter of the granules remained similar in the R2-GSR, R3-GSR<sub>+100</sub>, and R4-GSR<sub>+200</sub> reactors, regardless of temperature variation.

The main physical characteristics of granular aerobic sludge were maintained throughout the entire treatment and under the different operating conditions of the SBRs: i.e., there was no significant deterioration of the granules when operating the SBRs in the different temperature ranges from 35 °C to 55 °C.

Similarly to what was observed on granules that had comparable average diameter at all temperatures (Table 4), it was also observed that the addition of calcium had no effect on the size of the granules, i.e., the reactor without adding calcium, had a mean diameter similar to the R3-GSR<sub>+100</sub> reactor with the addition of 100 mg. L<sup>-1</sup> of calcium, as well as the average diameter found for the R4-GSR<sub>+200</sub> reactor with the addition of 200 mg.L<sup>-1</sup> calcium.

The granule size has been reported as being an important parameter, but the average diameter has a wide range, varying from 0.2 mm up to 16 mm (Zheng et al. 2006; Li et al. 2008; Liu et al. 2012; Morais et al. 2018). In contrast to what has been shown in previous studies, that granules of 0.6 to 1.8 mm may be more efficient for biological treatment (Liu and Tay 2015), and that large granules are not desirable due to instability and smaller surface area and may reduce substrate removal and biomass growth rates (Liu and Tay 2006; Pronk et al. 2015). It was observed in this work that the granules formed, besides being stable even with temperature variations, did not present a reduction in the rate of removal of the organic load. The use of real industrial substrate with high readily assimilable organic content is emphasized, which contributes to the formation of large granules. The maintenance and durability of the diameter and mass of the granulate can also be verified indirectly by the sedimentation rate.

The sedimentation rate values were close to those typically found in the literature (Dahalan et al. 2015; Morais et al. 2018). Sedimentation rate is one of the most important characteristics of granular sludge, which allows the effluent to be clarified quickly after treatment, making it an attractive alternative for replacement of conventional activated sludge techniques (Zitomer et al. 2007; Zhiwei et al. 2009; Ebrahimi et al. 2010).

The average sedimentation velocity measured for granular sludge under different temperature conditions was approximately 40 m.h<sup>-1</sup>, while the flocculent sludge presented an average sedimentation velocity around 5 m.h<sup>-1</sup>. The granular sludge reached sedimentation velocities 8 times higher than the flocculent sludge. Typical granular sludge sedimentation velocity values have been reported with values similar to those measured in this paper (Zitomer et al. 2007; Dahalan et al. 2015; Morais et al. 2018). This sedimentation rate can be attributed to the size of the granules and their cohesive formation.

Recent studies consider the disaggregation of the granules to be one of the main factors that could limit their use in large-scale plants. Recent articles have shown the use of agents that confer greater cohesion to the aggregate, helping the granules to withstand higher shear stresses caused by the flow of water and turbulence caused by the aeration in the reactors (Zitomer et al. 2007; Adav et al. 2009; Lee et al. 2010). The study by Morais et al.

(2018) demonstrates that it is possible to optimize the strength of granules with the addition of calcium, allowing for further exploration of the use of granular aerobic sludge.

The maintenance of granular cohesive physical strength plays an important role in ensuring their morphological functionality and settling velocity. In addition, a low strength of the granules results in loss of solids and a poor final effluent quality. The shear strength was evaluated by the integrity coefficient, which showed a significant positive effect of the addition  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  of calcium. The effect of calcium on the R3-GSR<sub>+100</sub> and R4-GSR<sub>+200</sub> reactors are shown in Table 4.

Positive effects of the addition of calcium on the granule strength were observed (Tay et al. 2001; Vogelaar et al. 2002; Zhang et al. 2013; Hao et al. 2016). It is noteworthy that the R3-GSR<sub>+100</sub> reactor, which received  $100 \text{ m.L}^{-1}$  of calcium, presented the lowest integrity coefficient, i.e., smaller solids losses under shear forces.

A low integrity coefficient implies greater cohesion, and indicates that the aerobic granule formed and maintained in the R3-GSR<sub>+100</sub> reactor showed greater mechanical stability, that is, with an integrity coefficient tending to zero (Lee et al. 2010; Zhang et al. 2017; Morais et al. 2018). Lee et al. (2010) explain that the increase in granule strength occurs due to the calcium precipitation inside the granules and the increased polysaccharide content, forming a more resistant core.

The addition of calcium was favorable to the mechanical stability of the granules only in R3- GSR<sub>+100</sub>, which received the addition of  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . For the R4-GSR<sub>+200</sub> reactor, which also received additional calcium ( $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ), it was observed that the integrity coefficient was above 9, which indicates an important fraction of disaggregate granules (Ghangrekar et al. 2005).

Divalent metal ions like calcium have a positive effect on granulation. The metal ions are recognized as enhancing granulation, providing the rapid formation of granules and giving them greater cohesion (Li et al. 2009; Song et al. 2009; Wilén et al. 2018). The mechanisms of enhancement of granulation may involve several functions, where inorganic ions can neutralize the negative charge on the surface of bacteria and enhance aggregation. The precipitates formed by the inorganic ions serve as nuclei to accelerate the microbial aggregation, and inorganic ions form an ionic bond on the surface of the particles and act as a cation bridge to enhance granulation (Yu et al. 2001; Wilén et al. 2018).

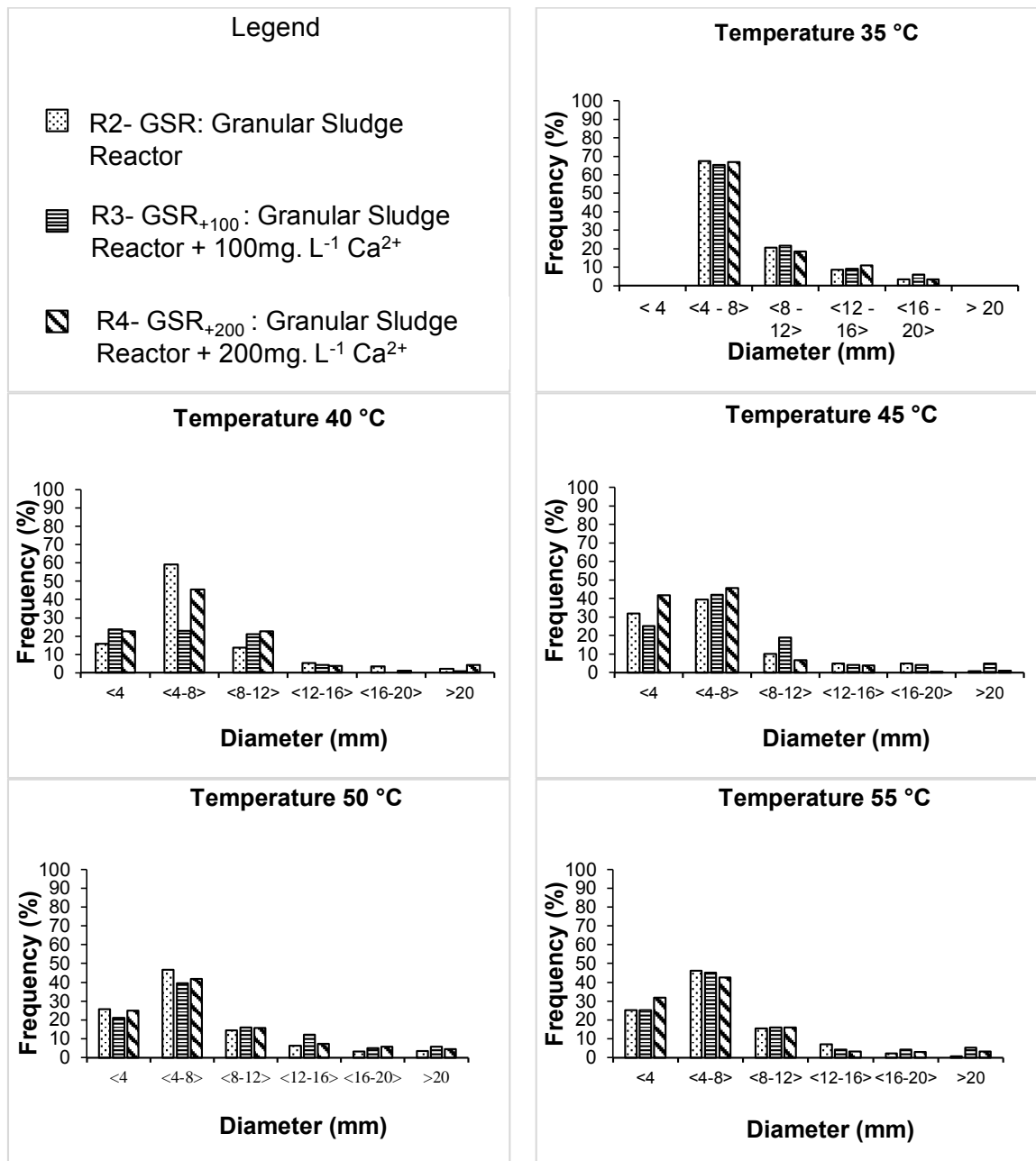
The sludge of the R3-GSR<sub>+100</sub> reactor was more cohesive, showing the lowest integrity coefficient. The application of  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  of calcium assisted the formation and stability of the granules. The results observed for the calcium application were similar to

those in the studies by Morais et al. (2018), Zhang et al. (2013), and Hao et al. (2016), which also explain that the high concentration of calcium can have negative effects. This situation is related to reactor R4-GSR<sub>+200</sub>, where the application of calcium was two times higher than the calcium applied in reactor R3-GSR<sub>+100</sub> and did weaken the granules.

The evaluation of the physical characteristics of the granular sludge showed that the sludge remained stable in thermophilic conditions, turning the use of this technology in an industrial scale more attractive. It was also possible to observe that the operating conditions used in the experiments were adequate in maintaining the physical characteristics of the thermophilic aerobic granules. The application of calcium positively contributed to the maintenance of the physical properties of granular sludge.

The frequency of occurrence of granules according to their particle size class (diameter) is shown in Fig. 4, in the temperatures ranging from 35 °C to 55 °C.

Fig. 4. Size distribution of granules at different temperatures



At 35 °C, the R2-GSR, R3-GSR<sub>+100</sub>, and R4-GSR<sub>+200</sub> reactors presented a granule diameter greater than 4 mm.

From the temperature increase above 40 °C, it was noted that there was a disturbance in granule formation, and an upward trend of granules smaller than 4 mm. This effect occurred mainly in the R4-GSR<sub>+200</sub> reactor, in the temperature range between 50 and 55 °C. However, the frequency of granules classified between 4 and 8 mm was not affected, continuing to show the highest proportions of distribution. In contrast, the frequency of granules larger than 8 mm was reduced, but without establishing a clear pattern.

The consistency of granules over the complete range of temperatures shows that the treatment of bleached kraft pulp mill effluent generated at elevated temperatures can be treated by a thermophilic aerobic system. This can be widely used as an alternative for economizing energy, eliminating the need for effluent cooling systems (Suvilampi and Rintala 2004; Ibrahim et al. 2017).

## **CONCLUSIONS**

1. The viability of maintaining granular sludge under thermophilic conditions was demonstrated. Granular aerobic sludge was subjected to different temperatures in the range of 35 °C to 55 °C. This granular aerobic sludge showed a COD removal efficiency higher than 60% in all temperature ranges, including 55 °C.
2. The granules were maintained throughout the experimental period presented typical values of aerobic granular sludge, with an average diameter ranging from 4 to 8 mm.
3. The sedimentation velocity of the granular sludge was determined to be 40 m.h<sup>-1</sup> and was 8 times higher than the sedimentation velocity of the flocculent sludge.
4. The addition of 100 mg.L<sup>-1</sup> of calcium contributed positively to make the granules more cohesive and to increase their mechanical strength.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was funded in part by the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES) - Financial Code 001. In addition, the authors would like to thank CNPq and FAPEMIG for their support in this research.

## REFERENCES

- Adav, S. S., Lee, D.-J., Show, K.-Y., and Tay, J.-H. (2008). "Aerobic granular sludge: Recent advances," *Biotechnol. Adv.* 26(5), 411-423. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.05.002
- Adav, S. S., Lee, D.-J., and Lai, J.-Y. (2009). "Treating chemical industries influent using aerobic granular sludge: Recent development," *J. Taiwan Inst. Chem. E.* 40(3), 333–336. DOI: 10.1016/j.jtice.2009.02.002
- APHA (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Calvo, L., Gilarranz, M. A., Casas, J. A., Mohedano, A. F., and Rodríguez, J. J. (2007). "Detoxification of kraft pulp ECF bleaching effluents by catalytic hydrotreatment," *Water Res.* 41(4), 915-923. DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.018
- Da Mata, R. A., Silva, C. M., Zanuncio, J. C., and Materazzi, L. B. (2019). "Effects of electrostatic precipitators ash leachate (EPAL) from recovery boilers on the biological treatment of effluent of kraft pulp mills," *Sci. Total Environ.* 659, 905-911. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.413
- Dahalan, F. A., Abdullah, N., Yuzir, A., Olsson, G., Salmiati, S., Hamdzah, M., Din, M. F. M., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Anuar, A. N., et al. (2015). "A proposed aerobic granules size development scheme for aerobic granulation process," *Bioresource Technol.* 181, 291-296. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.062
- Dutta, K., Tsai, C.-Y., Chen, W. H., and Lin, J. G. (2014). "Effect of carriers on the performance of anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating synthetic municipal wastewater," *Int. Biodeter. Biodegr.* 95(Part A), 84-88. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.04.021
- Ebrahimi, S., Gabus, S., Rohbrach-Brandt, E., Hosseini, M., Rossi, P., Maillard, J., and Holliger, C. (2010). "Performance and microbial community composition dynamics of aerobic granular sludge from sequencing batch bubble column reactors operated at 20 °C, 30 °C, and 35 °C," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(4), 1555-1568. DOI: 10.1007/s00253-010-2621-4
- Ghangrekar, M. M., Asolekar, S. R., and Joshi, S. G. (2005). "Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation," *Water Res.* 39(6), 1123-1133. DOI: 10.1016/j.watres.2004.12.018
- Giesen, A., and Thompson, A. (2013). "Aerobic granular biomass for cost-effective, energy efficient and sustainable wastewater treatment," in: *7<sup>th</sup> European Waste Water Management Conference*, Wakefield, United Kingdom, pp. 1-13.
- Hakim, M. H. A., Anuar, A. N., Azmi, S. I., Jamal, N. S. A., Wahab, N. A., Ujang, Z., Shraim, A., and Bob, M. M. (2015). "Aerobic sludge granulation at high temperatures for domestic wastewater treatment," *Bioresource Technol.* 185, 445-449. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.024
- Hakim, M. H. A., Anuar, A. N., Jamal, N. S. A., Azmi, S. I., Ujang, Z., and Bob, M. M. (2016). "Influence of high temperature on the performance of aerobic granular sludge in biological treatment of wastewater," *J. Environ. Manage.* 184(Part 2), 271-280. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.09.079
- Hao, W., Li, Y., Lv, J., Chen, L., and Zhu, J. (2016). "The biological effect of metal ions on the granulation of aerobic granular activated sludge," *Int. J. Environ. Sci.* 44, 252-259. DOI: 10.1016/j.jes.2015.10.031
- Ibrahim, S., Wahab, N. A., Anuar, A. N., and Bob, M. (2017). "Parameter optimisation of

- aerobic granular sludge at high temperature using response surface methodology,” *Int. J. Elect. Comput. Eng.* 7(3), 1522-1529. DOI: 10.11591/ijece.v7i3.pp1522-1529
- Kamali, M., and Khodaparast, Z. (2015). “Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 326-342. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.005
- Lapara, T. M., and Alleman, J. E. (1999). “Thermophilic aerobic biological wastewater treatment,” *Water Res.* 33(4), 895-908. DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00282-6
- Lee, D.-J., Chen, Y.-Y., Show, K.-Y., Whiteley, C. G., and Tay, J. H. (2010). “Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation,” *Biotechnol. Adv.* 28(6), 919-934. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.007
- Li, A.-J., Yang, S.-F., Li, X.-Y., and Gu, J.-D. (2008). “Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates,” *Water Res.* 42(13), 3552-3560. DOI: 10.1016/j.watres.2008.05.005
- Li, X.-M., Liu, Q.-Q., Yang, Q., Guo, L., Zeng, G.-M., Hu, J.-M., and Zheng, W. (2009). “Enhanced aerobic sludge granulation in sequencing batch reactor by  $Mg^{2+}$  augmentation,” *Bioresour. Technol.* 100(1), 64-67. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.06.015
- Liu, X. C., Gao, X., Wang, W., Zheng, L., Zhou, Y., and Sun, Y. (2012). “Pilot-scale anaerobic co-digestion of municipal biomass waste: Focusing on biogas production and GHG reduction,” *Renew. Energy* 44, 463-468. DOI: 10.1016/j.renene.2012.01.092
- Liu, Y.-Q., and Tay, J.-H. (2015). “Fast formation of aerobic granules by combining strong hydraulic selection pressure with overstressed organic loading rate,” *Water Res.* 80, 256-266. DOI: 10.1016/j.watres.2015.05.015
- Liu, Y.-Q., and Tay, J.-H. (2006). “Variable aeration in sequencing batch reactor with aerobic granular sludge,” *J. Biotechnol.* 124(2), 338-346. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.037
- Lochmatter, S., Gonzalez-Gill, G., and Holliger, C. (2013). “Optimized aeration strategies for nitrogen and phosphorus removal with aerobic granular sludge,” *Water Res.* 47(16), 6187-6197. DOI: 10.1016/j.watres.2013.07.030
- Morais, I. L. H., Silva, C. M., Zanoncio, J. C., and Zanoncio, A. J. V. (2018). “Structural stabilization of granular sludge by addition of calcium ions into aerobic bioreactors,” *BioResources* 13(1), 176-191. DOI: 10.15376/biores.13.1.176-191
- Pronk, M., De Kreuk, M. K., De Bruin, B., Kamminga, P., Kleerebezem, R., and Van Loosdrecht, M. C. M. (2015). “Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment,” *Water Res.* 84, 207-217. DOI: 10.1016/j.watres.2015.07.011
- Pronk, M., Neu, T. R., Van Loosdrecht, M. C. M., and Lin, Y. M. (2017). “The acid soluble extracellular polymeric substance of aerobic granular sludge dominated by *Deffluviococcus* sp.,” *Water Res.* 122, 148-158. DOI: 10.1016/j.watres.2017.05.068
- Ren, Y., Ferraz, F., Lashkarizadeh, M., and Yuan, Q. (2017). “Comparing young land fill leachate treatment efficiency and process stability using aerobic granular sludge and suspended growth activated sludge,” *J. Water Process Eng.* 17, 161-167. DOI: 10.1016/j.jwpe.2017.04.006
- Silva, C., Jesus, E., Torres, A. P. R., De Sousa, M. P., Santiago, V. M., and Oliveira, V. M. (2010). “Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches,” *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(3), 447-459. DOI: 10.4014/jmb.0906.06052
- Soerensen, K. H., Rocktäschel, T., Klarmann, C., Ochoa, J., Boisson, P., and Horn, H. (2015). “Influence of the granulation grade on the concentration of suspended solids in the effluent of a pilot scale sequencing batch reactor operated with aerobic granular

- sludge,” *Sep. Purif. Technol.* 142, 234-241. DOI: 10.1016/j.seppur.2015.01.013
- Song, Z., Ren, N., Zhang, K., and Tong, L. (2009). “Influence of temperature on the characteristics of aerobic granulation in sequencing batch airlift reactors,” *J. Environ. Sci.* 21(3), 273-278. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62263-9
- Suvilampi, J., and Rintala, J. (2003). “Thermophilic aerobic wastewater treatment, process performance, biomass characteristics, and effluent quality,” *Rev. Environ. Sci. Bio.* 2(1), 35-51. DOI: 10.1023/B:RESB.0000022959.46025.9a
- Tay, J., Liu, Q. S., and Liu, Y. (2001). “Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor,” *J. Appl. Microbiol.* 9(1), 168-175. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01374.x
- TAPPI (2006). *Testing Procedures of Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, TAPPI Press, Atlanta, USA. 2006.
- Thompson, G., Swain, J., Kay, M., and Foster, C. F. (2005). "The treatment of pulp and paper mill effluent: A review," *Bioresouces Thecnology.* 77(3), 275-286. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00060-2
- Van Lier, J. B., Martin, J. L. S., and Lettinga, G. (1996). “Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile fatty acids by dispersed and granular sludge,” *Water Res.* 30(1), 199-207. DOI: 10.1016/0043-1354(95)00107-V
- Vogelaar, J. C. T., Bouwhuis, E., Klapwijk, A., Spanjers, H., and Van Lier, J. B. (2002). “Mesophilic and thermophilic activated sludge post-treatment of paper mill process water,” *Water Res.* 36(7), 1869-1879. DOI: 10.1016/s0043-1354(01)00397-9
- Wilén, B., Liébana, R., Persson, F., Modin, O., and Hermansson, M. (2018). “The mechanisms of granulation of activated sludge in wastewater treatment, its optimization, and impact on effluent quality,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(3), 5005-5020. DOI: 10.1007/s00253-018-8990-9
- Wilson, L. P., Loetscher, L. H., Sharvelle, S. E., and De Long, S. K. (2013). “Bioresource technology microbial community acclimation enhances waste hydrolysis rates under elevated ammonia and salinity conditions,” *Bioresource Technol.* 146, 15-22. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.06.081
- Yu, H. Q., Tay, J. H., and Fang, H. H. (2001). “The roles of calcium in sludge granulation during uasb reactor start-up,” *Water Res.* 35(4), 1052-1060. DOI: 10.1016/s0043-1354(00)00345-6
- Zhang, B., Xu, X., and Zhu, L. (2017). “Structure and function of the microbial consortia of activated sludge in typical municipal wastewater treatment plants in winter,” *Sci. Rep.* 7, Article number 17930. DOI: 10.1038/s41598-017-17743-x
- Zhang, X., Sun, J., Liu, X., and Zhou, J. (2013). “Production and flocculating performance of sludge bioflocculant from biological sludge,” *Bioresource Technol.* 146, 51-56. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.07.036
- Zheng, Y.-M., Yu, H.-Q., Liu, S.-J., and Liu, X.-Z. (2006). “Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions,” *Chemosphere* 63(10), 1791-1800. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.08.055
- Zheng, M., and Liao, B. Q. (2014). "A comparative study on thermomechanical pulping pressate treatment using thermophilic and mesophilic sequencing batch reactors," *Environmental Technology* 35(11), 1409-1417. DOI: 10.1080/09593330.2013.869623
- Zheng, M. R. and Liao, B. Q. (2016). "Membrane aerated biofilm reactors for thermomechanical pulping pressate treatment," *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 14(5), 1017-1024. DOI: 10.1515/ijcre-2015-0183
- Zitomer, D. H., Duran, M., Albert, R., and Guven, E. (2007). “Thermophilic aerobic granular biomass for enhanced settleability,” *Water Res.* 41(4), 819-825. DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.037



## CAPÍTULO 3

### **Microbiota of Thermophilic Granular Aerobic Sludge for Treatment of Kraft Pulp Mills Effluent**

#### **ABSTRACT**

The thermophilic granular aerobic sludge microbiota for the treatment of effluents from a eucalyptus bleached kraft pulp plant was investigated. Four sequential batch reactors were assembled, and Reactors 1 (R1-FS35) and 2 (R2-FS55) were maintained with flocculent sludge and operated at a temperature of 35 and 55 °C, respectively. Reactors 3 (R3-GS35) and 4 (R4-GS55), maintained with granular sludge, were also operated at a temperature of 35 and 55 °C, respectively. The efficiency of COD removal, EPS production, sludge morphology and the microbiota richness and abundance indices of the bio-sludge were evaluated. All four reactors the overall COD removal efficiency was 68%. The Extracellular Polymeric Substances (EPS) concentrations, as well as the PN/PS ratio, above 1, corroborate the performance of the reactors, demonstrated by the morphological analysis, where the flocculent sludge showed a good development, and the granular sludge showed a good compaction with a diameter frequency distribution between 4 and 8 mm. The microbiota showed high levels of diversity (according to the Shannon index) for the four reactors (R1-FS35 = 4.53; R2-FS55 = 3.35; R3-GS35 = 4.83; R4-GS55 = 3.45), with a prominence of the phyla Planctomycetes (40%), Proteobacteria (28%), Armatimonadetes (9%), Firmicutes (8%), Gemmatimonadetes (5%), Caldiseirica (4%), Chlamydiae (2%) and Acidobacteria (1%). The *Thermus* and *Meiothermus* genera stood out at 55 °C.

**Keywords:** microbiota, *Meiothermus*, *Thermus*, thermophilic aerobic granular sludge.

## 1 INTRODUCTION

Aerobic granular sludge technology has been considered a promising alternative for conventional wastewater treatment applications due to the rapid settling of biomass, allowing the implementation of more compact structures and providing an area requirement 80% lower than conventional systems (PRONK et al., 2015). Aerobic granular sludge technology consists of a new morphology of biological sludge, different from the conventional activated sludge system, where microorganisms are no longer dispersed in the form of flocs, but present larger and more cohesive aggregates in the form of granules (LIU et al., 2004). Aerobic granules are characterized by having regular, strong and compact structures that facilitate their settling ability and a higher resistance to high organic loads and toxic effluents. Aerobic granular sludge has been studied for several functionalities, due to its peculiar forms, and dimensions and greater limitations in the diffusion of dissolved oxygen into the granule. The granules have aerobic and anaerobic zones, which contribute to the presence of microorganisms that can simultaneously effect different biological processes favoring their use for the treatment of effluents with high organic and ammonia (BEUN et al., 2002; LIU et al., 2004; LIU et al., 2012b; QUARTAROLI et al., 2017).

A novel opportunity for the use of granular sludge is the treatment of high temperature industrial effluents. The robustness and good settling rate of granular sludge allows a higher resistance to high-temperature effluents than flocculent sludge and eliminates the cost of effluent pre-cooling systems (SUVILAMPI & RINTALA, 2004; PRONK et al., 2015). There are few studies on the ability to form and maintain aerobic granules under thermophilic conditions. The search for microorganisms capable of aggregating in the form of granules under high temperature conditions constitute an important developmental step for the treatment of industrial effluents (LIU et al., 2012a ; FILHO et al., 2019).

Pulp and paper mills generate high volumes of effluents with high temperature. The use of thermophilic granular sludge in this industrial sector creates the possibility of reducing the area dedicated to the effluent treatment system, eliminating the cooling system and thus reducing costs.

The present study characterizes the microbiota of aerobic granular thermophilic sludge used in the treatment of kraft pulp mill effluent. It also identifies and quantifies the main chemical components of the extracellular polymeric substances produced in the granulation process.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Experimental plan

Four sequential batch reactors (SBR) were used to simulate the treatments. Reactors 1 (R1-FS35) and 2 (R2-FS55) operated with flocculent sludge, indicating the temperatures at which they were operated during the experiment, 35 and 55 °C, respectively.

Reactors 3 (R3-GS35) and 4 (R4-GS55) operated with granular sludge and the addition of 100 mg. L<sup>-1</sup> of Ca<sup>2+</sup> at temperatures of 35 and 55 °C. The Calcium was added to increase the stability of the granules, as recommended by Morais et al (2018).

The SBRs operated with a hydraulic retention time of 12 h. Reactors R1-FS35 and R2-FS55 operated with a settling period of 1 hour. Reactors R3-GS35 and R4-GS55 operated with a settling period of 1 minute. During the operation of all four reactors, the pH was maintained in a neutral range of 6.5 to 7.5. The dissolved oxygen (DO) in all reactors was maintained above 2 mg.L<sup>-1</sup>. Nitrogen and phosphorus were added at the COD:N:P ratio of 250: 5: 1.

The sludge sample used as an inoculum to initialize the microbial communities in the system was collected in the recirculation line of the activated sludge system used for the treatment of effluent from a kraft pulp mill. The aerobic granules (R3-GS35 and R4-GS55) were previously obtained under mesophilic conditions (35 °C) (MORAIS et al., 2016). For Reactor R4-GS55 the temperature was gradually increased until reaching the temperature of 55 °C. The SBRs were fed with industrial effluent from a bleached eucalyptus kraft pulp mill. After acclimatization, the reactors were operated for a period of 150 days.

The efficiency of removing the chemical oxygen demand (COD) was assessed weekly for all conditions. At the end of the experimental period, the microbiological characterization by DNA extraction and sequencing and the quantification of extracellular polymeric substances (EPSs), and morphological characterization (digital microscopy) were carried out.

### 2.3 Physical, chemical and microbiological analysis

#### 2.3.1 Physicochemical characterization

The physical-chemical parameters analyzed were COD (method 5220D), BOD and DO by the respirometry test (method 5220B), and solids concentration (methods 2504B, C, D and E), all based on the methodology described in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012), as well as the procedures for collection, preservation and pretreatment of the samples (APHA 2012). The pH was measured using the HACH HQ40D portable multi-meter.

### 2.3.2 Quantification of extracellular polymeric substances-EPSs

The chemical characterization of the extracellular polymeric substances (EPSs) produced was performed through the analysis of the carbohydrates, proteins, and humic acids (XUAN, et al., 2010; ALBALASMEH et al., 2013)

For the extraction of EPSs from sludge samples, 1 mL of each sample was transferred to microtubes (2.0 mL), centrifuged (11200 xg, 4 °C, 15 min) and the supernatant was collected and stored in another microtube for quantification of free EPSs. The pellets were re-suspended in 20 mL of phosphate buffer, and the pH adjusted to 11, by adding NaOH 1M, after heating in a water bath (80 °C, 30 min). Then, a new extraction stage was performed, the samples were centrifuged (11200 xg, 4 °C, 10 min) and the supernatant stored for analysis of the linked EPSs (MCSWAIN, et al., 2005).

For carbohydrate quantification, 0.25 mL of phenol (5 %) and 1.25 mL of sulfuric acid were added to 0.5 mL of each sample. After 10 minutes, the tubes were shaken and placed in an ice bath for 20 minutes. The calibration curve using sucrose (0 - 1.0 mg.mL<sup>-1</sup>) was used as a standard. The absorbance readings were performed in a spectrophotometer (Hach DR2800) at 490 nm.

The modified Lowry Method (FRØ LUND et al., 1996) was used to quantify proteins and humic acids, for which the preparation of two reagents (A and B, respectively) was required. Reagent A was produced by adding 3 solutions in the ratio of 1:1:100, i.e., 10 g CuSO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>; 20 g KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O.L<sup>-1</sup> and 3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup> of NaOH 0.35 N. Reagent B was produced with a composition similar to that of Reagent A, except for the replacement of the CuSO<sub>4</sub> solution by deionized water. The Folin Ciocalteu reagent (2 N), diluted 10 times, was also used in the reactions. The reagents were added in the following sequence: the sample, Reagent A, and the Folin reagent, at a ratio 1:1:1. The mixture was shaken, and after 30 minutes the spectrophotometer readings were performed at 750 nm. The same procedure

was performed with Reagent B. A calibration curve of 0-1.0 mg.mL<sup>-1</sup> of albumin was used as a standard.

The determination of the concentrations of proteins present was carried out using Equation 1.

$$\text{Abs (Absorption) proteins} = 1.25 \times (\text{AbsA} - \text{AbsB}) \quad \text{Eq. 1}$$

The determination of humic acids in the samples was estimated using Equation 2.

$$\text{Abs humic acids} = \text{AbsB} - (0.2 \times \text{Abs proteins}) \quad \text{Eq. 2}$$

### 2.3.3 Morphological characterization

A digital microscope with magnification potential of up to 1600x (VASTAR, USB Microscope- 258410218) was used. To produce images and observation of morphological physical characteristics, a calibrator micrometer was used to project the scale, which was performed using the ImageJ software (SCHNEIDER et al., 2012). The images were produced using sludge samples from reactors R1-FS35, R2-FS55, R3-GS35 and R4-GS55. The samples were analyzed without any previous treatment.

The diameter of the granules was determined using the ImageJ software (NIH, 1.51K, Bethesda, MA, USA, RASBAND, 2017) with the processing of photographic images of the sludge on a Petri dish, positioned next to a graduated ruler (SCHNEIDER et al., 2012). The determination of the diameter was only performed for reactors R3-GS35 and R4-GS55, which produced granules.

### 2.3.4 Microbiological characterization of thermophilic aerobic granules

To characterize the microbial communities, the total DNA of the samples was extracted according to the protocol described in Silva et al., (2010). After the extraction, the samples were quantified and submitted to electrophoresis in 1% agarose gel in a Tris Borate EDTA 1X buffer to verify the purity and quality of the extracted material. The samples were lyophilized and sent for sequencing at MR. DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA). The genomic DNA of the samples was sequenced with the use of primers 27f/338r for the Bacteria Domain for the variable region V1-V2 of the RNAr 16S gene. Sequencing was performed using the MiSeq platform (Illumina), following the manufacturer's guidelines.

Sequence data were processed using the "MR. DNA analysis pipeline," where sequences smaller than 150 bp (base pairs) and duplicates were removed. The OTUs

(operational taxonomic units) were then defined by grouping in 3% of evolutionary divergence (97% similarity) and taxonomically classified using BLASTn against a database derived from the NCBI and RDP II ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), <http://rdp.cme.msu.edu>).

The OTU table generated was used for cluster analysis with the Bray-Curtis similarity index, whose values range from 0 to 1, and diversity indexes. The Venn diagram was designed to compare the generated OTUs with the help of the tool available on the <http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn> webpage (BARDOU et al., 2014). In order to evaluate the diversity index, the Past computer program (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>) was used.

### 2.3.5 Statistical test

The results (physical, chemical, and microbiological) obtained were submitted to an analysis of variance and the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ), using the R software (R Development Core Team, 2017) in the data processing.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Performance of the reactors

The effluent used in this study presented typical characteristics of effluents from bleached kraft pulp mills (RINTALA and LEPSTO, 1993). The average concentration of COD and BOD was 1309 and 530 mg.L<sup>-1</sup>, respectively, and a BOD/COD ratio of approximately 0.40 (MORAIS, et al., 2018; Da MATA, et al., 2019) was observed, with a high potential for biological treatment (Table 1).

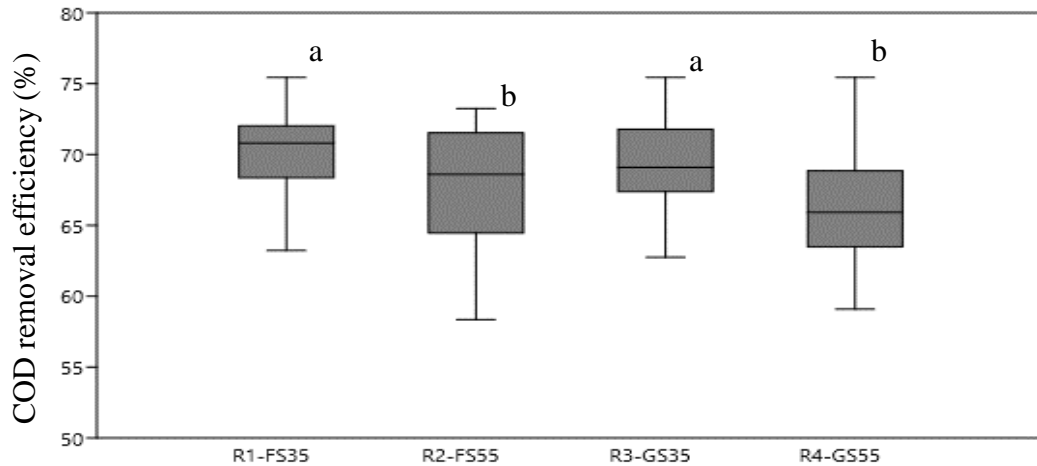
Table 1 - Characterization of the effluent from a bleached kraft pulp mill.

Parameter	COD (mg.L <sup>-1</sup> )	BOD <sub>5</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	TSS (mg.L <sup>-1</sup> )	VSS (mg.L <sup>-1</sup> )
Value	1309 ± 75	530 ± 93	185 ± 13	114 ± 20

The mean concentration of total suspended solids was 185 mg.L<sup>-1</sup> with 62% organic compounds (114 mg.L<sup>-1</sup> of volatile suspended solids -VSS).

Figure 1 shows the efficiency of COD removal in the reactors during the experiment.

**Figure 1-** COD removal efficiency in thr reactors (150 days).  
a,b- statistical comparison, 95% confidence interval.



COD removal efficiencies were higher in the treatments at 35 °C when compared to the treatments at 55 °C. The increase in temperature in biological reactors changes their characteristics, reducing biological diversity, which may result in reduced performance of the treatment system (REDDY et al., 2005; SOUZA et al., 2011; COLE et al., 2013). When comparing the COD removal efficiencies of reactors operated with flocculent sludge, it is observed that at a temperature of 55 °C (R2-FS55) there was a greater variability in the efficiencies (64 to 73%).

The effect of temperature on COD removal efficiency for the treatment of effluents from pulp mills has been pointed out by Tripathi and Allen (1990), who observed a 13% reduction in the thermophilic (55 °C) treatment when compared with a temperature of 35 °C. Souza et al (2011) observed a decrease of 6% in the removal of COD between reactors at 35 °C and 55 °C. On the other hand, Suvilamp and Rintala (2004), did not observe significant differences in COD removal for the treatment of pulp mill effluents between the temperatures of 35 °C and 55 °C. There are, therefore, divergences that can be attributed to the type of treated effluents and the operating parameters adopted.

The results of the present study corroborate those of Dias et al. (2004) and Reddy et al. (2005), who also pointed out a greater variability in treatment systems operated at higher temperatures and a decline in the COD removal efficiency at higher temperatures.

The granular sludge at 55 °C showed an average COD removal lower than the granular sludge at 35 °C (63 and 69%, respectively). The possible reason for the reduction in efficiency can be explained by the variation in the richness and abundance of organisms between the mesophilic and thermophilic systems, which vary due to the temperature difference (SOUZA et al., 2011; COLE et al., 2013). Another factor that can affect the efficiency of COD removal with the temperature increase is the reduction of biomass concentration in the reactor (DIAS et al., 2004).

The variation in the efficiencies in both reactors with granular sludge, at 35 and 55 °C was similar, as well as the maximum removal efficiency value, which was equal to 75%, after 21 days.

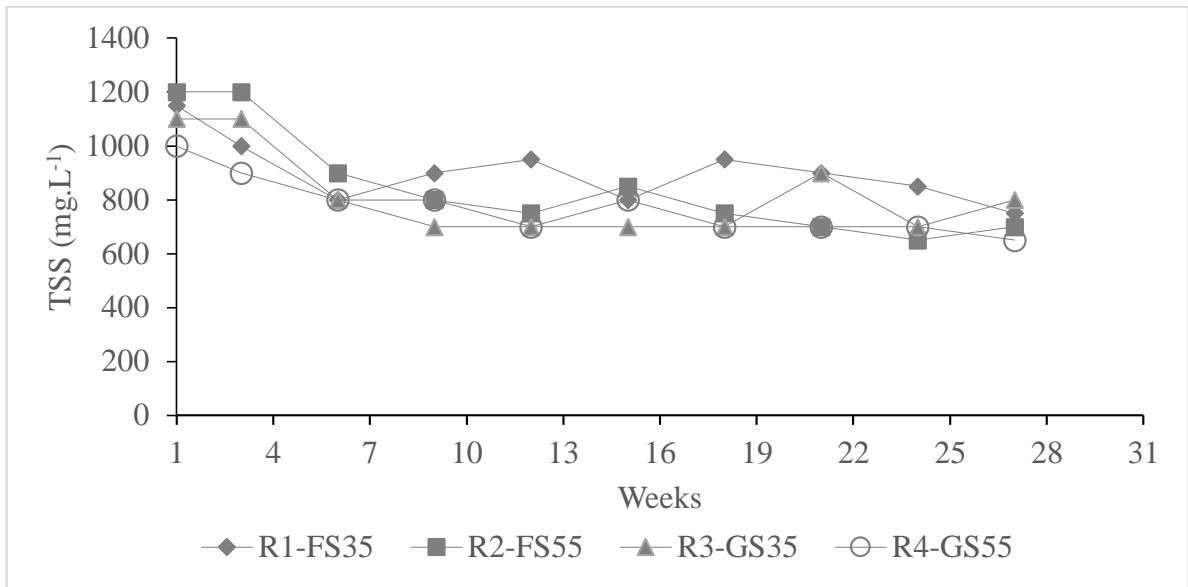
Comparing the COD removal efficiencies between flocculent sludge and granular sludge reactors, for the same temperatures, no statistically significant differences were observed. Although there are significant differences in sludge morphology, there were no effects on the removal of organic matter. Similar results were observed by Suvilampi and Rintala (2004), who showed similar removal efficiencies for flocculent and granular sludge reactors.

The comparison between the thermophilic treatments showed that the granular sludge (R4-GS55) was more stable than the flocculent sludge (R2-FS55), with an average removal efficiency of 67 and 69%, respectively for R4-GS55 and R2-FS55.

The overall efficiency of COD removal was 68%, typical of the aerobic treatment of pulp mill effluents by conventional mesophilic systems (SUVILAMPI e RINTALA, 2004; KAMALI e KHODAPARAST, 2015; MORAIS, et al., 2018; DA MATA, et al., 2019).

Figure 2 shows the profile of the TSS concentration in the reactors over the period of the experiment.

**Figure 2-** Total suspended solids inside the reactors.



The concentration of SST in the reactors showed an overall average of  $844 \pm 50$   $\text{mg.L}^{-1}$ , with a minimum value of  $775 \text{ mg.L}^{-1}$  in Reactor R4-GS55. This variation does not represent a statistically significant difference.

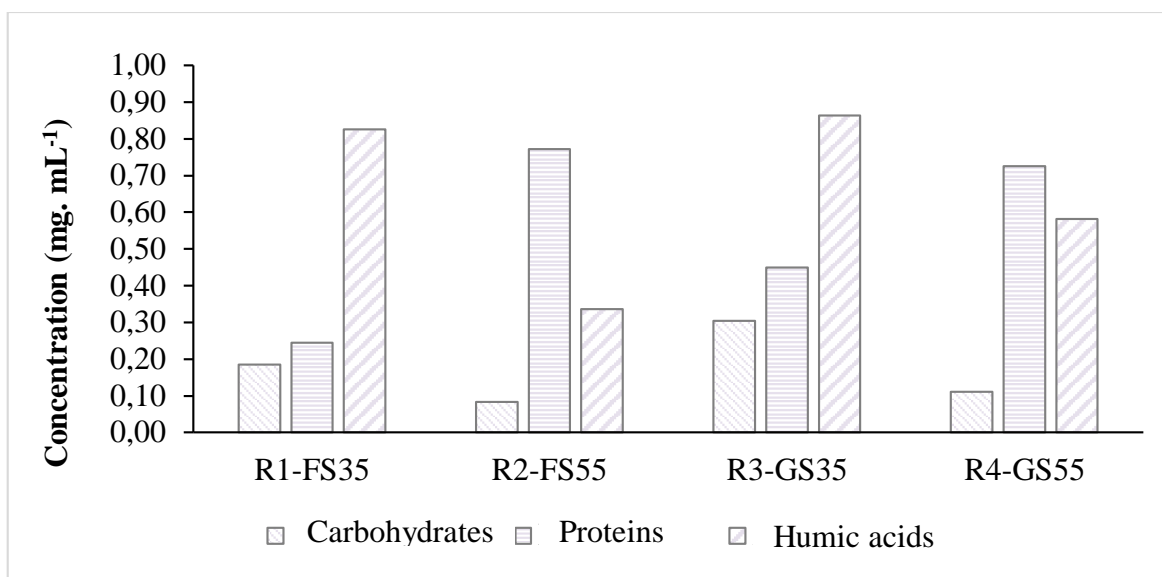
A reduction in solids concentration was observed between the first and the last week of the experimental period. Suvilampi and Rintala (2004) point out that the thermophilic treatment tends to present a lower rate of sludge generation and Dias et al (2004) explain that the possible reason for the reduction of biomass concentration in the reactor at high temperature is due to the fact that the cells of the microbial organisms start using a larger fraction of energy to maintain their vital functions and not just to synthesize new cellular material.

Although there was a small variation in the concentration of solids in the reactors over the period of the research, the results did not agree with the claim of Suvilampi and Rintala (2004), since the variation occurred similarly for all reactors. The variation of solids occurred independently of the type of sludge (granular and flocculent) and the operating temperature (35 and 55 °C).

### 3.2 Determination of extracellular polymeric substances (EPSs)

The production of extracellular polymeric substances (EPSs) was determined (Figure 3).

**Figure 3-** Quantification of extracellular polymeric substances from the biological sludge aggregates of the four reactors.



The production of carbohydrates and proteins was higher at the thermophilic temperature (55 °C) than at the mesophilic (35 °C) specially for the granular sludge (R4-GS55). The relationship of higher production of carbohydrates and proteins with higher temperatures agrees with the descriptions of Aquino and Stuckey (2005), who related the higher production of EPSs to stress conditions of the microbiota in the treatment reactor. Gao et al., (2011) and Wang et al., (2014) report other stress conditions such as shock loads or sudden changes in operating parameters, that can stimulate EPSs production.

Carbohydrates are hydrophilic components of the EPSs. Excess carbohydrates can result in an increase in the zeta potential and impair the formation of granules (TU et al., 2010). Proteins are hydrophobic, and they are found in greater quantity, acting in the opposite direction, neutralizing the action of carbohydrates, thus favoring the formation of the structural stability of granules (LONG et al., 2015; MCSWAIN et al., 2005; TU et al., 2010).

It was observed that the protein content exceeded the carbohydrate content in all conditions studied (Fig. 3). According to Liu et al., (2004), this relationship between EPSs production is positive and contributes to a better aggregation of biological sludge. The rate of EPS production favors the occurrence of the aggregation of sludge in the reactors, even at high temperatures.

While there was an increase in the production of carbohydrates and proteins at a higher temperature, the production of humic acids showed an opposite result. There was a

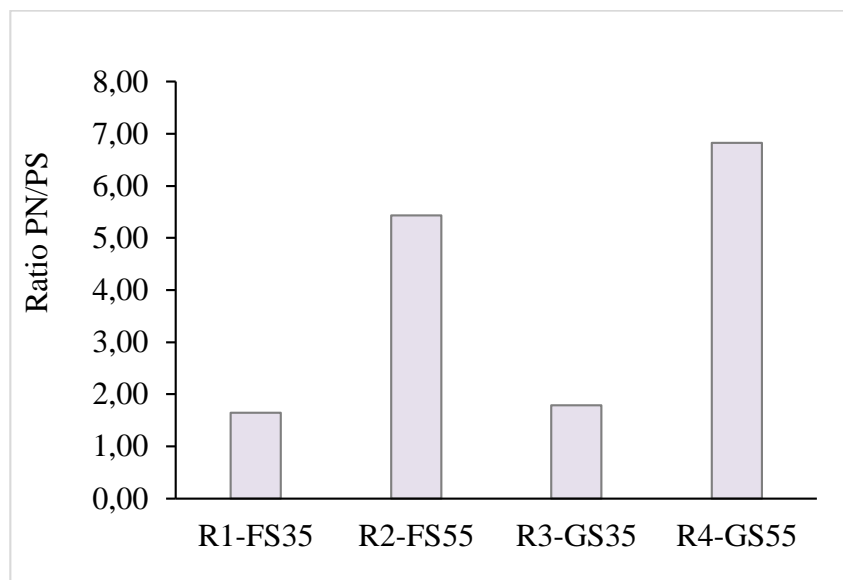
tendency for humic acids to be reduced under thermophilic conditions, especially in the flocculent sludge (R2-FS55). The production of humic acids is important for the aggregation of microorganisms, both in flocs and granules (R1-FS35, R3-GS35 and R4-GS55) (GAO et al., 2011; WANG et al., 2014). The increase in the temperature led to a drastic decrease in humic acid production in the flocculent sludge at 55 °C, which showed a reduction of 62%. In the granular sludge (R4-GS55), the same tendency was observed, but without the same intensity.

Increasing the reactor temperature, the EPSs layer had a more stable structure when the sludge was in the form of granules (Figure 3). Nevertheless, in addition to the reactor's operating conditions, the amount of EPSs depends on the composition of the microbial community present in the biological sludge (ZHU et al., 2012).

Bacterial populations belonging to the genera *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Agrobacterium* and *Rhodobacter* have been reported to contribute actively to the production of EPSs, helping both in the granulation process and in the maintenance of the aggregates (LV et al., 2014; HUANG et al., 2012).

One way to quantify the stability of granule formation is through the ratio of proteins (PN) to polysaccharides (PS). Values of the PN/PS ratio of less than 1 indicate the susceptibility to disaggregation (JIANG et al., 2002; LIU et al., 2004). In the present study, values of the PN/PS ratios were always higher than 1, and even higher in thermophilic conditions, indicating a good formation and stability of the aggregates (Figure 4).

**Figure 4-** Protein/polysaccharide ratio of biological sludge aggregates in the reactors.



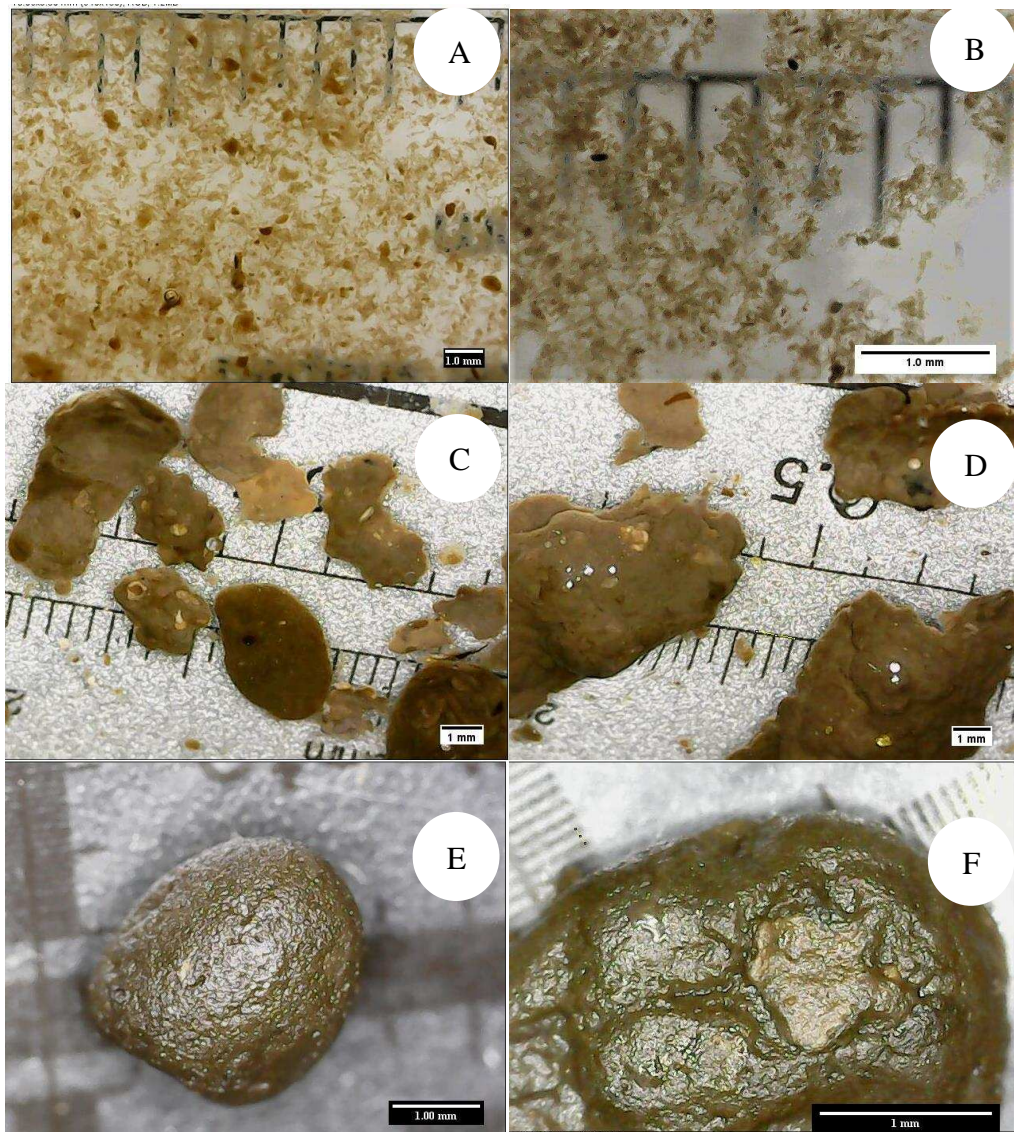
The concentrations of extracellular polymeric substances and the PN/PS ratios observed in the present study contributed positively both aggregation and reactor performance (GAO et al., 2011; HUANG et al., 2012; WANG et al., 2014).

### 3.3 Sludge morphology

The quality of the formed sludge in relation to the structure and cohesion of granules can be verified through morphological analysis (Figure 5).

**Figure 5-** Morphological aspects of granular aerobic sludge

A- Flocculent Sludge (R1-FS35); B- Flocculent Sludge (R2-FS55); C- Granular Sludge (R3-GS35); D, E and F- Granular Sludge (R4-GS55).



The flocculent sludge (Figures 5A and B) was well formed with a compact appearance and without signs of swelling sludge (JENKINS et al., 2004), which suggests a good balance of the microbial community in the sludge, corroborating the results obtained for EPSs production (Figure 3, R1-FS35 and R2-FS55).

Wilén and Balmér (1999) pointed out that a high concentration of dissolved oxygen (DO) leads to the formation of larger and more compact flocs. In the present study, the DO was kept at a residual DO level above  $2 \text{ mg.L}^{-1}$ .

According to Tay et al. (2004), a high rate of aeration increases the shear strength and favors the formation of strong, compact, dense, and rounded granules. Still from the perspective of operational parameters, Wang et al. (2005) states that short operational cycles (3h) lead to a faster granulation process, resulting in exceptionally large and unstable granules.

Good sludge formation also depends on the adequate balance between the floc-forming and filamentous bacteria (JENKINS et al., 2004). A well-formed floc results in a good sludge settling capacity (WILÉN and BALMÉR, 1999; RICHARD et al., 2003).

Based on the morphology, it was not possible to identify any visible effect related to the temperature on the flocculent sludge structure (Figure 5 A e B).

The differences between flocculent sludge (Figure 5 A and B) and granular sludge (Figure 5 C, D, E and F) are clearly visible. In flocculent sludge, it is practically impossible to observe discrete particles. The dimensions of the flocs are smaller than 1 mm, while the sludge has been observed to behave as a sludge blanket (SNIDARO et al., 1997; JORAND et al., 1995). The authors of the previous research cited here observed the formation of microflocs with structures of as little  $125 \mu\text{m}$  in diameter.

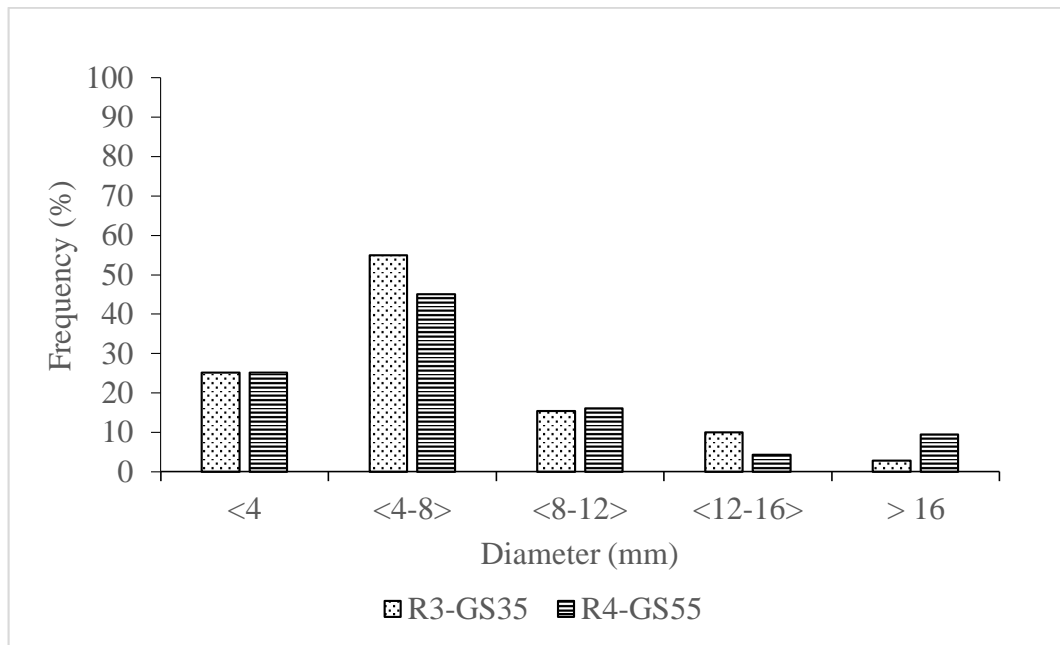
In the granular sludge, it was possible to observe granules with rounded and shaped patterns and a dense, cohesive appearance, typical characteristics of granular sludge (LIU and TAY, 2002; YANG et al., 2004). The morphology of the granules reinforces the results of the EPS analysis and the PN/PS ratios, which demonstrated a good sludge formation in the Reactors R3-GS35 and R4-GS55 (WEBER et al., 2007). Other factors related with a good granular sludge formation refer to the aeration rate, the hydraulic retention time, the food/microorganism ratio (F/M) and the settling time (TAY and YAN, 1996; BEUN et al., 2002; TAY et al., 2004; NI et al., 2009; MORAIS et al., 2018). Prolonged aeration cycles (more than 12 hours) result in small granules. The settling time is an important operational parameter that plays a fundamental role in the selection of the microbiological community (LIU and TAY, 2004), which was identified as the main mechanism that favors the formation

of granules in the reactor (HUBNER, 2008). Thus, the settling time is the most important parameter for maintaining the stability of granular aerobic sludge (LIU et al., 2010).

The combination of a short settling time and a short duration of the aeration cycle generates a strong hydraulic selection pressure on the microbes, facilitating the formation of aerobic granules (LIU et al., 2010).

The distribution of the average diameter of the granules in the granular reactors is shown in Figure 6.

**Figure 6-** Relative distribution of the average diameters of the granules in the reactors.



The average granule diameter for both reactors R3-GS35 and R4-GS55 had a higher frequency in the range of 4 to 8 mm. It is possible to notice an effect of the temperature on the granule diameter. Reactor R3-GS35 had 55% of the granules in the range of 4 to 8 mm in diameter, while Reactor R4-GS55 had only 45% of the granules in the same range of diameter. However, it is interesting to notice that Reactor R4-GS55 had a higher frequency of granules with a diameter above 16 mm.

The average granule diameter found in the present research agrees with the results of Morais et al. (2018) and Huang et al. (2012), although these authors studied the physical characterization of aerobic granular sludge under mesophilic conditions. The results obtained for R4-GS55, under thermophilic conditions, are similar to the granules created under mesophilic conditions, showing the ability of the granules to withstand higher temperatures while maintaining their formation and physical stability.

### 3.4- Diversity of prokaryotes in biological sludge

The Shannon, Berger-Parker and Chao1 indexes were applied to estimate the species diversity, the dominance, and the species richness respectively, of the RNAr 16S gene obtained from libraries. Table 1 shows, through the Shannon index, that microbial diversity was primarily affected by the temperature variation, for which, the treatments at the temperature of 35 °C presented higher diversity, since the interpretation of the Shannon index permits the conclusion that a greater value leads to a higher species diversity (MAGURRAM, 2004; SILVA et al., 2010).

**Table 1-** Microbial diversity indices of prokaryotes in different treatments

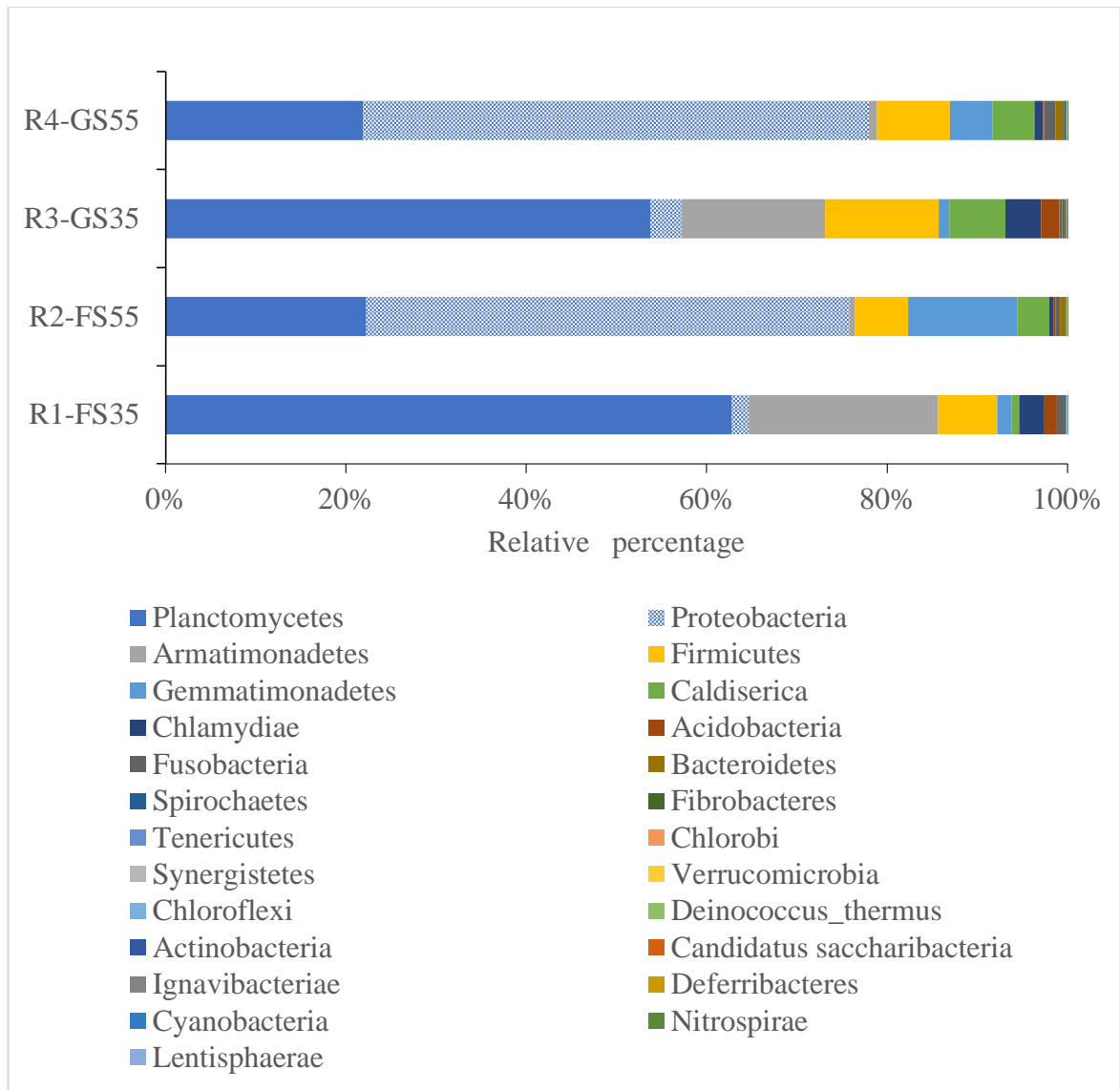
Treatments	Total OTU's	Shannon	Berger-Parker	Chao-1	Coverage
R1-FS35	111.621	4,534	0,151	1.801	77,67
R2-FS55	132.021	3,357	0,349	1.554	73,22
R3-GS35	167.599	4,820	0,094	1.985	83,34
R4-GS55	199.214	3,454	0,381	1.733	76,24

The aggregation structure of the sludge did not produce any relevant difference among the diversity indexes, where, at 35 °C, the flocculent sludge (R1-FS35) and the granular sludge (R3-GS35) presented indexes of 4.534 and 4.820, respectively, while at at 55 °C, the Shannon indexes were lower, 3.357 for flocculent sludge (R2-FS55) and 3.454 for granular sludge (R4-GS55). Despite the negative effect of the temperature, the diversity indexes found for all four reactors were considered high, as reported by Magurram (2004).

All four reactors showed low dominance. The Berger-Parker indexes showed that the treatments with the highest diversity indexes had less dominance and vice versa (MAGURRAM, 2004). However, under higher temperatures conditions, a greater dominance was observed when compared to the mesophilic condition, showing that in the thermophilic condition there was a selection of organisms adapted to this condition.

The measured microbial diversity was taxonomically detailed at the level of phyla and genera for the four reactors. For All four reactors Bacteria Domain were classified into 27 phyla. The most abundant were Planctomycetes (40%), Proteobacteria (28%) Armatimonadetes (9%), Firmicutes (8%), Gemmatimonadetes (5%), Caldiserica (4%), Chlamydiae (2%) and Acidobacteria (1%) as shown in Figure 7. The list of the phyla which were observed to be more abundant agrees with the results obtained by Zhang et al. (2015) for activated sludge systems and by Cydzik-Kwiatkowska (2015) when studying the aerobic granular sludge microbiota.

**Figure 7-** Relative percentage of the occurrence of bacterial phyla observed in the flocculent and granular sludge microbiota at temperatures of 35 and 55 °C.



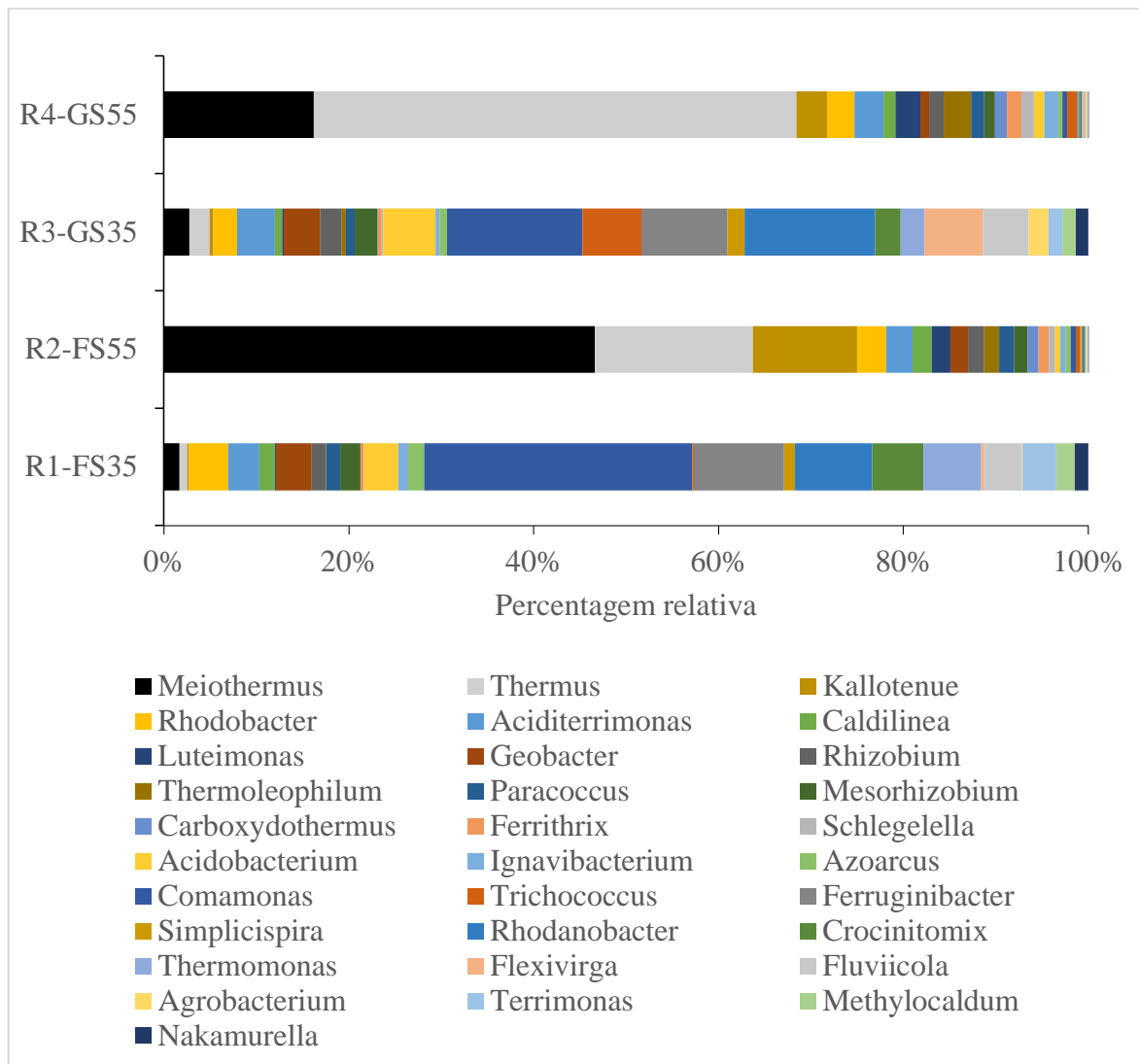
Although the most abundant phyla were the same among the different treatments, the profile was grouped by temperatures since there was a greater similarity between the granular and flocculent sludge in the reactors operated at the same temperature. The relative abundance of the phyla Planctomycetes, Armatimonadetes, Chlamydiae and Acidobacteria was reduced, while Proteobacteria and Gemmatimonadetes stood out in the treatments at 55 °C. Organisms pertaining to the phyla Planctomycetes, Armatimonadetes, Chlamydiae, Acidobacteria and Proteobacteria act as functional groups with potential for degradation of organic matter and nutrients (YANG et al., 2011; ZHU et al., 2014). The presence and the functional role of these organisms under each operating condition, indicates their

equivalence in the effective removal of COD, since it remained above 65% for all reactors, even with the observed change between the relative abundance for the treatments at different temperatures.

The results agreed with those reported by Ou et al. (2018), Yang et al. (2020) and Yu et al. (2019) when studying the microbiota present in an aerobic activated sludge treatment system. Other studies have also shown that bacteria belonging to these phyla (Planctomycetes, Armatimonadetes, Chlamydiae, Acidobacteria and Proteobacteria) also play an important role in the aerobic treatment processes (OU et al., 2018; YU et al., 2019). Bacteria belonging to the phylum Proteobacteria play an important role in the sludge granulation process, assisting the stability and the formation of granular sludge, although its predominance is more pronounced at high temperatures (ZHU et al., 2014).

A total of 571 genera were observed in the sludge of the four evaluated reactors. A large number of these genera have commonly been found among the microbiota of both flocculent and granular sludge of thermophilic treatment systems (CYDZIK-KWIATKOWSKA, 2015; ZHANG et al., 2015). As observed in the phylum profile, the temperature selected the richness of the genera observed among the treatments. However, at this level, it was possible to notice a different pattern in the abundance of the more dominant genera, in response to the form of aggregation of the sludge (Figure 8).

**Figure 8-** Relative percentage of each genus observed in the microbiota of flocculent and granular sludge, at temperatures of 35 and 55°C.



Amongst the most abundant, the genera *Meiothermus*, *Thermus*, *Kallotenue*, *Comamonas*, *Ferruginibacter* and *Rhodanobacter* are part of the group with relative distribution above 1%. In this group of genera, one can clearly observe their profile in each treatment condition evaluated. However, bacteria of the genera *Meiothermus* and *Thermus* dominated at 55 °C, despite the different abundances between flocculent and granular sludge. Bacteria belonging to the genus *Meiothermus* are aerobic gram-negative microorganisms, variable in length and often in the form of short filaments, whose ideal growth conditions vary within a moderate temperature range (50-65 °C), compatible with the range of operation temperatures of the reactors in which they stood out. Such organisms contribute to the aggregation of bacteria and the maintenance of the stability, both for flocs and

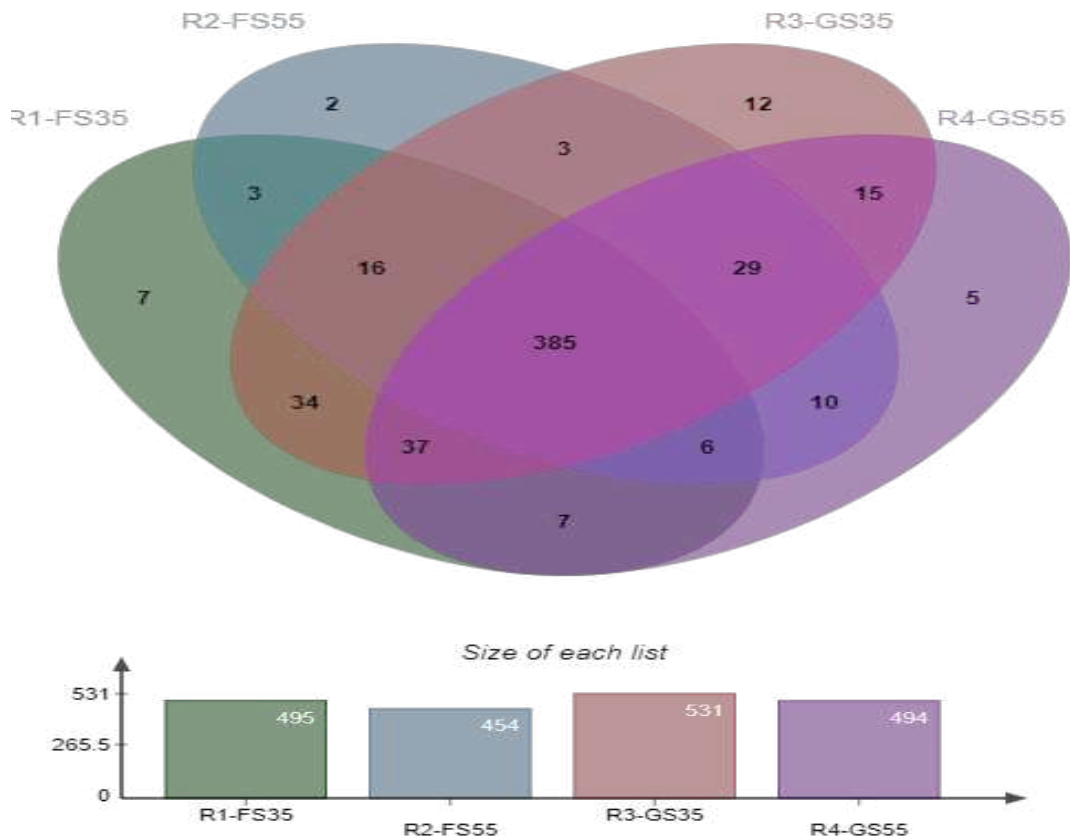
granules. According to Masurat et al. (2005) they are biofilm-forming bacteria with a high adherence capacity. In addition, they are oxygenated chemoheterotrophic organisms, which use organic substrates such as starch, hexoses, pentoses, disaccharides, amino acids and organic acids as a source of carbon and energy (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Bacteria of the genus *Thermus* are classified within the group of extremophilic thermophilic organisms, which act on the degradation of organic compounds (MING et al., 2014). The presence of the *Meiothermus* in R2-FS55 and *Thermus* in R4-GS55 contributed to justify the maintenance of the aggregates formed and the high COD removal rate.

In particular, organisms of the genus *Kallotenue* (9.5% for R2-FS55 and 3% for R4-GS55) had a greater prominence at the temperature of 55 °C, regardless of the sludge morphology, highlighting the influence of temperature on the relative abundance of the microorganisms. The results of the study by Cole et al. (2013) emphasize that *Kallotenue* organisms have a range of optimal development at temperatures from 45 to 65 °C, with an ideal temperature of 55 °C. Another important characteristic reported by the authors is that *Kallotenue* bacteria are heterotrophic aerobic, which developed on a substrate of glucose, sucrose, xylose, arabinose, cellobiosis, M-cellulose, microcrystalline cellulose, xylan and starch (COLE et al., 2013). In view of the nature of the current effluent used to feed the reactors, the presence of the *Kallotenue* organisms at a temperature of 55 °C is expected and, in addition, contributed to the maintenance of the COD removal rate, even at higher temperatures.

At a temperature of 35°C, three genera were predominant: *Comamonas*, *Ferruginibacter* and *Rhondanobacter*, in the respective proportions of 20%, 7% and 6% in the flocculent sludge and 10%, 7% and 10% in the granular sludge. Therefore, at this temperature, the aggregation of sludge does not have a strong impact on the composition of the most abundant genera.

The Venn diagram (Figure 9), based on information concerning the presence and abundance of bacterial genera in the reactors, shows the uniqueness of each reactor and the harmony between the different reactors regarding the diversity of bacteria. It was observed that, in Reactor R1-FS35, seven genera were unique to this operating condition of flocculent sludge at a temperature of 35°C. In Reactor R2-FS55, only two genera stood out for the flocculent sludge, at 55 °C. In the granular sludge reactors, twelve exclusive genera stood out in Reactor R3-GS35 and five in Reactor R4-GS55 (Table 2).

**Figure 9-** Venn Diagram**Table 2-** Exclusive genera in the sludge of each reactor.

R1-FS35	R2-FS55	R3-GS35	R4-GS55
Phytoplasma	Anaerobranca	Ariskella L	Janibacter
Cardiobacterium,	Caldalkalibacillus	Methylomonas	Thermoactinomyces
Conchiformibius		Solimonas	Metachlamydia
Arsenophonus		Cystobacter	candidatus
Nitratifactor,		Mycoplasma	Tepidibacillus
Chelativorans		Micavibrio,	Gluconobacter
Buchnera,		"Micavibrio".	
Pennsylvania		Thioclava	
		Empedobacter	
		Intestinimonas	
		Dethiosulfovibrio	
		Inquilinus	
		Algoriphagus	

The genera of the exclusive group for Reactor R4-GS55 belong to the phyla Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria, which were highlighted for containing bacteria that pertain to functional groups of great importance to effluent treatment, such as

the *Gluconobacter* belonging to the phylum of Proteobacteria. They act in the degradation of organic compounds (SPITAELS et al., 2014) and in the production of EPSs. They occurred in a remarkable abundance favoring the process of formation and maintenance of biological aggregates (LV et al., 2014; HUANG et al., 2012).

It was also observed that granular sludge Reactors R3-GS35 and R4-GS55 presented 15 genera in common, i.e., these genera may be involved in the formation and resistance of granules.

#### 4- CONCLUSIONS

The treatment using thermophilic granular sludge achieved COD removal efficiencies similar to those under mesophilic conditions.

The EPSs, in all four reactor (granular and flocculent at both 35 and 55 °C) were produced in adequate proportions for the aggregation of the microbial sludge, mainly in Reactor R4-GS55, with granular sludge at a temperature of 55 °C.

The PN/PS ratio of the EPSs produced favored the formation of aerobic granular sludge, which morphologically presented a shaped pattern with rounded faces and cohesive structure.

The sludge granules under both mesophilic and thermophilic conditions had an average diameter between 4 and 8 mm, indicating that the granulation process and the maintenance of the granules occurred similarly and satisfactorily in both temperature conditions.

All four treatments had a high Shannon index, although those operated at 55 °C had a smaller microbial diversity, reflecting the dominance of some groups observed at 55 °C. In general, the profile of phyla and genera were grouped by different temperatures. Additionally, it was possible to verify an inversion in the abundances of the dominant genera in relation to the form of aggregation of aerobic granular sludge.

The phyla Planctomycetes (40%), Proteobacteria (28%), Armatimonadetes (9%), Firmicutes (8%), Gemmatimonadetes (5%), Caldiserica (4%), Chlamydiae (2%) and Acidobacteria (1%) were the most abundant in the four evaluated treatments. The genera

Thermus and Meiothermus stood out at 55 °C, due to their greater ability to adapt to high temperatures.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was funded in part by the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES) - Financial Code 001. In addition, the authors would like to thank CNPq and FAPEMIG for their support in this research.

## REFERENCES

- Albalasmeh, A. A; Berhe, A. A; Ghezzehei, T. A. (2013) “A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry”. *Carbohydrate Polymers*. v. 97, n. 2, p. 253–261, DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.04.072
- Albuquerque, L; Rainey, F. A; Nobre, M.F; Costa, M.S. (2010) “*Meiothermus granaticus* sp. nov., a new slightly thermophilic red-pigmented species from the Azores”. *Systematic and Applied microbiology*. V.33. p. 243-246.DOI: 10.1016/j.syapm.2010.04.001
- Bardou, P; Mariette, J; Escudié, F; Djemiel, C; Klopp, C. Software. (2014) “Open Access jvenn: an interactive Venn diagram viewer”. *BMC Bioinformatics*, v. 15, n. 293, p. 1–7. DOI: 10.1186/1471-2105-15-293
- Beun, J. J.; Loosdrecht, M. C. M. Van; Heijnen, J. J. (2002) “ Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor”. *Water Research*. v. 36, n. p. 702–712. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00250-0
- Cao, L. Zhu; X. Dai ; X. Xu ; M. Lv ; D. (2014) “Microbial community analysis for aerobic granular sludge reactor treating high-level 4-chloroaniline wastewater”. *International Journal of Environmental Science and Technology*. p. 1845–1854. DOI: 10.1007/s13762-013-0380-3
- Cole, J. K; Gieler, B. A; Heisler, D. L; Palisoc, M. M; Williams, A. J; Dohnalkova, A. C; Ming, H; Yu; T. T; Dodsworth, J. A; Li, W; Hedlund, B. P. (2013) “*Kallotenua papyrolyticum* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic and filamentous thermophile that represents a novel lineage (Kallotenuales ord. nov., Kallotenuaceae fam. nov.) within the class Chloroflexia”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V.63, P. 4675–4682. DOI: 10.1099/ijs.0.053348-0
- Cydzik-Kwiatkowska, Agnieszka. (2015) “Bacterial structure of aerobic granules is determined by aeration mode and nitrogen load in the reactor cycle”. *Bioresource Technology*. v. 181, p. 312–320. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.101
- Da Mata, R. A; Silva, C. M; Zanuncio, J. C; Materazzi, L. B. (2019) “Effects of electrostatic precipitators ash leachate (EPAL) from recovery boilers on the biological treatment of effluent of kraft pulp mills”. *Science of the Total Environment*. v. 659, DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.12.413
- Filho, N. P; Dias, J. C. T; Silva, C. M; Rezende, R. P. (2019) “Treatment of Effluent of the Cellulose and Paper Industry Using Aerobic Granular Sludge Thermophilic”. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*. v. 6, n. 4, p. 415–423. DOI: 10.22161/ijaers.6.4.49
- Frølund, B; Palmgren, R; Keiding, K; Nielsen, P. H. (1996) “ Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin”. *Water Research*. v. 30, p. 1749–1758. DOI:10.1016/0043-1354(95)00323-1
- Gao, D; Fu, Y; Tao, Y; Li, X; Xing, M. Gao, X; Ren, N. (2011) “ Bioresource Technology Linking microbial community structure to membrane biofouling associated with varying dissolved oxygen concentrations”. *Bioresource Technology*. v. 102, n. 10, p. 5626–5633. DOI:10.1016/j.biortech.2011.02.039
- Huang, L.; Yang, T.; Wang, W.; Zhang, B.; Sun, Y. (2012) “Effect of Mn<sup>2+</sup> augmentation on reinforcing aerobic sludge granulation in a sequencing batch reactor”. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 93, n. 6, p. 2615–2623. DOI: 10.1007 / s00253-011-3555-1

- Jenkins, D., Richard, Mg, Daigger, G.T. (2004) “Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems”. Ed. Lewis, Washington DC, 190 p.
- Jiang, H.; Tay, J.; Tay, S. T. (2002) “Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol”. *Letters in Applied Microbiology* .v 35. p. 439–445. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01217.x
- Jorand, F.; Zartarian, F.; Thomas, F.; Bottero, J.Y.; Villemin, G.; Urbain, V.; Manem, J. (1995) “Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs”. *Water Research*, 29, 1639-1647. DOI: 10.1016/0043-1354(94)00350-G
- Liu, H.; Li, Y.; Yang, C.; Pu, W.; He, L.; Bo, F. (2012) “Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane”. *Bioresource Technology*. v. 121, p. 111–118. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.016
- Liu, Y.; Liu, Y.; Tay, J. (2004) “The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules”. *Applied microbiology and biotechnology*. v 65 . p. 143–148. DOI: 10.1007%2Fs00253-004-1657-8
- Liu, X; Gao, X; Wang, W; Zheng, L; Zhou, Y; Sun, Y. (2012) “Pilot-scale anaerobic co-digestion of municipal biomass waste: Focusing on biogas production and GHG reduction”. *Renewable Energy*. v. 44, p. 463–468. DOI: 10.1016/j.renene.2012.01.092
- Liu, Y; Yang, S.; Tay, J. (2004) “Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria”. *Journal of Biotchnology*. v. 108, p. 161–169, 2004. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.11.008
- Long, B; Yang, C; Pu, W; Yang, J. (2015) “Tolerance to organic loading rate by aerobic granular sludge in a cyclic aerobic granular reactor”. *Bioresource Technology*. v. 182, p. 314-322. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.02.029
- Lv, Y; Wan, C; Lee, D; Liu, X; Tay, J. (2014) “Microbial communities of aerobic granules: Granulation mechanisms”. *Bioresource Technology*. v. 169, p. 344–351, DOI: 10.1016/j.biortech.2014.07.005
- Masurat, P., Fru, Ce, Pedersen, K. (2005) “Identification of *Meiothermus* as the dominant genus in a storage system for spent nuclear fuel”. *Journal of Applied Microbiology*. V. 98. p. 727-740. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02519.x
- Ming, H ; Yin, Y.-R .; Li, S .; Nie, G.-X .; Yu, T.-T .; Zhou, E.-M .; Liu, L .; Dong, L .; Li, W.-J. (2014) “*Thermus caliditerrae* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a geothermal area”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. V. 64. p.650-656. DOI: 10.1099 / ijs.0.056838-0
- Morais, I. L. H., Silva, C. M., Zanuncio, J. C., Zanuncio, A. J. V. (2018) “Structural stabilization of granular sludge by addition of calcium ions into aerobic bioreactors”. *BioResources*. v.13, p. 176-191. DOI: 10.15376/biores.13.1.176-191.
- Mosquera-Corral, A; Kreuk, M. K; Heijnen, J.J; Van Loosdrecht, M. C. M. (2005) “Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor”. *Water Research*. v. 39, p. 2676–2686. DOI: 10.1016/j.watres.2005.04.065
- Mcswain, B. S; Irvini, R. L; Hausner, M; Wilderer, P. A. (2005) “Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge”. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 71, n. 2, p. 1051–1057. DOI: 10.1128/AEM.71.2.1051-1057.2005
- Ni, B., Xie, W., Liu, S., Yu, H., Wang, Y., Wang, G., Dai, X. (2009) “Granulation of activated sludge in a pilot-scale sequencing batch reactor for the treatment of lowstrength municipal wastewater”. *Water Research*, 43: 751-761. DOI: 10.1016/j.watres.2008.11.009

- Ou, D; Li, H; Li, W; Wu, X.Wang, Y; Liu, Y. ( 2018) “Salt-tolerance aerobic granular sludge : Formation and microbial community characteristics”. *Bioresource Technology*. v. 249, n. July 2017, p. 132–138. DOI:10.1016/j.biortech.2017.07.154
- Pronk, M; Kreuk, M. K; Bruin, B; Kamminga, P; Kleerebezem, R; Van Loosdrecht, M. C. M. (2015) “ Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment”. *Water Research*. v. 84, p. 207–217. DOI:10.1016/j.watres.2015.07.011
- Quartaroli, L; Silva, L. C. F; Silva, C. M; Lima, H. S; Paula, S. O; Oliveira, V. M; Silva, M. C. S; Kasuya, M. C. M; Sousa, M. P; Torres, A. P. R; Souza, R. S; Bassin, J. P; Silva, C. C. (2017) “Ammonium Removal From High-Salinity Oilfield-Produced Water: Assessing the Microbial Community Dynamics at Increasing Salt Concentrations”. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 101. p. 859-870. DOI: 10.1007/s00253-016-7902-0.
- Silva, C. C; Jesus, E. C; Torres, A. P. R; Souza, M. P; Santiago, V. M; Oliveira, V. M. (2010) “Investigation of Bacterial Diversity in Membrane Bioreactor and Conventional Activated Sludge Processes from Petroleum Refineries Using Phylogenetic and Statistical Approaches”. *Journal Microbiology Biotechnology*. v. 20, p. 447–459. DOI:10.4014/jmb.0906.06052
- Suvilampi, J.; Rintala, J. (2004) “Thermophilic aerobic wastewater treatment , process performance , biomass characteristics , and effluent quality”. *Environmental Science & Bio/Technology*. v 2. p. 2001–2002, DOI: 10.1023/B:RESB.0000022959.46025.9a
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012) "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods*. v. 9(7): 671-675, PMID 22930834
- Spitaels, F; Wieme, A; Balzarini, T; Cleenwerck, I; Van Landschoot, A; Vuyst, L; Vandamme, P. (2014) “*Gluconobacter cerevisiae* sp . nov ., isolated from the brewery environment”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v 64 . p. 1134–1141. DOI: 10.1099/ijs.0.059311-0
- Tay, J.-H., Jiang, H.L., Tay, S.T.L. (2004) “High-rate biodegradation of phenol by aerobically grown microbial granules”. *Journal of Environmental Engineering*. v. 130, pp. 1415-1423. DOI: 10.1061 / (ASCE) 0733-9372 (2004) 130: 12 (1415)
- Tay, J.H., Yan, Y.G. (1996) “Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of upflow anaerobic sludge blanket reactor”. *Water Environment Research*, v. 68, n. 7, p. 1140-1150. DOI: stable/25044823
- Tu, X; Zhang, S; Xu, L; Zhang, M; Zhu, J. (2010) “Performance and fouling characteristics in a membrane sequence batch reactor ( MSBR ) system coupled with aerobic granular sludge”. *Desalination*. v. 261, n. 1–2, p. 191–196, DOI:10.1016/j.desal.2010.03.034
- Wang, Z; Gao, M; Wang, S; Xin, Y; Ma, D; She, Z; Wang, Z; Chang, Q; Ren, Y. ( 2014) “Effect of hexavalent chromium on extracellular polymeric substances of granular sludge from an aerobic granular sequencing batch reactor”. *Chemical Engineering Journal*. v. 251, p. 165–174. DOI:10.1016/j.cej.2014.04.078
- Wilén, B.M.; Balmér, P. (1999) “The Effect of Dissolved Oxygen Concentration on the Structure, Size, and Size Distribution of Activated Sludge Flocs”, *Water Research*, 33, 391-400. DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00208-5
- Snidaro, D.; Zartarian, F.; Jorand, F.; Bottero, J.Y.; Block, J.C.; Manem, J. ( 1997) “ Characterization of activated sludge flocs structure”. *Water Science and Technology*, 36, 313-320. DOI: 10.1016/S0273-1223(97)00447-2
- Xuan, W; Bin, Z; Zhiqiang, S; Zhiang, Q; Zhaoli, C; Min, J; Junwen, L; Jingfeng, W. (2010) “The EPS characteristics of sludge in an aerobic granule membrane bioreactor”. *Bioresource Technology*. v. 101, n. 21, p. 8046–8050. DOI:10.1016/j.biortech.2010.05.074
- Yang, C; Zhang, W; Liu, R; Li, Q; Li, B; Wang, S; Song, C; Qiao, C; Mulchandani, A.

- (2011) “ Phylogenetic Diversity and Metabolic Potential of Activated Sludge Microbial Communities in Full-Scale Wastewater Treatment Plants”. *Environmental Science & Technology*. v. 45. p. 7408–7415. DOI: 10.1021/es2010545
- Yang, Y; Wang, L; Xiang, F; Zhao, L; Qiao, Z. (2020) “Activated Sludge Microbial Community and Treatment Performance of Wastewater Treatment Plants in Industrial and Municipal Zones”. *International Journal of Environmental Research and Public Health* . V 17(2):436. DOI: 10.3390/ijerph17020436.
- Yu, N; Zhao, C; Ma, B; Li, S; She, Z; Guo, L; Zhang, Q; Zhao, Y; Jin, C; Gao, M. (2019) “Impact of ampicillin on the nitrogen removal , microbial community and enzymatic activity of activated sludge”. *Bioresource Technology*. v. 272, n. 238, p. 337–345. DOI:10.1016/j.biortech.2018.10.048
- Zhang, X; Qu, Y; Ma, Q; Zhang, Z; Li, D; Wang, J; Shen, W; Shen, E; Zhou, J. (2015) “ Illumina MiSeq Sequencing Reveals Diverse Microbial Communities of Activated Sludge Systems Stimulated by Different Aromatics for Indigo Biosynthesis from Indole”. *Plos One* . v.10: e0125732. DOI: 10.1371/journal.pone.0125732
- Zhu, G; Wang, S; Ma, B; Wang, X; Zhou, J; Zhao, S; Liu, R. (2018) “Anammox granular sludge in low-ammonium sewage treatment: Not bigger size driving better performance”. *Water Research*. v. 142, p. 147–158. DOI: 410.1016/j.watres.2018.05.048
- Zhu, L; Qi, H; Lv, M; Kong, Y; Yu, Y; Xu, X. (2012) “Bioresource Technology Component analysis of extracellular polymeric substances ( EPS ) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies”. *Bioresource Technology*. v. 124, p. 455–459. DOI:10.1016/j.biortech.2012.08.059

## II. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES GERAIS

O tratamento termofílico com o lodo aeróbio granular possui vantagens em comparação com os processos de tratamento mesofílicos convencionais. Suas características favorecem uma elevada taxa de degradação da matéria orgânica dos efluentes e uma maior facilidade na clarificação do efluente devido à maior velocidade de sedimentação nos decantadores. Portanto, as vantagens supracitadas têm impulsionado as investigações no tocante a compreensão e na aplicação do lodo aeróbio granular.

O Capítulo 1 apontou que o uso do lodo granular aeróbio em sistema de tratamento de efluentes ainda é incipiente, principalmente quando se trata do uso do sistema em fluxo contínuo, como atuam as principais tecnologias convencionais de tratamento biológico como o lodo ativado. Embora o tratamento em condições termofílicas possa agregar outras vantagens ao uso do lodo aeróbio granular, esta associação ainda é pouco estudada, mas existe um campo promissor de aplicação nas indústrias que geram efluentes de elevada temperatura. Pode-se perceber também, por meio da revisão, que o lodo aeróbio granular tende a ser mais robusto às cargas de choque, e ainda pode ter aplicação de remoção de nutrientes concomitantes com a remoção de cargas orgânicas, o que destaca ainda mais o seu potencial de uso.

No Capítulo 2 foi comprovada a viabilidade de se manter o lodo aeróbio granular sob condições termofílicas. O lodo aeróbio granular apresentou eficiência de remoção de DQO superior a 60% em todas as faixas de temperatura, incluindo 55°C. Durante a operação, os grânulos aeróbios mantidos nos reatores apresentaram diâmetro médio variando de 4 a 8 mm. Tais características contribuíram para a velocidade de sedimentação do lodo granular que foi determinada em 40 m.h<sup>-1</sup>, o que significa uma relação de 8 vezes maior que a velocidade de sedimentação do lodo floculento. Adicionalmente a aplicação de 100 mg.L<sup>-1</sup> de cálcio contribuiu positivamente para tornar os grânulos mais coesos e aumentar sua resistência mecânica, que foi comprovado pelo teste de resistência, para o qual o lodo que teve aplicação de 100 mg.L<sup>-1</sup>, apresentou o menor coeficiente de perda (aproximadamente zero) Em contrapartida, o mesmo efeito não foi observado para o lodo que recebeu a adição de 200 mg.L<sup>-1</sup> de cálcio.

Quanto à investigação do microbioma, realizada no Capítulo 3, as SPE em todas as situações foram produzidas em proporções satisfatórias para a agregação do lodo

microbiano, principalmente nas condições de maior stress, que teve maior influência da temperatura de 55 °C.

Os tratamentos apresentaram alto índice Shannon, apesar daqueles operados a 55 °C terem apresentado menor diversidade microbiana, reflexo da dominância de alguns grupos observada em 55 °C. Mas de modo geral, percebeu-se que o perfil de filos e gêneros foram agrupados pelas diferentes temperaturas. Portanto, foi possível observar que os filos Planctomycetes (40 %), Proteobacteria (28 %) Armatimonadetes (9 %), Firmicutes (8 %), Gemmatimonadetes (5 %), Caldiserica (4 %), Chlamydiae (2 %) e Acidobacteria (1 %) foram os mais abundantes nos 4 tratamentos avaliados. E os gêneros *Thermus* e *Meiothermus* se destacaram a 55 °C, enquanto os gêneros a 35 °C.

Para trabalhos futuros sugere-se investigar, a produção de excesso de lodo em escala piloto, e em escala real. Sugere-se ainda investigar o uso do lodo granular aeróbio termofílico em sistemas de biorreatores a membrana, de modo a potencializar o uso da tecnologia e aprimorar as funções de reuso de água.