

II-566 – AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE EM SISTEMAS DE TRATAMENTO COM GRÂNULOS AERÓBIOS

Oucilane Ingridt Moreno Alves⁽¹⁾

Engenheira Agrícola e Ambiental pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Mestre e Doutoranda em Engenharia Civil (Tecnologia Ambiental) pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Poliana Maria Januário Silva⁽²⁾

Engenheira Química pela Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP). Mestre e Doutora em Engenharia Civil (Tecnologia Ambiental) pela (UFPE).

Sávia Gavazza⁽³⁾

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Doutorado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). Professora Associada da UFPE. Pós-doutorado na Universidade de Cornell (EUA) e Universidade de Toronto (Canadá).

Mario Takayuki Kato⁽⁴⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestrado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela EESC-USP. Doutorado em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela Universidade de Wageningen (Holanda). Professor Titular da UFPE.

Lourdinha Florencio⁽⁴⁾

Engenheira Civil pela UFPE. Mestrado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela EESC-USP. Doutorado em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela Universidade de Wageningen (Holanda). Professora Titular da UFPE.

Endereço⁽¹⁾: Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE. Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n. Cidade Universitária. CEP: 50740-530. Recife – PE – Tel: (81) 2126-8228 – e-mail: oucilane@hotmail.com; flor@ufpe.br.

RESUMO

Os reatores com lodo granular aeróbio atuam na remoção simultânea de matéria orgânica e nutriente devido à presença das zonas aeróbias, anóxica e anaeróbia nas camadas do grânulo. Os grânulos aeróbios são desenvolvidos, preferencialmente, em reatores em bateladas sequenciais (RBS), com alta relação altura/diâmetro (H/D). As ferramentas da microscopia e da biologia molecular são excelentes para identificar os micro-organismos que atuam na formação dos grânulos bem como são indicadores de eficiência do sistema. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento de grânulos aeróbios utilizando dois reatores RBS em escala piloto tratando esgoto sanitário com diferentes trocas volumétricas. Os reatores foram operados em ciclos de 3 h, iguais tempos de sedimentação e uma velocidade ascensional de $0,88 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. O processo de granulação foi realizado no reator RBS I aplicando uma troca volumétrica de 71% e no reator RBS II aplicando uma troca volumétrica de 59%. O processo de granulação no reator RBS I, demandou mais tempo, porém os grânulos permaneceram por mais tempo no reator. Com relação às eficiências médias de remoção de matéria orgânica, não foi observada diferença entre os reatores, ao nível de confiança de 95%. A eficiência média de remoção de N-NH_4^+ , no reator RBS II, foi 33,2% maior do que no RBS I. A justificativa foi a troca volumétrica de 71% utilizada no reator RBS I, que ocasionou uma maior lavagem da biomassa nitrificante do reator. Aplicando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), observou-se que no processo de nitrificação e desnitrificação os grupos de bactérias dominantes foram as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e as desnitrificantes. A presença identificada do grupo de bactérias desnitrificantes na fase de grânulos nos reatores indicou a presença de zonas anóxicas. Portanto, é possível desenvolver grânulos aeróbios em RBS aplicando baixa velocidade ascensional de $0,88 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ no tratamento de esgoto sanitário; e a identificação dos micro-organismos presentes no sistema permitiu avaliar a melhor condição operacional a ser aplicada nos reatores para a formação de grânulos, ou seja, a condição aplicada ao RBS I.

PALAVRAS-CHAVE: Esgoto sanitário, Reator em batelada sequencial, Troca volumétrica, Remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio.

INTRODUÇÃO

Os sistemas convencionais de tratamento de esgoto sanitário com lodos ativados são bastante difundidos e utilizados no Brasil, por apresentarem uma alta eficiência de remoção da matéria orgânica. Porém, esses sistemas requerem a utilização de grandes áreas para a instalação de suas etapas de tratamento, assim como um tanque anaeróbio para a remoção de nutriente. Dessa forma, visando melhorar a retenção de biomassa e remoção simultânea de carbono e nutrientes, surge uma tecnologia relativamente recente, a de grânulos aeróbios. A granulação aeróbia é realizada preferencialmente em reatores em bateladas sequenciais (RBS) com uma alta relação altura/diâmetro. O processo em bateladas agrega todas as etapas associadas ao tratamento com lodos ativados, de forma sequencial, em um único tanque, e não em unidades sequenciais separadas. Porém, esses reatores quando utilizados para a granulação aeróbia, geralmente são operados em escala laboratorial e alimentados com esgoto sintético.

Os grânulos aeróbios são conhecidos por sua forma esférica e por apresentarem sedimentação mais rápida que os flocos de lodos ativados. Sua estrutura é formada pela agregação dos micro-organismos em uma única estrutura que coagulam com a aplicação de elevada força de cisalhamento hidrodinâmico (DE KREUK et al. 2005). O processo de formação dos grânulos aeróbios depende da aplicação de algumas estratégias operacionais específicas, tais como a velocidade ascensional, tempo de ciclo, baixo tempo de sedimentação, alta relação altura/diâmetro, carga orgânica e tipo de substrato. Os grânulos formados possuem em sua estrutura zonas aeróbia, anóxica e anaeróbia, que promovem a remoção da matéria orgânica e nutrientes em uma única unidade (BEUN et al., 1999; BEUN et al., 2000; ZHANG et al., 2001; ADAV et al., 2008; KIM et al., 2008; SHOW et al., 2012).

Os micro-organismos presentes no tratamento com grânulos aeróbios são semelhantes aos encontrados nos sistemas de lodos ativados. Entretanto, deve-se ter o cuidado de evitar o crescimento de bactérias filamentosas nos sistemas com grânulos aeróbios, já que o surgimento destes micro-organismos resulta em grânulos menos densos. Show et al. (2012) afirmam que a presença desses micro-organismos filamentosos tende a obstruir os poros do grânulo causando a lavagem da biomassa e, conseqüentemente, problemas no sistema. O tipo de substrato que alimenta o reator determina a comunidade microbiana a ser desenvolvida na estrutura dos grânulos (QIN et al., 2004).

Neste trabalho, objetivo foi o de avaliar a formação de grânulos aeróbios e a diversidade microbiana em reatores em bateladas sequenciais com diferentes trocas volumétricas no tratamento de esgoto sanitário.

MATERIAIS E MÉTODOS

O sistema experimental foi constituído por dois RBS idênticos construídos em acrílico e instalados na estação de tratamento de esgotos (ETE) do bairro da Mangueira, localizada em Recife – PE. Os reatores possuíam as seguintes dimensões: coluna com 3,0 m de altura, 0,245 m de diâmetro interno e 0,003 m de espessura. Sobre a coluna de acrílico existia um tanque cilíndrico, em PVC, com 0,4 m de diâmetro e 0,4 m de altura, para a entrada do afluente. O volume útil dos reatores era de 0,115 m³, correspondendo a uma altura útil de 2,45 m. Em cada reator foram instaladas duas válvulas para a saída do efluente tratado: a primeira válvula situada a 0,7 m da base do reator e a segunda a 1,0 m da base do reator. O volume acima da primeira válvula correspondia ao maior percentual de troca volumétrica (T_v), ou seja, $T_v = 71\%$ do volume útil do reator. O volume acima da segunda válvula correspondia ao menor percentual de troca volumétrica, ou seja, $T_v = 59\%$ do volume útil do reator.

O esgoto proveniente do tratamento primário (caixa de areia) da ETE Mangueira foi utilizado para a alimentação dos reatores. Os reatores não foram inoculados e foram operados em regime de batelada com ciclos de 3 h. Os ciclos das bateladas foram compostos pelas seguintes fases: enchimento estático, aeração, sedimentação e descarte/repouso. As trocas volumétricas utilizadas nos reatores RBS I e RBS II foram de 71 e 59%, respectivamente. A velocidade ascensional de ar aplicada em ambos os reatores foi de 0,88 cm.s⁻¹ e com estratégia de redução gradual do tempo de sedimentação até 10 minutos. As dimensões do RBS e os componentes do sistema estão exemplificados na Figura 1 de forma esquemática.

O sistema experimental foi automatizado com o auxílio de um Controlador Lógico Programável (CLP) com linguagem *ladder*. O ciclo era iniciado com bombeamento do afluente para os dois reatores (fase de enchimento). Em seguida, o compressor era acionado para oxigenar o sistema por meio de uma membrana de ar de bolhas

finas na base do reator (fase de reação). Com o desligamento dos compressores, a biomassa sedimentava e parte do efluente tratado era descartado através do acionamento da válvula solenoide.

Para acompanhar o desenvolvimento da biomassa e da população microbiana foram realizados exames com o microscópio óptico do licor misto de ambos reatores, de forma a analisar a estrutura e formação dos grânulos, identificação e predominância dos micro-organismos nos grânulos aeróbios. Com as amostras do licor misto foi aplicada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo as amostras de DNA extraídas com o kit Power Soil™ DNA Isolation (Laboratório MoBio). A amplificação da PCR foi realizada em um termociclador da Bio Rad, empregando-se *primers* específicos para avaliar a presença ou ausência de determinados grupos de micro-organismos responsáveis pela remoção de nitrogênio, conforme a Tabela 1. Além disso, foram realizadas análises físico-químicas semanais em amostras de afluente e efluente ao longo do período de operação, conforme especificadas na Tabela 2 e foram realizadas e embasadas pelo *Standard Methods* (APHA, 2012).

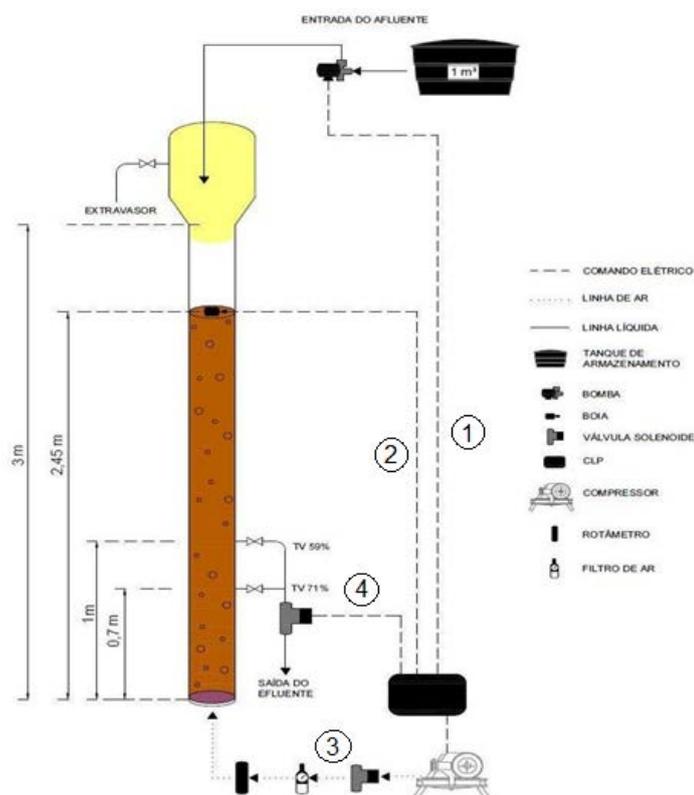


Figura 1 – Dimensões, componentes e esquema de funcionamento do RBS.

Tabela 1 – *Primers* utilizados na amplificação do DNA

Domínio	Primer	Sequência	Referência
DNAr 16S - Desnitrificantes	nirS2F-GC nirS3R	TACCACCCCGAGCCGCGCGT GCCGCCGTCGTGCAGGAA	Nittami et al., (2003)
DNAr 16S – Anammox	amx368F amx 820R	TTCGCAATGCCCGAAAGG AAAACCCCTCTACTTAGTGCC	Schimdt et al., (2001)
DNAr 16S – Nitrospira	NTS232F NTS1200R	GTCATGTCCTATCAGCTTG AGGCATAAAGGCCATGCTG	Lim et al., (2008)
DNAr 16S – BOA	NOS190F NSO1225R	CGATCCCCTGCTTTTCTCC CGCCATTGTATTACGTGTGA	Mobarry et al., (1996)

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos analisados e seus respectivos métodos analíticos

Análises	Unidade	Métodos Analíticos
DQO total	mg/L	Colorimétrico
Nitrogênio total	mg N-NH ₄ ⁺ /L	Macro-Kjedhal
Nitrito	mg NO ₂ ⁻ /L	Íons
Nitrato	mg NO ₃ ⁻ /L	Íons
Nitrogênio amoniacal	mg N-NH ₄ ⁺ /L	Titulométrico

RESULTADOS

Quando o processo de granulação foi atingido (78 e 53 dias para os RBS I e II, respectivamente), foi observado que os grânulos eram densos, esféricos e com boa sedimentabilidade. Os grânulos obtidos possuíam uma coloração marrom, superfície lisa e tamanho médio de 2,5 mm (Figura 2 (a) e 2 (b)).

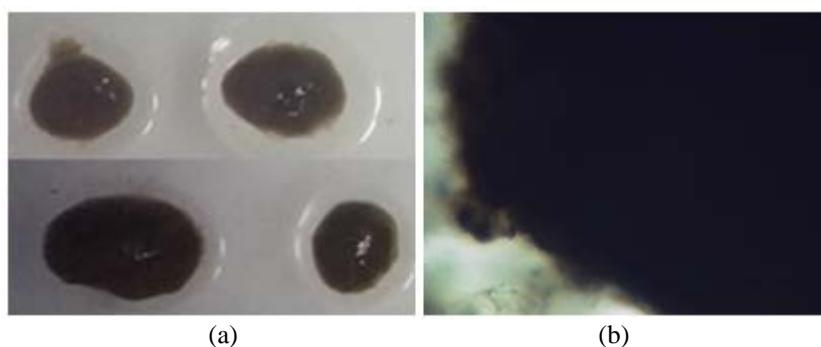


Fig. 2 (a) imagem digital dos grânulos; (b) imagem microscópica do grânulo

Com as imagens obtidas na microscopia foi possível acompanhar o desenvolvimento e a dinâmica de agregação da bioamssa para a formação dos grânulos. Para o RBS I (Figura 3), pode-se observar que aos 15 dias os flocos eram grandes e dispersos, aos 54 dias grandes e com centros densos, aos 87 dias foi observado a presença de grânulos no reator e aos 124 dias flocos grandes e densos devido a instabilidade do sistema. Para o RBS II (Figura 4), aos 17 dias os flocos era grandes e dispersos, aos 36 dias permaneceram grandes com centros densos, aos 57 dias observou-se a presença de grânulos e os 82 dias ocorreu a desintegração parcial dos granulos e a presença de flocos grandes, devido a instabilidade do sistema.

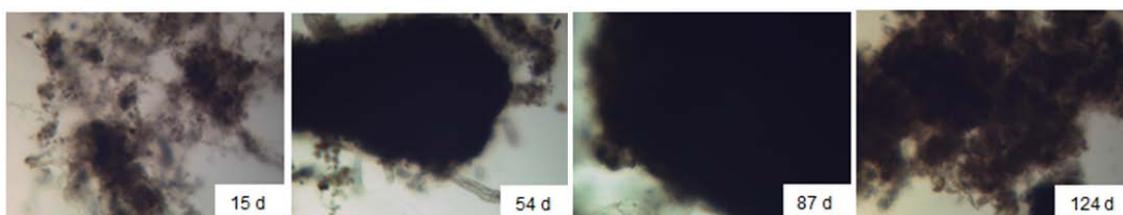


Fig. 3 Desenvolvimento da biomassa granular no RBS I – Tv 71% (ampliação de 100x)

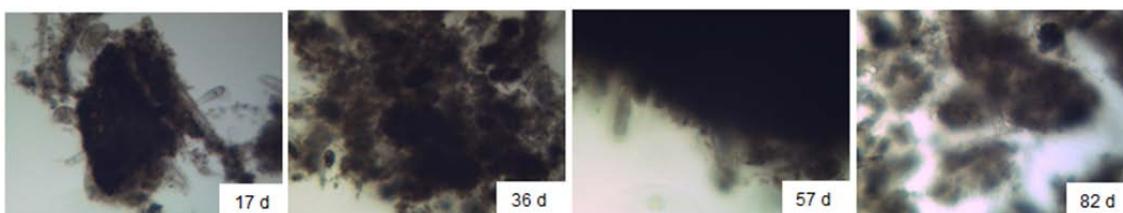


Fig. 4 Desenvolvimento da biomassa granular no RBS I – Tv 59% (ampliação de 100x)

Através da microscopia óptica foi possível identificar também a presença de diversos grupos de micro-organismos, como os ciliados livres e fixos, amebas e rotíferos no licor misto dos reatores, conforme mostra a Figura 5.

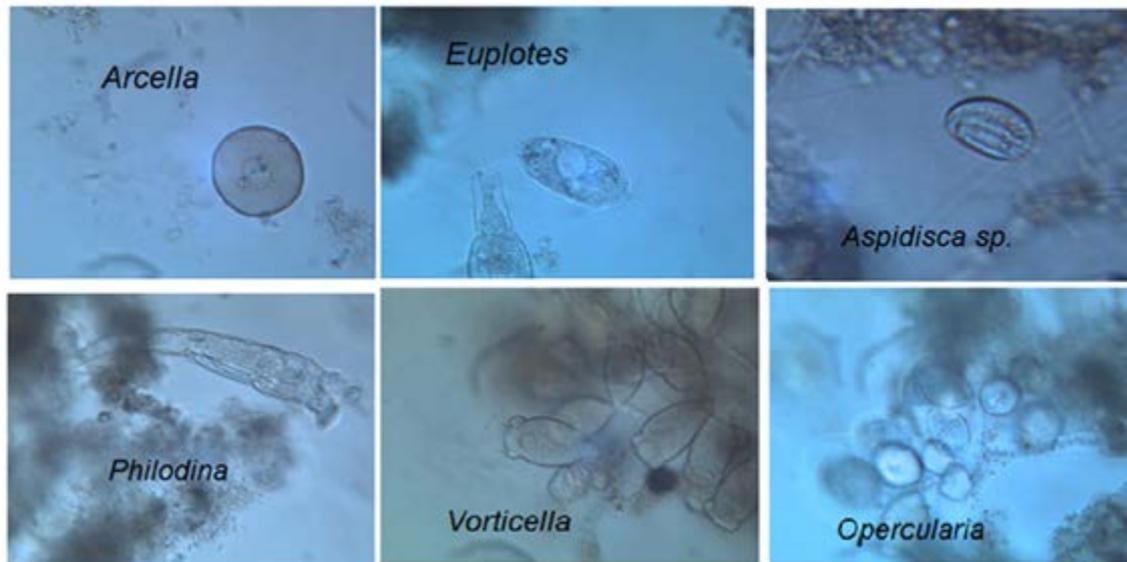


Figura 5 Micro-organismos mais abundantes nos reatores.

Os resultados da PCR para os *primers* de bactérias nitrificantes e desnitrificantes estão explicitados na Figura 6.

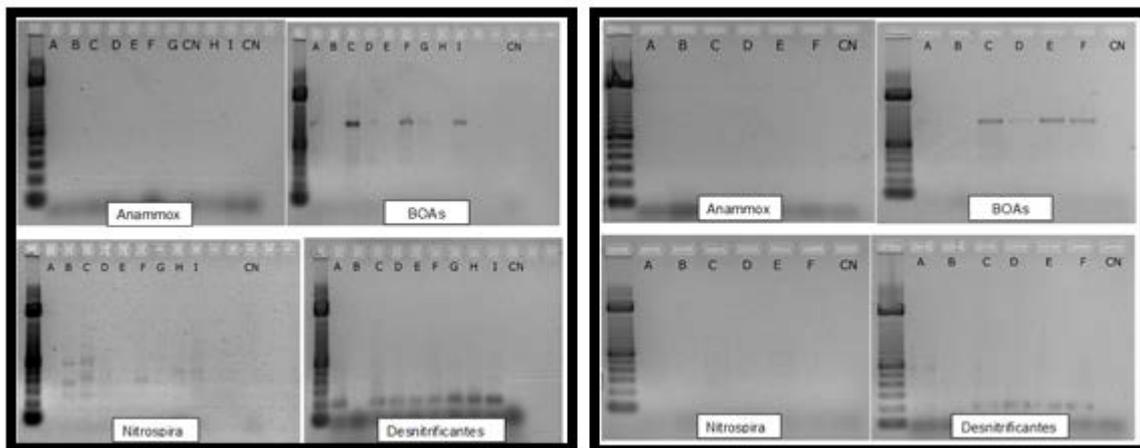


Figura 6 Resultados da PCR para os *primers* de bactérias Anammox, Bactérias oxidadoras de amônia (BOA), *Nitrospira* e Desnitrificantes para os RBS I (esquerda) e RBS II (direita)

Em termos de eficiência média de remoção de DQO, não houve diferenças significativas entres os sistemas, sendo a eficiência do RBS I de $81,3 \pm 6,5\%$ e do RBS II de $78,3 \pm 9,8\%$. Entretanto, a remoção de nitrogênio amoniacal no RBS I foi de $42,2 \pm 19,6\%$ e do RBS II de $75,4 \pm 25,4\%$.

DISCUSSÃO

O tamanho médio dos grânulos obtidos nos reatores está de acordo com a classificação proposta por Liu et al. (2004) que classificam como biomassa granular as partículas com tamanhos variando de 0,2 a 5,0 mm.

A microscopia óptica permitiu avaliar o desenvolvimento da biomassa até a formação dos grânulos e, em ambos os reatores foi constatado que a agregação da biomassa se deu de forma lenta e com formação de flocos grandes e densos antes da formação dos grânulos. Este processo foi dependente das condições operacionais aplicadas no sistema, como a troca volumétrica (71% e 59% para RBS I e RBS II, respectivamente) e a velocidade ascensional ($0,88 \text{ cm.s}^{-1}$), que interferiram no tempo necessário a granulação. Para o RBS I, o processo de granulação foi mais longo, porém os grânulos obtidos foram mais estáveis comparados ao do RBS II. Um dos fatores interferentes no processo de granulação é a carga orgânica aplicada ao sistema, pois a variação de concentração

dificulta a formação e estabilidade dos grânulos (YU et al., 2014 e LIU et al., 2010). De acordo com estudos desenvolvidos por Moy et al. (2002) e Zhong et al. (2014) foi possível obter grânulos aeróbios com cargas orgânicas variando de 0,31 a 15 kg DQO.m⁻³.dia⁻¹.

A identificação dos micro-organismos presentes no licor misto dos reatores permite obter informações do funcionamento do sistema, seu processo depurativo e as fases de estabilização da biomassa (CYBIS e PINTO, 1997). A presença dos grupos de micro-organismos como os ciliados livres e fixos, rotíferos e amebas conferiram que o sistema estava bem oxigenado, com participação na estruturação dos grânulos, estabilidade da carga orgânica, ausência de substâncias tóxicas e melhora da qualidade do efluente final (ZHOU et al., 2008; GIRARDI, 2008; FERNANDES et al., 2013; LI et al., 2013).

Analisando os resultados obtidos na PCR (Figura 6) e a remoção do nitrogênio amoniacal nos reatores (RBS I - 42,2 ± 19,6% e RBS II - 75,4 ± 25,4%) notou-se que os principais grupos de micro-organismos responsáveis pela remoção do nitrogênio (*Boa*, *Nitrospira* e desnitrificantes) estavam presentes. Apesar da identificação dos micro-organismos responsáveis pelo processo de nitrificação ter sido confirmada na PCR, a concentração de biomassa nitrificante não foi o suficiente para realizar todo o processo, principalmente no RBS I devido, possivelmente, à utilização da maior troca volumétrica. Isto acarretou na lavagem da maior parte da biomassa de crescimento lento que inclui as bactérias nitrificantes. Para Ni et al. (2008) essas bactérias são difíceis de serem retidas no sistema como lodo granular, pois são de crescimento lento e a aplicação da estratégia de redução gradual do tempo de sedimentação proporciona um aumento da lavagem desses micro-organismos.

Embora o RBS I não apresentasse uma eficiência de remoção de nitrogênio elevada, a presença dos micro-organismos desnitrificantes, em ambos os reatores, quando houve grânulos formados, indica que na estrutura dos grânulos ocorreu a formação de zonas anóxicas, ambiente que favorece a atividade destes micro-organismos.

Para o RBS II, a ausência da bactéria *Nitrospira* (Figura 6) indicou a possível existência de outra espécie de micro-organismo oxidadores de nitrito no sistema. E, o grupo de bactéria anammox, tanto para o RBS I quanto o RBS II, não foi identificado devido à estratégia operacional adotada (Figura 6).

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, conclui-se que:

O processo de formação dos grânulos foi obtido nos dois reatores, sendo para o RBS I com troca volumétrica de 71% foi aos 78 dias e para os RBS II com troca volumétrica de 59% foi aos 53 dias. A agregação da biomassa floculenta ocorreu gradualmente até a completa formação dos grânulos em ambos os reatores.

Com relação à eficiência média de remoção da matéria orgânica, observou-se que não houve diferença significativa entre os reatores, tendo sido de 81,3 ± 6,5% e 78,3 ± 9,8% para os reatores RBS I e RBS II, respectivamente.

Apesar da presença das bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação e desnitrificação em ambos os reatores, no RBS I não se obteve uma eficiência média de remoção de nitrogênio amoniacal elevada (42,2 ± 19,6%), devido à utilização da maior troca volumétrica (71%), o que ocasionou na lavagem das bactérias nitrificantes que são de crescimento lento juntamente com a biomassa.

As bactérias desnitrificantes foram observadas nos dois reatores indicando a formação de zonas anóxicas nos grânulos. No RBS II não foi identificado o grupo *Nitrospira* sugerindo que outros grupos de bactérias oxidadoras de nitrito atuaram no sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAV, S. S., LEE, D. J., SHOW, K. Y., TAY, J. H. *Aerobic granular sludge: recent advances. Biotechnology Advances*. V. 26, n.5, p. 411-423, set-out. 2008.
2. APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22. ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, 2012.

3. BEUN, J. J., HENDRIKS, A., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., MORGENROTH, E., WILDERER, P. A., HEIJNEN, J. J. *Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. Water Research.* v. 33, n. 10, p. 2283-2290, jul. 1999.
4. BEUN, J. J., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., HEIJNEN, J. J. *Aerobic granulation. Water Science & Technology.* v. 41 n. 4-5, p. 41-48, fev. 2000.
5. CYBIS, L. F., PINTO, C. R. R. Protozoários e metazoários presentes em reatores sequenciais em batelada (RSB) observados no processo de nitrificação. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19, 1997. Foz do Iguaçu, ANAIS. Foz do Iguaçu, ABES. p. 793-802, 1997.
6. DE KREUK, M. K., HEIJNEN, J. J., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. *Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. Biotechnology & Bioengineering.* v. 90, n. 6, 761-769, jun. 2005.
7. FERNANDES, H. JUNGLES, M. K., HOFFMANN, H., ANTONIO, R. V., COSTA, R. H. R. *Full-scale sequencing batch reactor (SBR) for domestic wastewater: Performance and diversity of microbial communities. Bioresource Technology.* v. 132, p. 262-268, mar. 2013.
8. GERARDI, M. H. Microscopic examination of the activated sludge process. ed. Wiley. p. 208. 2008.
9. KIM, I. S., KIM, S. M., JANG, A. *Characterization of aerobic granules by microbial density at different COD loading rates. Bioresource Technology.* v. 99, n. 1, p. 18-25, jan. 2008.
10. LI, J., MA, L., WEI, S., HORN, H. *Aerobic granules dwelling vorticella and rotifers in an SBR fed with domestic wastewater. Separation and purification Technology.* v. 110, n. 7, p. 127-131, jun. 2013.
11. LIM, J., DO, H., SHIN, S. G., HWANG, S. *Primer and probe sets for group-specific quantification of the genera Nitrosomonas and Nitrospira using real-time PCR. Biotechnology and Bioengineering.* v. 99, n. 6, p. 1374-1383, abr. 2008.
12. LIU, Q. S.; TAY, J. H.; LIU, Y. *Substrate concentration-independent aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. Environmental Technology.* v. 24, n. 10, p. 1235-1243, out. 2004.
13. LIU, Y., MOY, B., KONG, Y., TAY, J. *Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment. Enzyme and microbial technology.* v. 46 n. 6, p. 520-525, mai. 2010.
14. MOBARRY, B. K., WAGNER, M., URBAIN, V., RITTMANN, B. E., STAHL, D. A. *Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology.* v. 62, n. 6, p. 2156-2162, jun. 1996.
15. MOY, B. Y. P., TAY, J. H., TOH, S. K., LIU, Y., TAY, S. T. L. *High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. Letters in Applied Microbiology.* v. 34 n. 6, p. 407-412, mai. 2002.
16. NI, B. J., YU, H. Q., SUN, Y. J. *Modeling simultaneous autotrophic and heterotrophic growth in aerobic granules. Water Research.* v. 42 n. 6-7, p. 1583-1594, mar. 2008.
17. NITTAMI, T., KURISU, F., SATOH, H., MINO, T. *Analysis of the populations of denitrifying bacteria in activated sludge by PCR-DGGE analysis of the nirS nitrite reductase genes. Journal of Japan Society on Water Environmental.* v. 26, n. 9, p. 583-588, 2003.
18. QIN, L., LIU, Y., TAY, J. *Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. Biochemical Engineering Journal.* v. 21, n. 1, p. 47-52, set. 2004.
19. SCHMID, M., SCHMITZ-ESSER, S., JETTEN, M., WAGNER, M. *16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. Environmental Microbiology.* v. 3 n. 7, p. 450-459, jul. 2001.
20. SHOW, K. Y., LEE, D. J., TAY, J. H. *Aerobic Granulation: Advances and Challenges. Applied Biochemistry and Biotechnology.* v. 167, p. 1622-1640, jul. 2012.
21. WAGNER, J., COSTA, R. H. R. *Reator em bateladas sequenciais de grânulos aeróbios: estudo da formação dos grânulos e do efeito da duração do ciclo na remoção de carbono, nitrogênio e fósforo de esgoto doméstico. Engenharia Sanitária e Ambiental.* v. 20 n. 2, p. 269-278, abr/jun. 2015.
22. YU, S., SUN, P., ZHENG, W., CHEN, L., ZHENG, X., HAN, J., YAN, T. *The effect of COD loading on the granule-based enhanced biological phosphorus removal system and the recoverability. Bioresource Technology.* v. 171, p. 80-87, ago. 2014.
23. ZHANG, T., FANG, H., *Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. Biotechnology Letters.* v. 23 n. 5, p. 405-409, mar. 2001.
24. ZHONG, C., WANG, Y., LU, J., LI, Y., WANG, Y., ZHU, J. *Transformation and performance of granular sequence batch reactor under conventional organic loading rate condition. Journal of Central South University.* v. 21, p. 2819-2825, jul. 2014.

25. ZHOU, K., XU, M., LIU, B., CAO, H. *Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. Journal of Environmental Sciences*, v. 20, p. 482–486, ago. 2008.